



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

**CAMILLA SALVIANO BEZERRA**

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* EM  
DIFERENTES SUPORTES E PROTOCOLOS DE ATIVAÇÃO**

FORTALEZA – CE  
2012

**CAMILLA SALVIANO BEZERRA**

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* EM  
DIFERENTES SUPORTES E PROTOCOLOS DE ATIVAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

---

B469i Bezerra, Camilla Salviano.  
de Imobilização de  $\beta$ -Galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos  
ativação / Camilla Salviano Bezerra. – 2012.  
114 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Processos químicos e bioquímicos  
Orientação: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano.  
Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Engenharia Química. 2. Fibras vegetais. 3. Bagaço de caju. 4. Lactose. 5. Soro de leite. I. Título.

**CAMILLA SALVIANO BEZERRA**

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* EM  
DIFERENTES SUPORTES E PROTOCOLOS DE ATIVAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em 24/02/2012.

**BANCA EXAMINADORA**



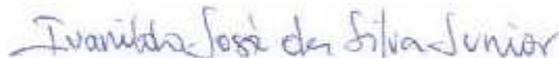
---

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano (Orientador)  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



---

Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Dasciana de Sousa Rodrigues  
Embrapa Agroenergia



---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Aos meus pais, Ilma e Henrique Salviano, e ao  
meu irmão Eduardo.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todos os bons caminhos que traçou em minha vida, mesmo com as dificuldades, pois elas só realçaram o prazer das vitórias.

À minha mãe, Ilma, por ser simplesmente essencial em todos os meus passos e decisões, por cuidar com tanto zelo e amor de mim e por me apoiar e ajudar nos momentos de dúvida e medo. Ao meu PAI, Henrique Salviano, por todos os ensinamentos, sabedoria, apoio e orgulho em toda minha vida, e o mais importante, por dedicar sua vida em função da educação e saúde de seus filhos; devo a ele o mérito desta conquista. Ao meu irmão, que mesmo com todas as distâncias, representa um exemplo de pesquisador que sempre sigo e busco ser em minha vida acadêmica.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Wellington Sabino Adriano, por ser mais que um orientador, um mestre e um amigo, pela confiança em todos os momentos, conhecimento, oportunidades e crescimento profissional imensurável. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela co-orientação, por ter me acolhido e dado a oportunidade de fazer parte do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio), pelos inúmeros momentos de apoio e soluções dadas quando se imaginava não ter outra saída, pela bondade, compreensão e sabedoria.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Valderéz Ponte Rocha por toda convivência pessoal e profissional muito importante. Obrigada pelo apoio e incentivo sempre dado.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFC pelos momentos de grande aprendizado e convivência ao longo do mestrado. Em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Rodrigues pelas contribuições e participação na banca de qualificação; Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Ivanildo José da Silva Júnior pela participação na banca, juntamente com suas sugestões, e por desde o início confiar em mim e me proporcionar oportunidades em momentos difíceis; Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana pelos momentos de incentivo e descontração.

À Dr<sup>a</sup> Dasciana de Sousa Rodrigues, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, pela importante participação na banca e contribuições.

Ao Bruno, por toda compreensão, paciência, incentivo e amor, além do exemplo como profissional.

À minha família linda: avôs (*In Memoriam*), avós, tias, tios e primos.

Aos amigos da grande família GPBIO por toda convivência ímpar e reconhecimento: Tigres, Cleiton, Vana, Léo, Álvaro, Ulisses, Bete, Ítalo, Fátima, Lincoln, Kim, Bruna, Emanuel, Felipe, Winnie e demais integrantes, que proporcionam momentos de troca de conhecimentos diários, diversão, apoio e amizade, fazendo deste, um grupo único e especial, do qual me sinto premiada em poder fazer parte. Meu muito obrigada a vocês.

Em especial, às amigas irmãs que foram todo o suporte em momentos difíceis: Kamilly, Kênia, Mary, Ticiane, Cris, Jéssyca e Juliana. Amizade inexplicável e que me orgulha a cada dia.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, por toda longa convivência e valiosas trocas de conhecimento: Mari, Sisi, Diôgo, Karine, Larissa, Diego, Eurânio, Nádia, Gardi, Márcia, Fred, Genilton, Bruno, Alaídes, Natália, Juliana, Rosana e demais colegas.

Ao pequeno príncipe Gabriel e sua mãe Sâmila, por ter despertado em mim um objetivo de vida, o “por que” de minha vida.

Aos queridos amigos de Cuité, por todos os momentos maravilhosos compartilhados em quase três meses, em especial: Júlia, Clarinha, Dany, Flávia, Carina, Egberto, grande coleguinha Carlos, Wylly, Júlio, Mano Giva, Márcio, Toshiyuki, Emília, Lauro, Jacqueline, Marciano, Rosalina (representando a turma de Farmácia 2012.1) e Wendeberto.

Aos meus queridos amigos Camila, Marília, Luana, Larissa, Bia, Adelita, Tássia, Vanderson, Mariana, Rejane, Ayana, Mirtenes, Jonatas, Miguel, Sr. Afonso (em nome dos amigos do Coco Bambu), Nogueira (em nome dos amigos do Dom Churrasco), Toinha, Carlinha, Pablo, MacGayver, Hallison e Bruna, por toda amizade, mesmo com a distância, tão especial.

Aos atuais e ex-funcionários do DEQ/UFC, Maria Nogueira, Luís Patrícia e Jorge(ão) por sempre nos ajudar.

À Universidade Federal do Ceará e Departamento de Engenharia Química, por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de mestre.

Ao CNPq pelo consentimento da bolsa de pesquisa.

*“Se pude ver mais longe, foi por ter-me apoiado em ombros de gigantes.”  
(Isaac Newton)*

## RESUMO

A imobilização de  $\beta$ -galactosidase para hidrólise de lactose é uma proposta para agregar valor ao soro de leite com conseqüente produção de galactose e glicose. O objetivo deste trabalho foi desenvolver biocatalisadores a partir de diferentes suportes orgânicos e protocolos de ativação visando à hidrólise de lactose proveniente do soro de leite. Inicialmente, prepararam-se os suportes a serem aplicados no estudo como quitosana 2,5% (m/v) (sem e com pré-tratamento com dimetilformamida) e 2,0% (m/v), quitosana-alginato-epoxilado (QAE), bagaço de caju (BC) e fibra de casca de coco verde (CV), os quais foram ativados de diferentes formas, com glutaraldeído, epicloridrina ou glicidol. Na primeira etapa, determinaram-se o rendimento de imobilização, atividade recuperada e atividade aparente dos diferentes derivados obtidos para assim determinar os seis melhores – quitosana 2,5% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU1</sub>), quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>) ou epicloridrina (QUIT<sub>EPI</sub>) ou glicidol (QUIT<sub>GLI</sub>), quitosana 2,5% (m/v) tratada com dimetilformamida ativada com epicloridrina (QUIT-DMF<sub>EPI</sub>) ou glicidol (QUIT-DMF<sub>GLI</sub>). Para segunda fase, os catalisadores (QUIT<sub>GLU1</sub>, QUIT<sub>GLU2</sub>, QUIT<sub>EPI</sub>, QUIT<sub>GLI</sub>) foram estudados quanto à estabilidade operacional com o uso de reator contínuo, assim como ensaios de carga máxima e efetividade. Baseado nestes ensaios determinou-se QUIT<sub>GLU2</sub> como melhor biocatalisador e realizaram-se os seguintes estudos: variação do tempo de imobilização, determinação da melhor temperatura e pH para atividade enzimática, determinação de parâmetros cinéticos, estocagem sob 10°C e estabilidade operacional com o uso de alta carga enzimática usando soro de leite como substrato. Suportes como CV e BC não apresentaram boa adequação para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, assim como o suporte QAE. Suportes com tratamento com dimetilformamida apresentaram baixos rendimentos de imobilização. Os resultados para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> apresentaram carga máxima de 75 mg<sub>Proteína</sub>·g<sup>-1</sup> de suporte e efetividade superiores aos demais. A estabilidade operacional para este derivado apresentou-se estável, visto sua produção de glicose constante por 10 h de reação. O tempo 3 h mostrou-se suficiente para imobilização. Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> tanto para enzima solúvel (46,79 mM e 7.142,86  $\mu$ mol.(mL.min)<sup>-1</sup>) quanto para o derivado (69,56 mM e 113,25  $\mu$ mol.(g.min)<sup>-1</sup>). Durante os 120 dias de armazenamento sob 10°C, não houve decréscimo da atividade hidrolítica do derivado, demonstrando ótima estabilidade à estocagem. Por fim, o biocatalisador mostrou bons resultados de estabilidade operacional quando utilizado em alta carga oferecida (255,9 mg<sub>Proteína</sub>·g<sup>-1</sup> de quitosana de carga teoricamente imobilizada) para hidrólise de soro de leite.

**Palavras chave:**  $\beta$ -galactosidase. *Kluyveromyces lactis*. Imobilização. Quitosana. Fibra de casca de coco verde. Bagaço de caju. Lactose. Soro de leite.

## ABSTRACT

$\beta$ -galactosidase immobilization was studied seeking to add value to cheese whey through lactose hydrolysis producing galactose and glucose. This work aimed to develop biocatalysts using different organic supports and activation protocols. Firstly, some supports were prepared as chitosan 2.5% (w/v) (with and without pretreatment with dimethylformamide) and 2.0% (w/v), chitosan-alginate-epoxide (QAE), cashew bagasse (BC) and coconut shell fiber (CV), which were activated in different ways with glutaraldehyde, epichlorohydrin or glycidol. Initially, it was determined the immobilization yield, couple yield and apparent activity from obtained catalysts, being chosen six derivatives according to better results parameters: 2.5% chitosan (w/v) glutaraldehyde activated (QUIT<sub>GLU1</sub>), 2.0% chitosan (w/v) KOH coagulated at 50°C glutaraldehyde activated (QUIT<sub>GLU2</sub>) and epichlorohydrin (QUIT<sub>EPI</sub>) or glycidol (QUIT<sub>GLI</sub>), chitosan 2.5% (w/v) dimethylformamide treated with epichlorohydrin (QUIT-DMF<sub>EPI</sub>) or glycidol (QUIT-DMF<sub>GLI</sub>). Thus, catalysts (QUIT<sub>GLU1</sub>, QUIT<sub>GLU2</sub>, QUIT<sub>EPI</sub>, QUIT<sub>GLI</sub>) were studied as operational stability by using a continuous reactor, as well as, maximum enzyme loading and effectiveness assays. Then, it was determined QUIT<sub>GLU2</sub> as the best biocatalyst and following studies were carried out: immobilization time, enzyme optimum temperature and pH, kinetic parameters using lactose as substrate at 37°C, storage at 10°C and operational stability using high load enzyme and cheese whey as substrate. CV and BC supports did not present good results for  $\beta$ -*Kluyveromyces lactis* galactosidase immobilization, as well as, QAE support. Supports treated with dimethylformamide presented low immobilization yields. The results for QUIT<sub>GLU2</sub> derivative presented maximum loading of 75 mg<sub>Protein</sub>·g<sup>-1</sup>support and higher effectiveness than others. The operational stability for this derivative remained stable, with constant glucose production for 10 h of reaction. Immobilization time of 3h proved enough for the process. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were respectively: free enzyme (46.79 mM and 7,142.86  $\mu\text{mol} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ ) and catalyst (69.56 mM and 113.25  $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ ). During 120 days of storage at 10°C, no decrease derivative hydrolytic activity was noted, demonstrating satisfactory storage stability. Finally, the biocatalyst showed good results as operational stability when used high offered enzyme load (theoretically immobilized load 255.9 mg<sub>Protein</sub>·g<sup>-1</sup>chitosan) for cheese whey hydrolysis.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase. *Kluyveromyces lactis*. Immobilization. Chitosan. Coconut shell fiber. Cashew bagasse. Cheese whey.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Representação da molécula de lactose.....	24
<b>Figura 2 -</b>	Reação de hidrólise enzimática de lactose através do uso de $\beta$ -galactosidase.....	26
<b>Figura 3 -</b>	Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA <i>et al.</i> , 2004)..	29
<b>Figura 4 -</b>	Imobilização de proteínas em suportes aminados pré-ativados com glutaraldeído ( GUISAN, 2006).....	31
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura dos biopolímeros quitosana ( <b>a</b> ), quitina ( <b>b</b> ) e celulose ( <b>c</b> ).....	34
<b>Figura 6 -</b>	Reação de ativação entre quitosana e glutaraldeído ( <b>A</b> ) e epícloridrina ( <b>B</b> ) (VIEIRA, 2009).....	37
<b>Figura 7 -</b>	Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 2,5% (m/v).....	44
<b>Figura 8 -</b>	Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 2,0% (m/v) seguida de ativação com glutaraldeído 0,8%, epícloridrina e/ou glicidol, ambos 3,2%, ( $V_{ativador}/V_{reator}$ ). (BUDRIENE <i>et al.</i> , 2005; VIEIRA, 2009).....	45
<b>Figura 9 -</b>	Fluxograma do processo de obtenção da fibra de casca de coco verde (BRÍGIDA, 2010).....	48
<b>Figura 10 -</b>	Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos suportes preparados.....	49
<b>Figura 11 -</b>	Ativação de suportes tratados com dimetilformamida.....	50
<b>Figura 12 -</b>	Fluxograma do procedimento de imobilização da enzima em diferentes suportes.....	51
<b>Figura 13 -</b>	Sistema de eletroforese.....	53
<b>Figura 14 -</b>	Representação do sistema descontínuo para produção de galactose e glicose.....	55
<b>Figura 15 -</b>	Representação do sistema contínuo para produção de galactose e glicose.....	56
<b>Figura 16 -</b>	Estabilidade térmica de $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> solúvel a 37°C.....	73
<b>Figura 17 -</b>	Estabilidade operacional de $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,5% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT <sub>GLU1</sub> ) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> . Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,5g.....	75
<b>Figura 18 -</b>	Estabilidade operacional de $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT <sub>GLU2</sub> ) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,31g.....	76

<b>Figura 19</b> - Estabilidade operacional de $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com epicloridrina (QUIT <sub>EPI</sub> ) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> . Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,36g.....	78
<b>Figura 20</b> - Estabilidade operacional de $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com glicidol (QUIT <sub>GLI</sub> ) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> . Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,32g.....	79
<b>Figura 21</b> - Capacidade máxima de imobilização de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLU1</sub> .....	81
<b>Figura 22</b> - Efetividade de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLU1</sub> .....	82
<b>Figura 23</b> - Capacidade máxima de imobilização de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLU2</sub> .....	83
<b>Figura 24</b> - Efetividade de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLU2</sub> .....	84
<b>Figura 25</b> - Capacidade máxima de imobilização de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>EPI</sub> .....	85
<b>Figura 26</b> - Efetividade de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>EPI</sub> .....	85
<b>Figura 27</b> - Capacidade máxima de imobilização de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLI</sub> .....	86
<b>Figura 28</b> - Efetividade de $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT <sub>GLI</sub> .....	87
<b>Figura 29</b> - Estabilidade operacional de QUIT <sub>GLU2</sub> em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v) com 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D) e 48 h (E) de imobilização. Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> . Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,31; 0,29; 0,31;0,31; 0,32 g, respectivamente.....	89
<b>Figura 30</b> - Efeitos da temperatura na atividade da (■) $\beta$ -galactosidase solúvel e (□) imobilizada por 3 h em quitosana 2,0% ativada com glutaraldeído na hidrólise de lactose 5,0% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> .....	93
<b>Figura 31</b> - Efeitos do pH na atividade da (■) $\beta$ -galactosidase solúvel e (□) imobilizada por 3 h em quitosana 2,0% ativada com glutaraldeído na hidrólise de lactose 5,0% (m/v) a 37°C.....	94
<b>Figura 32</b> - Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com o modelo de (A) Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para $\beta$ -galactosidase solúvel a pH 7,0 e 37°C.....	95

<b>Figura 33 -</b>	Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com o modelo de (A) Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C e ativada com glutaraldeído (QUIT <sub>GLU2</sub> ), a pH 7,0 e 37°C.....	96
<b>Figura 34 -</b>	Estabilidade à estocagem sob refrigeração (10°C) de $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C e ativada com glutaraldeído (QUIT <sub>GLU2</sub> ) em tampão fosfato de potássio pH 7,0 adicionada de 0,1 mM de MnCl <sub>2</sub> e 2 mM de MgCl <sub>2</sub> .....	97
<b>Figura 35 -</b>	Estabilidade operacional de QUIT <sub>GLU2</sub> em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min <sup>-1</sup> de soro de leite 5,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U <sub>LAC</sub> . Derivado de alta carga enzimática – 400 ± 60 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,05 g.....	98
<b>Figura 36 -</b>	Perfil eletroforético da $\beta$ -galactosidase em gel de agarose. (M) marcador de baixa massa molecular; (1) 0,9 mg.mL <sup>-1</sup> ; (2) 1,5 mg.mL <sup>-1</sup> ; (3) 1,9 mg.mL <sup>-1</sup> .....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Composição do soro de queijo doce e ácido (ANTUNES, 2003).....	22
<b>Tabela 2 -</b>	Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns açúcares (ZADOW, 1984).....	24
<b>Tabela 3 -</b>	Classificação dos suportes conforme a composição. Modificado de GUI SAN (2006).....	32
<b>Tabela 4 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com glutaraldeído 5% (v/v) por 3 horas. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	62
<b>Tabela 5 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com glutaraldeído 0,8% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	64
<b>Tabela 6 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com epiclorigrina 3,2% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento.....	67
<b>Tabela 7 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com glicidol 3,2% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	68
<b>Tabela 8 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes tratados com dimetilformamida e ativados com epiclorigrina, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	69
<b>Tabela 9 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase em suportes tratados com dimetilformamida e ativados com glicidol, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	70

<b>Tabela 10 -</b>	Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase incubado por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de $10 \pm 1,5$ mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2 mM MgCl <sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> . Sendo (R <sub>I</sub> ) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>TI</sub> ) atividade teórica de imobilização e (A <sub>ap</sub> ) atividade aparente.....	72
<b>Tabela 11 -</b>	Dados relacionados à variação do tempo de imobilização de $\beta$ -galactosidase em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8% (v/v) coagulados com KOH a 50°C (QUIT <sub>GLU2</sub> ). Carga presente no reator contínuo: 23,7 U <sub>LAC</sub> .....	92
<b>Tabela 12 -</b>	Parâmetros cinéticos do derivado QUIT <sub>GLU2</sub> . Carga presente no reator batelada: 10 U <sub>LAC</sub> . Sendo (V <sub>máx</sub> ) velocidade máxima e (K <sub>m</sub> ) constante de Michaelis-Menten.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>[GLI]</b>	Concentração de glicose, mg.mL <sup>-1</sup>
<b>[P]</b>	Concentração de proteínas no extrato, mg.mL <sup>-1</sup>
<b>A<sub>ap</sub></b>	Atividade aparente do derivado
<b>A<sub>t</sub></b>	Atividade hidrolítica, U.mL <sup>-1</sup>
<b>A<sub>tResidual</sub></b>	Atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização, U <sub>LAC</sub> .mL <sup>-1</sup>
<b>A<sub>t0</sub></b>	Atividade oferecida no início da imobilização, U <sub>LAC</sub> .mL <sup>-1</sup>
<b>A<sub>tDerivado</sub></b>	Atividade hidrolítica aparente do derivado, U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup>
<b>A<sub>TI</sub></b>	Atividade teoricamente imobilizada, mg P.g <sup>-1</sup> suporte
<b>A<sub>tRecuperada</sub></b>	Atividade recuperada, %
<b>A<sub>tTeórica</sub></b>	Atividade teórica, U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup>
<b>BC</b>	Bagaço de caju
<b>CB</b>	Fibra de casca de coco verde bruta
<b>CL</b>	Fibra de casca de coco verde lavada
<b>CO</b>	Fibra de casca de coco verde oxidada
<b>C<sub>Oferecida</sub></b>	Carga enzimática oferecida, mg P.g <sup>-1</sup> suporte
<b>CV</b>	Fibra de casca de coco verde
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten, mM
<b>LAC</b>	Lactose
<b>M<sub>E</sub></b>	Massa de derivado, g
<b>η</b>	Efetividade
<b>QAE</b>	Quitossana-alginato-epoxilado
<b>QUIT-DMF<sub>GLI</sub></b>	Quitossana 2,5 % (m/v) ativada com glicidol
<b>QUIT-DMF<sub>EPI</sub></b>	Quitossana 2,5 % (m/v) ativada com epicloridrina
<b>QUIT<sub>EPI</sub></b>	Quitossana 2,0 % (m/v) ativada com epicloridrina 3,2 % (v/v)
<b>QUIT<sub>GLI</sub></b>	Quitossana 2,0 % (m/v) ativada com glicidol 3,2 % (v/v)
<b>QUIT<sub>GLU1</sub></b>	Quitossana 2,5 % (m/v) ativada com glutaraldeído 5,0 % (v/v)
<b>QUIT<sub>GLU2</sub></b>	Quitossana 2,0 % (m/v) ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v)
<b>RI</b>	Rendimento de imobilização, %
<b>SORL</b>	Soro de leite
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo de meia vida, min ou h
<b>T<sub>H</sub></b>	Tempo de hidrólise, min
<b>V<sub>E</sub></b>	Volume de enzima, mL
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima, mM.min <sup>-1</sup> ou μmol.(mL.min) <sup>-1</sup> ou μmol.(g.min) <sup>-1</sup>
<b>V<sub>T</sub></b>	Volume do reator, mL

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	Leite.....	21
2.2	Queijo.....	21
2.3	Soro de queijo.....	22
2.4	Lactose.....	23
2.5	Enzimas.....	25
2.6	$\beta$ -Galactosidase.....	26
2.7	Imobilização de enzimas.....	28
2.8	Métodos de imobilização.....	29
2.9	Suportes para imobilização.....	32
2.9.1	<i>Quitosana</i> .....	33
2.9.2	<i>Fibra de casca de coco verde</i> .....	35
2.9.3	<i>Bagaço de caju</i> .....	36
2.10	Modificação química do suporte.....	36
2.11	Biorreatores para hidrólise enzimática de lactose.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	Materiais.....	41
3.1.1	<i>Suportes</i> .....	41
3.1.2	<i>Reagentes utilizados para o tratamento dos suportes</i> .....	41
3.1.3	<i>Enzima</i> .....	42
3.1.4	<i>Agentes ativantes</i> .....	42
3.1.5	<i>Substratos</i> .....	42
3.1.6	<i>Reagentes para análise de proteínas e glicose</i> .....	42
3.1.7	<i>Reagentes para eletroforese</i> .....	43
3.2	Métodos.....	43
3.2.1	<i>Preparação de partículas de quitosana 2,5 % (ADRIANO, 2008)</i> .....	43
3.2.2	<i>Preparação de partículas de quitosana 2,0 % seguida de ativação</i> .....	44
3.2.3	<i>Preparação de quitosana-alginato-epoxilado</i> .....	45
3.2.4	<i>Preparação do bagaço de caju</i> .....	46

3.2.4.1	<i>Tratamento ácido</i> .....	46
3.2.4.2	<i>Tratamento básico</i> .....	47
3.2.5	<b>Preparação da fibra de casca de coco verde (BRÍGIDA, 2006; BRÍGIDA, 2010)</b> .....	47
3.2.6	<i>Tratamento da fibra de casca de coco verde</i> .....	48
3.2.7	<i>Ativação dos suportes com glutaraldeído</i> .....	49
3.2.8	<i>Ativação dos suportes tratados com dimetilformamida</i> .....	50
3.2.9	<b>Procedimento de imobilização</b> .....	51
3.2.9.1	<i>Procedimento de imobilização por ligação covalente</i> .....	51
3.2.9.2	<i>Procedimento de imobilização por adsorção em bagaço de caju</i> .....	52
3.2.10	<b>Determinação de proteínas</b> .....	52
3.2.11	<b>Eletroforese SDS-PAGE</b> .....	52
3.2.12	<b>Ensaio de atividade enzimática</b> .....	53
3.2.12.1	<i>Determinação da atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase solúvel</i> .....	53
3.2.12.2	<i>Determinação da atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada</i> .....	54
3.2.13	<b>Estabilidade operacional</b> .....	56
3.2.14	<b>Ensaio de temperatura – atividade enzimática</b> .....	57
3.2.15	<b>Ensaio de pH – atividade enzimática</b> .....	57
3.2.16	<b>Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C</b> .....	58
3.2.17	<b>Determinação de parâmetros de imobilização</b> .....	58
3.2.18	<b>Ensaio de carga máxima e efetividade</b> .....	59
3.2.19	<b>Influência da variação de tempo de imobilização</b> .....	60
3.2.20	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos</b> .....	60
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	61
4.1	<b>Atividade hidrolítica da enzima solúvel</b> .....	61
4.2	<b>Atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glutaraldeído 5% (v/v)</b> .....	61
4.3	<b>Atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glutaraldeído 0,8% (v/v) a 50°C (BUDRIENE <i>et al.</i>, 2005; VIEIRA, 2009)</b> .....	64
4.4	<b>Atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com epícloridrina 3,2% (v/v)</b> .....	66

4.5	Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glicidol 3,2% (v/v).....	67
4.6	Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte tratado com dimetilformamida e ativado com epicloridrina.....	69
4.7	Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte tratado com dimetilformamida e ativado com glicidol.....	70
4.8	Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por adsorção.....	71
4.9	Determinação dos melhores biocatalisadores.....	72
4.10	Estabilidade operacional.....	72
4.10.1	<i>Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLU1</sub></i> .....	74
4.10.2	<i>Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLU2</sub></i> .....	76
4.10.3	<i>Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>EPI</sub></i> .....	77
4.10.4	<i>Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLI</sub></i> .....	79
4.11	Ensaio de carga máxima de imobilização e efetividade.....	80
4.11.1	<i>Carga máxima do derivado QUIT<sub>GLU1</sub></i> .....	80
4.11.2	<i>Carga máxima do derivado QUIT<sub>GLU2</sub></i> .....	83
4.11.3	<i>Carga máxima do derivado QUIT<sub>EPI</sub></i> .....	84
4.11.4	<i>Carga máxima do derivado QUIT<sub>GLI</sub></i> .....	86
4.12	Determinação do melhor biocatalisador.....	88
4.13	Ensaio de variação de tempo de imobilização.....	88
4.14	Ensaio de temperatura – Atividade enzimática.....	92
4.15	Ensaio de pH – Atividade enzimática.....	93
4.16	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	94
4.17	Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C.....	97
4.18	Estabilidade operacional para o derivado QUIT <sub>GLU2</sub> com alta carga em soro de leite.....	98
5	CONCLUSÕES.....	100
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
	ANEXO	114

## 1 – INTRODUÇÃO

O soro de leite é o subproduto principal da indústria de laticínios. Devido ao seu elevado poder poluente o qual possui elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO, em torno de 30 a 60 kg/m<sup>3</sup> (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005), e a dificuldade de sua eliminação, empresas têm buscado alternativas para o reaproveitamento dos componentes do soro, principalmente proteínas e lactose (CARMINATTI, 2001). Desta forma, mostra-se a necessidade de buscar alternativas de utilização da lactose presente no soro de queijo.

A utilização de lactose em produtos alimentícios é limitada por causa de sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e restrição ao consumo deste alimento por pessoas que apresentam intolerância a esse sacarídeo, devido à deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase [E.C. 3.2.1.23] no intestino delgado, responsável pela hidrólise da lactose, que gera os monossacarídeos glicose e galactose (PESELA *et al.*, 2003). Buscando uma forma de contornar estes problemas, o processo de hidrólise da lactose em açúcares possuidores de melhores propriedades físico-químicas e nutricionais, permite a obtenção de produtos de maior interesse industrial.

A grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua purificação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água (MENDES *et al.*, 2011a). Para uso industrial, a utilização de enzimas como matéria-prima não reciclável tem inviabilizado seu uso, pois enzimas têm alto custo. Visando contornar este problema e promover a reutilização destas enzimas, assim como, realizar a aplicação em reatores contínuos, estudos sobre imobilização enzimática (ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009; MENDES *et al.*, 2011a) têm sido realizados.

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (GUISÁN, 2006). Este mecanismo promove diversas vantagens, tais como reutilização do biocatalisador, utilização em processos contínuos, redução do volume de reação, facilidade a cerca do controle operacional, interrupção da reação, maior estabilidade térmica e de pH e fácil separação do produto sem contaminação pelo catalisador.

Seguindo o foco de processos de baixo custo, ressalta-se a utilização de materiais orgânicos de alta disponibilidade e baixo custo para a utilização como suportes para imobilização, citando como exemplos quitosana, fibra de casca de coco verde e bagaço de

caju, os quais são resíduos da indústria pesqueira e agroindústria, sendo o nordeste a região do Brasil com maior incidência destes subprodutos.

O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico (PEREIRA, 1996; ADRIANO, 2008). As principais modificações são realizadas empregando agentes bifuncionais, tais como: epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e outros (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Vários métodos para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase, tais como adsorção, ligação covalente e ligação cruzada entre a enzima, têm sido utilizados. 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 (MENDES *et al.*, 2011a).

A escolha do reator adequado para o derivado depende em maior parte do tipo de imobilização e processo. Assim, diferentes modelos de reatores tais como leito fluidizado, leito fixo, fluxo contínuo e tanque agitado têm sido utilizados para aplicação da  $\beta$ -galactosidase imobilizada para hidrólise de lactose (CARRARA e RUBIOLLO, 1994; JURADO, *et al.*, 2005; HAIDER e HUSAIN, 2009). O reator contínuo de leito fixo permite o uso de biocatalisadores de alta densidade, resultando em alta produtividade. Este reator é preferido em processos que envolvam inibição pelo produto, o que ocorre na hidrólise enzimática da lactose (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

Desta forma, esta dissertação teve como objetivo geral desenvolver derivados de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes orgânicos e protocolos de ativação visando à hidrólise de lactose proveniente do soro de queijo, bem como determinar o melhor derivado para sua aplicação em reator contínuo de leito fixo.

Dentro deste aspecto do objetivo geral, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Produção e avaliação de biocatalisadores preparados de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada covalentemente em quitosana, quitosana-alginato-epoxilado, fibra de casa de coco verde e bagaço de caju.
- Comparação da aplicação da enzima solúvel com a imobilizada.
- Aplicação dos derivados em reator batelada e contínuo de leito fixo.
- Produção de galactose a partir de lactose comercial e soro de leite.
- Agregar valor ao soro de leite.

---

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leite

Considerado o mais nobre dos alimentos, o leite possui composição peculiar, rico em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Ele constitui o alimento essencial dos recém-nascidos para todas as espécies de mamíferos. Seu consumo está indicado para todas as idades da espécie humana e as restrições ao seu uso são limitadas a casos específicos (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

O Brasil possui o maior potencial de crescimento de produção de leite, superando países como Nova Zelândia e Austrália, possibilitando que se torne o grande abastecedor de mercados em expansão como o asiático (FERNANDEZ, 2010). Com este perfil de liderança do mercado mundial na produção de leite, o Brasil demonstra possuir diversas linhas de industrialização e comercialização desta matéria-prima, seja na forma de leite pasteurizado ou UHT (*Ultra High Temperature*), assim como também por meio dos seus derivados, como queijos, iogurtes, requeijões, entre outros. Estatísticas apontam que a industrialização de leite no Brasil, no ano de 2007, foi em sua maioria (34%) voltada para produção de queijos (EMBRAPA, 2012a).

### 2.2 Queijo

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 mil toneladas em 2007 (EMBRAPA, 2012b).

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 consequentemente 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, 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.

### 2.3 Soro de queijo

O soro do queijo/leite é obtido através do processamento do leite para fabricação do queijo, no qual a caseína é insolubilizada no seu ponto isoelétrico pela ação da renina, sendo o líquido remanescente chamado de soro doce. Pode também ser obtido por precipitação ácida, sendo chamado de soro ácido. Os tipos de soro obtidos por esses dois diferentes processos apresentam composições diferentes (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). O soro de queijo doce é obtido pela produção de queijos tipo *cheddar* e coalho, já o soro de queijo ácido pode ser produzido pela fabricação do queijo tipo *cottage* e ricota, por exemplo.

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal do soro de queijo doce e ácido, revelando os nutrientes que os diferem em termos de concentração.

**Tabela 1** Composição do soro de queijo doce e ácido.

Componente	Soro de queijo doce (%)	Soro de queijo ácido (%)
Sólidos totais (ST)	6,4	6,2
Proteína	0,8	0,75
Gordura	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,2
Cinza	0,5	0,8
Ácido láctico	0,05	0,4

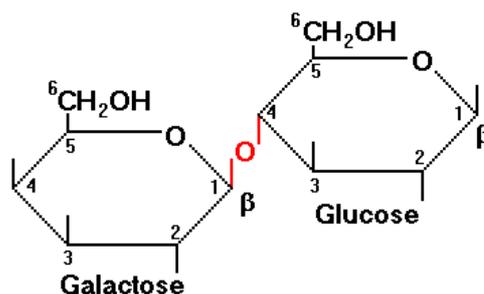
Fonte: ANTUNES, 2003.

De acordo com a Tabela acima, percebe-se que a produção de diferentes tipos de queijo gera soro com concentrações de componentes diferentes, como pode ser verificado para o ácido láctico e gordura, por exemplo. O teor de lactose pode apresentar-se ligeiramente menor no soro de queijo ácido devido à fermentação durante a produção do queijo, sendo consumida.

Um dos principais problemas do rejeito do soro de queijo na indústria de laticínios é o elevado valor de Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO, na faixa de 30 a 60 kg/m<sup>3</sup>, resultante principalmente do alto conteúdo de lactose, a qual representa, geralmente, entre 4 e 8% (m/v) (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005). Por conta da sua alta DBO, buscam-se estratégias para o melhor aproveitamento da lactose e outros, como lipídios, proteínas, presentes no soro. Desta forma, a utilização do soro de queijo tem sido aplicada em produtos de panificação, por exemplo, conferindo ao alimento melhores características organolépticas ao mesmo tempo em que desenvolve o reaproveitamento deste rejeito industrial, como mostrado no estudo de ZAVAREZA *et al.* (2008). Outro meio de aproveitamento deste rejeito é a sua utilização como complemento da alimentação de animais, como mostra o estudo de LOPES *et al.* (2007). Por fim, quando não há aproveitamento deste subproduto, realiza-se seu pré-tratamento para seu despejo em esgoto.

## 2.4 Lactose

Lactose é um açúcar presente no leite de muitos animais. Como pode ser visto na Figura 1, é um dissacarídeo formado por galactose e glicose e é quimicamente definido como *O*-β-D-galactopiranosil-(1-4)-β-D-Glicose, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (GÄNZLE *et al.*, 2008). Conhecido também, como o açúcar do leite, responsável pela doçura presente tanto no leite como no soro.

**Figura 1** – Representação da molécula de lactose

Tanto a solubilidade e doçura da lactose são baixas quando comparada com outros açúcares, sejam eles os produtos de sua hidrólise glicose e galactose, bem como frutose e sacarose (GÄNZLE *et al.*, 2008). Por conta de apresentar estas propriedades organolépticas indesejáveis, como cristalizar-se facilmente por conta de sua solubilidade, não se pode utilizá-la como adoçante, assim como dificulta sua aplicação na elaboração de produtos, tais como bolos e bebidas. A Tabela 2 apresenta valores relacionados ao poder adoçante e solubilidade dos açúcares.

**Tabela 2** – Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns açúcares

Açúcar	Poder adoçante relativo	Solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-Galactose	32	28	36	47
D-Glicose	74	40	54	70
D-Frutose	173	-	82	87

Fonte: ZADOW, 1984.

Outra limitação 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.

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).

## 2.5 Enzimas

As limitações 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 *et al.*, 2007; RANGANATHAN *et al.*, 2008; ANTCZAK *et al.*, 2009; MENDES, 2009).

Enzimas são catalisadores de natureza protéica ou glicoprotéica, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação. Com enzimas, a catálise é realizada em condições brandas e na maioria das vezes em soluções aquosas, sob pressão e temperatura amenas. Essas são algumas características que fazem as enzimas diferenciarem dos catalisadores químicos, sendo a principal delas o seu alto grau de especificidade em relação ao substrato (VIEIRA, 2009).

A especificidade inerente da enzima reside no sítio de ligação do substrato. O sítio ativo é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligações não covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes, na sequência primária, mais próximos do sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária). Algumas enzimas têm outra região na molécula, o sítio alostérico, afastada do sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática (TOSTES, 2006).

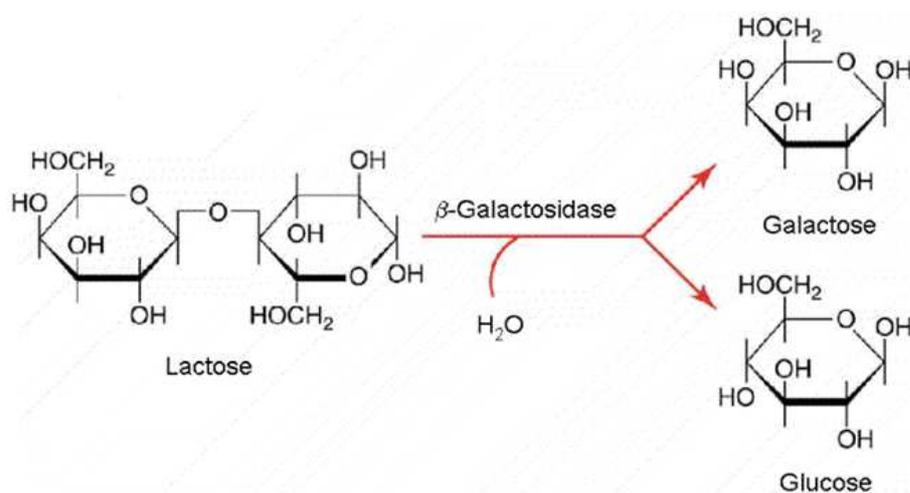
O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos; enzimas técnicas (destinadas principalmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza) e, enzimas empregadas na produção de ração animal. Destes três grupos, destacam-se as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes (HASAN, 2006; MENDES, 2009; MENDES *et al.*, 2011a).

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, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; VIEIRA, 2009; MENDES *et al.*, 2011b; TORRES e BATISTA-VIEIRA; 2012).

## 2.6 $\beta$ -Galactosidase

A enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23),  $\beta$ -D-galactosideo-galactohidrolase, comumente conhecida como lactase, a qual hidrolisa lactose em seus monômeros glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactologossacarídeos, apresenta aplicações potenciais na indústria de processamento de alimentos (TOSTES, 2006; PANESAR *et al.*, 2010).

**Figura 2** – Reação de hidrólise enzimática de lactose através do uso de  $\beta$ -galactosidase



Esta enzima ocorre amplamente na natureza e tem sido isolada de animais, plantas e microorganismos. Comparando as fontes animal e vegetal, a microbiana é produzida com maior facilidade e rendimento, além de ser mais importante tecnologicamente (RUBIO-TEXEIRA, 2006; GROSOVÁ *et al.*, 2008).  $\beta$ -galactosidases microbianas têm uma posição de destaque em termos do seu papel na produção de vários produtos industrialmente relevantes como biossensor, lactose de leite hidrolisada, etanol (ASRAF e GUNASEKARAN, 2010).

Embora as bactérias possam oferecer maior versatilidade, a titulação como GRAS (“Generally Recognized As Safe”, Geralmente Reconhecido como Seguro) de leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, e de fungos como *Aspergillus Níger* e *Aspergillus oryzae*, ainda os coloca entre as fontes favoritas de  $\beta$ -galactosidase para biotecnologia de alimentos e indústria farmacêutica (RUBIO-TEXEIRA, 2006).

Leveduras têm sido consideradas como uma importante fonte de  $\beta$ -galactosidases do ponto de vista industrial. Com pH ótimo neutro, estas são bem adaptadas para hidrólise de lactose do leite e soro doce, e são amplamente aceitos como seguros para uso em alimentos. Muitos trabalhos têm sido realizados sobre a produção de  $\beta$ -galactosidase de diferentes cepas de leveduras pelo seu uso potencial (PANESAR *et al.*, 2010).

A  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* apresenta uma massa molecular de 118 kDa (ZHOU e CHEN, 2001), considerada assim, uma proteína de alta massa molecular. Esta enzima, por sua elevada atividade hidrolítica, tem sido usada para produzir alimentos livre de lactose. Além disso, durante esta hidrólise a produção de galacto-oligossacarídeos via transgalactolização também tem atraído interesse durante os últimos anos (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008). A atividade desta enzima é aumentada pelo magnésio ( $10^{-4}$  M), manganês ( $10^{-4}$  M) e potássio ( $10^{-1}$  M). Concentrações de fosfatos de até  $10^{-2}$  M tem um efeito positivo na estabilidade pois promovem a formação de ligações de cálcio (DSM FOOD SPECIALITIES, 2009; KLEIN, 2010).

No entanto, a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* é fortemente inibida pela alta concentração de cálcio no leite e pequenas concentrações de sódio (TOSTES, 2006). Além disso, a enzima é competitivamente inibida pelo produto, galactose, o que pode levar a uma inibição progressiva da enzima e, portanto, auto limitação da sua eficiência (HU *et al.*, 2010). CAVAILLE e COMBES (1995) citam que a glicose também promove inibição à atividade da enzima, porém não competitiva, sendo ela muito menor que a inibição por galactose.

## 2.7 Imobilização de enzimas

A utilização da enzima livre inicialmente pareceu ser o modelo preferido de produção de leite hidrolisado e ainda é usado atualmente, embora a preparação enzimática não possa ser reutilizada, o que representa uma grande desvantagem econômica (GÄNZLE et al., 2008). Além deste problema, a enzima livre apresenta baixa estabilidade e alto custo quando usada em larga escala. Frente a estas dificuldades, estudos relacionados à imobilização de enzimas têm-se mostrado como boa estratégia para aplicações industriais.

Segundo CHIBATA (1978), enzima imobilizada é definida como a enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada repetida e continuamente.

Enzimas imobilizadas apresentam diversas vantagens (BASSETTI, 1995; KRAJEWSKA, 2004; GUI SAN, 2006; GROSOVÁ *et al.*, 2008. VIEIRA, 2009):

- Facilidade de purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, visto que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação;
- Reutilização do biocatalisador e redução de custos com o processo contínuo;
- Condições de operação mais brandas;
- Maior estabilidade ao pH e temperatura;
- Facilidade na interrupção das reações enzimáticas;
- Redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- Grande variedade de desenhos de reatores com enzimas imobilizadas;
- Redução da inibição;
- Em muitos casos, melhora o desempenho do biocatalisador.

$\beta$ -Galactosidase é uma das enzimas mais estudadas em termos de imobilização, mostrando um papel promissor na redução da inibição pelo produto, o que permite alcançar a valores maiores de conversão de hidrólise de lactose (JURADO *et al.*, 2002; PESSELA *et al.*, 2003). Esta inibição competitiva pelo produto pode ainda ser reduzida com a remoção do produto do meio simultaneamente.

Por outro lado, o processo de imobilização pode promover a redução da atividade enzimática, podendo ser causado por efeitos difusionais, bem como estéricos-

conformacionais, uma vez que a difusão do substrato será diminuída por conta da sua limitação de acesso ao sítio ativo na presença da matriz sólida.

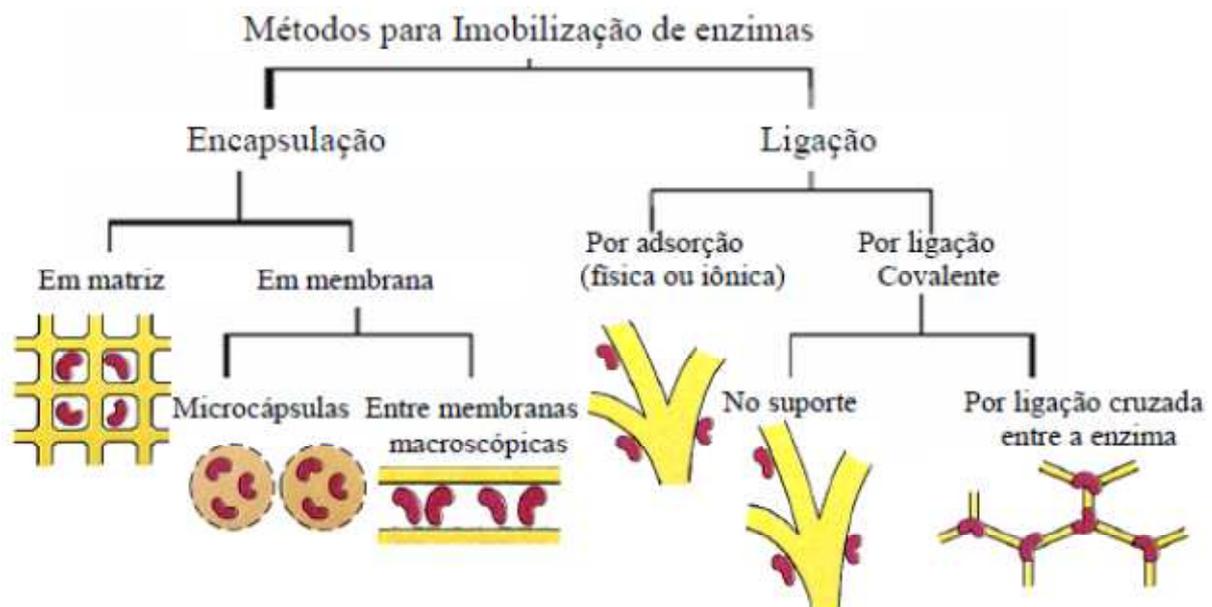
Ocorre também acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, o que pode afetar a cinética de reação, pela redução da velocidade de reação ou alteração do pH no microambiente da enzima (PESSELA et al., 2007).

Para alcançar bons resultados em um processo de imobilização enzimática é importante atentar-se a vários parâmetros a cerca do processo como pureza do substrato e produto desejado livre de enzima, porém, primeiramente é importante estudar a interação de quatro pontos básicos: enzima, suporte para imobilização, agente ativador e metodologia de imobilização.

## 2.8 Métodos de imobilização

Apesar do montante de estudos relacionados às diversas metodologias de imobilização dispostas em trabalhos científicos e patentes, podem-se enquadrar os seguintes métodos básicos citados abaixo na Figura 3.

Figura 3 – Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA et al., 2004)



Fonte: SANTOS (2011).

Uma vez que cada método tem suas vantagens e desvantagens, a escolha do método de imobilização adequada depende da enzima (propriedades diferentes de várias  $\beta$ -galactosidases, tais como massa molecular, comprimento de cadeia de proteínas e a posição do sítio ativo), matriz, condições de reação, reator, etc (TANAKA e KAWAMOTO, 1999; GROSOVÁ *et al.*, 2008).

No método de inclusão ou microencapsulação as enzimas podem ser aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas. Um procedimento comum é preparar a solução contendo a enzima e o material polimérico e na sequência utilizar uma técnica (secagem, polimerização) para coagular o material polimérico contendo a enzima na forma desejada. Em alguns casos, uma etapa de entrecruzamento adicional é necessária para garantir a imobilização (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; KLEIN, 2010). Este método é aplicado a substratos de baixa massa molecular para permitir a livre difusão entre estes e o produto. A maior desvantagem desta técnica é a possível perda de enzima, devido às suas pequenas dimensões moleculares, através da difusão durante repetidos usos, mesmo que a matriz possua pequenos poros (GROSOVÁ *et al.*, 2008). Este método de imobilização pode ser classificado em cinco tipos principais: matriz, microcápsulas, lipossoma, membrana e micela reversa (TANAKA e KAWAMOTO, 1999). Para imobilização de  $\beta$ -galactosidase, o método matriz é o mais amplamente utilizado. A enzima é confinada na matriz de vários polímeros sintéticos ou naturais (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

Em adsorção física as enzimas são imobilizadas à matriz por meio de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, ou interações hidrofóbicas; considerando que em ligação iônica as enzimas são imobilizadas através de ligações salinas. A natureza das forças envolvidas em imobilização não covalente resulta em um processo que pode ser revertido pela mudança das condições que influenciam a força de interação (por exemplo, pH, força iônica, temperatura, ou polaridade do solvente). A imobilização por adsorção é um processo suave e de fácil execução e geralmente preserva a atividade catalítica da enzima. Tais métodos são, portanto, economicamente atrativos, mas pode sofrer problemas, tais como dessorção da enzima da matriz quando as interações são relativamente fracas (GUISAN, 2006).

O método de ligação cruzada ou entrecruzamento utiliza alguns compostos bi ou multifuncionais, os quais servem como reagentes para ligação cruzada intermolecular do biocatalisador (TANAKA e KAWAMOTO, 1999). De acordo com OLIVEIRA (2007) citado por KLEIN (2010), uniões intermoleculares são formadas entre enzimas, gerando ligações

irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. Essas ligações podem ser apenas entre a enzima ou entre a enzima e um segundo composto (chamada co-entrecruzamento). No caso da imobilização de  $\beta$ -galactosidase, a ligação cruzada é frequentemente utilizada em combinação com outros métodos de imobilização, principalmente com adsorção e encapsulação (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

Ligação covalente é o método mais utilizado para imobilização de  $\beta$ -galactosidase (GROSOVÁ *et al.*, 2008). As enzimas são covalentemente ligadas ao suporte através de grupos funcionais em enzimas que não são essenciais para atividade catalítica. Comparada a outras técnicas, este método tem as seguintes vantagens: enzimas não sofrem dessorção ou se desprendem do suporte, o biocatalisador pode interagir facilmente com o substrato, uma vez que está sobre a superfície do suporte. Por outro lado, as principais desvantagens são os altos custos e baixo rendimento de atividade à exposição do biocatalisador a reagentes tóxicos ou condições de reação severas (GROSOVÁ *et al.*, 2008). De acordo com GEKAS e LÓPEZ-LEIVA (1985), o suporte deve possuir grupos livres como hidroxila, carboxila, amida ou amina, ou então deve ser modificado para introdução de tais grupos que devem ser ativados para posterior imobilização da enzima. A Figura 4 representa um modelo de ligação covalente.

**Figura 4** – Imobilização de proteínas em suportes aminados pré-ativados com glutaraldeído



Fonte: GUI SAN, 2006.

## 2.9 Suportes para imobilização

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode estabilizar a enzima imobilizada, de outro, uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade, mas o desempenho global do sistema (MENDES *et al.*, 2011).

Frente à variedade de suportes desenvolvidos e utilizados até os dias atuais enquadrados nas duas categorias (Tabela 3), ressaltam-se os quesitos importantes que um suporte deve apresentar (KELIN, 2010):

- Estabilidade frente aos parâmetros de processo (pH e Temperatura) e ataque microbiano;
- Funcionalidade química;
- Durabilidade e capacidade de reutilização;
- Elevada área superficial e alta porosidade;
- Compatibilidade aceitável com a enzima e substrato;
- Tamanho e forma adequados;
- Custo;
- Facilidade de manuseio.

**Tabela 3** – Classificação dos suportes conforme a composição. Modificado de GUISÁN (2006)

<b>Suportes orgânicos</b>	Polímeros naturais	Polissacarídeos: Agarose, quitosana, alginato e outros
		Proteínas: Colágeno, albumina, carbonos
	Polímeros sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, poliamidas
<b>Suportes inorgânicos</b>	Minerais naturais	Areia, betonita, sílica
	Materiais processados	Vidro (não poroso e poro controlado), metais, óxidos

Os suportes inorgânicos são bastante adequados para imobilização de enzimas, pois permitem maior variação de parâmetros de processo devido a sua maior resistência

química, física, térmica e microbiológica (ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009; KLEIN, 2010). Todavia, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas são obtidas com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” nestes (ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009).

Os suportes 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 *et al.*, 2004; MENDES, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

Dentre os suportes orgânicos naturais em potencial crescente, destacam-se quitosana, fibra de casca de coco verde e bagaço de caju.

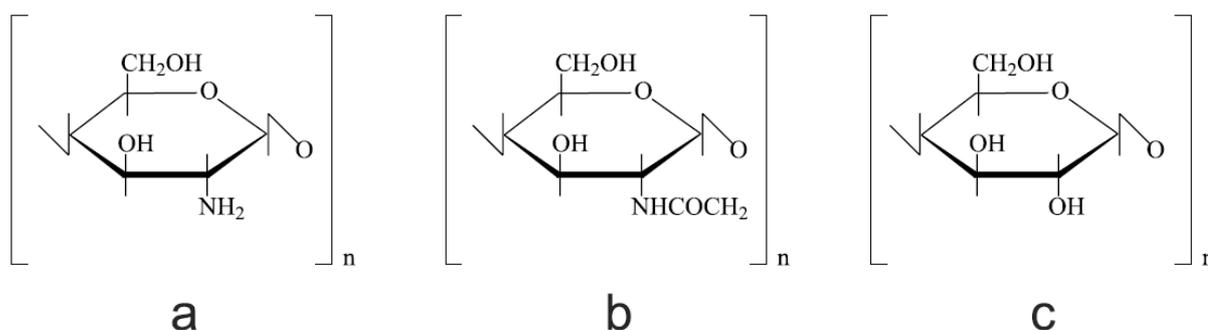
Os suportes podem ainda ser classificados morfológicamente como porosos, não porosos e de estrutura de gel. Os materiais porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Os materiais não porosos eliminam a resistência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (MENDES, 2009). Os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato (ADRIANO, 2008).

### 2.9.1 Quitosana

Quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (GEORGE e ABRAHAM, 2006), diferenciando-se apenas nos grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004), como pode ser visto através da Figura 5. A quitina está presente, por exemplo, em carapaças de crustáceos, tais como, lagosta, caranguejo e

camarão. 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).

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



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. Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH<sub>2</sub>) na estrutura da quitosana. (MENDES *et al.*, 2011).

Quitosana é insolúvel em água, porém na presença de grupos amino torna-se solúvel em soluções ácidas com pH abaixo de 6,5. Quitosana pode ser definida como quitina suficientemente desacetilada para formar sais de amina solúveis, sendo o grau de desacetilação necessário para obter um produto solúvel 80-85% ou maior. Basicamente, o processo consiste na desproteinização do material de cascas e esqueletos de crustáceos com solução de NaOH diluída e descalcificação com solução de HCl diluída. 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).

Devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%), a quitosana é um potente agente geleificante, propriedade que é responsável por muitas aplicações desta em diversos setores de síntese e produção industrial, ou seja, suas propriedades atóxicas e sua fácil formação de géis são de grande interesse industrial (BERGER *et al.*, 2004).

O emprego de quitosana como suporte em imobilizações torna-se uma opção atrativa, por apresentar uma maior afinidade por proteínas que sua precursora, por apresentar um maior número de grupos aminos livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996). No

entanto, a maior quantidade de grupos aminos 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 (ANTHONSEN *et al.*, 1993). Essa propriedade não é desejável, uma vez que diversos meios de produção industrial possuem valores de pH baixos e a insolubilidade do suporte é uma condição imprescindível para o sucesso da aplicação da enzima imobilizada. Assim, 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 (SILVA, 2009).

### 2.9.2 Fibra de casca de coco verde

O aumento na produção e no consumo da água de coco tem gerado cerca de 6,7 milhões de toneladas de casca/ano, acarretando um sério problema ambiental, sobretudo para as grandes cidades, dado que cerca de 80 a 85% do peso bruto do coco verde é considerado lixo (MACHADO *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2010).

Levando-se em conta que a casca de coco verde e seus derivados, são um material rico em micronutrientes, e com propriedades físicas, físico-químicas e químicas de grande interesse para diversas aplicações, é lamentável que atualmente o destino da mesma seja, em sua maioria, os aterros e lixões (BRÍGIDA, 2006).

De modo geral, resíduos agroindustriais vêm sendo progressivamente utilizados como alternativa para minimizar o impacto ambiental por eles provocado (CORREIA *et al.*, 2003). Seguindo esta linha, o reaproveitamento de fibra de casca de coco verde tem fortalecido a preocupação não somente com impactos ambientais, bem como econômicos e sociais.

Estudos (BRÍGIDA, 2006; CHINELATE *et al.*, 2010; BRÍGIDA, 2010; SILVEIRA, 2010) têm demonstrado a eficiência da aplicação deste material como suporte para imobilização de enzimas, agregando valor ao resíduo agroindustrial. Outras vantagens do uso desta matéria-prima como suporte é a sua vasta fonte e assim redução dos custos do processo de produção de biocatalisadores.

### 2.9.3 Bagaço de caju

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de caju e tem o Ceará como o principal estado produtor (PACHECO, 2009). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o Brasil é o quarto maior produtor com 1,6 milhões de toneladas, atrás de Índia (4 milhões), Nigéria (5 milhões) e Vietnã (8,4 milhões), (PINHEIRO *et al.*, 2008).

Quando o pedúnculo é industrialmente processado para a produção do suco, 40% (p/p) de bagaço são produzidos, geralmente rejeitados pela indústria local. Esses fatores tornam o suco e bagaço do caju matérias-primas interessantes e de baixo custo (menos de R\$ 0,25/Kg de pedúnculo) para diversas aplicações potenciais (FERREIRA *et al.*, 2004; MATIAS *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007; CHINELATE *et al.*, 2010).

Neste contexto, o uso de suportes de baixo custo como resíduos agroindustriais surgem como uma opção na redução de custos para a imobilização enzimática. A agroindústria do caju no Nordeste brasileiro desempenha importante função em termos de geração de emprego e renda (SANTOS *et al.*, 2011).

Para sua utilização como suporte para imobilização tanto de microorganismos (PACHECO, 2009; GONDIM, 2010) como de enzimas (CHINELATE *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011), necessita-se proceder com o tratamento com ácido e base para remoção das frações de hemi-celulose e lignina, respectivamente.

Assim como os suportes citados anteriormente, o uso de bagaço de caju para imobilização de enzimas agrega valor a este rejeito da agroindústria, assim como reduz os custos do processo de produção de biocatalisadores, baseado na sua ampla disponibilidade.

## 2.10 Modificação química do suporte

Dado que o desejado é a multiinteração 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

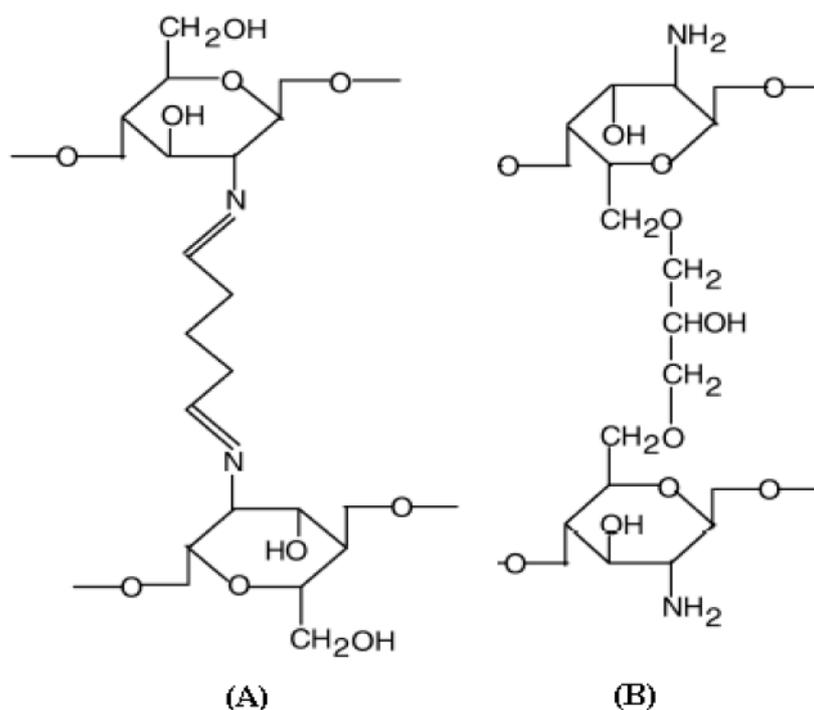
muito reativos e, mesmo sem prévia ativação, atuam como agente nucleofílico contra átomos com carga parcial positiva localizada na superfície do suporte. (ADRIANO, 2008).

As principais modificações químicas em suportes são realizadas utilizando-se agentes bifuncionais, como por exemplo: epícloridrina, glutaraldeído, glicidol (ADRIANO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011), entre outros (Figura 6).

Glutaraldeído é uma pequena molécula com alta reatividade promovendo ligação estável entre grupos amina de suportes e resíduos de amina de proteínas (ELKAOUTIT *et al.*, 2011). A ativação de suportes com glutaraldeído é uma das mais populares técnicas para imobilizar enzimas. A metodologia é bastante simples e eficiente e, em alguns casos, ela permite ainda melhorar a estabilidade enzimática devido às ligações multipontuais ou ligações entre as subunidades da enzima na imobilização. Entretanto, o glutaraldeído deve ser manuseado com cuidado, pois é um composto neurotóxico (BETANCOR *et al.*, 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 serem modificados (GUISAN, 2006).

**Figura 6** – Reação de ativação entre quitosana e glutaraldeído (A) e epícloridrina (B)



Fonte: VIEIRA (2009).

A ligação covalente entre os grupos amino e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura. Diferentes mecanismos são propostos para explicar a reação de glutaraldeído com a quitosana (MENDES, 2009). MONTEIRO Jr E AIROLDI (1999) propuseram o mecanismo como sendo uma interação dos grupos amino livres da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando a Base de Schiff (ligação imina).

Alguns pontos importantes devem ser conhecidos com relação ao uso de glutaraldeído para imobilização de enzimas (GUISAN, 2006):

- O controle do pH é importante. Se o pH é muito alto o glutaraldeído irá se polimerizar e o suporte não irá reagir com a enzima;
- A cor da suspensão é um indicador do estado do glutaraldeído. Se a suspensão está com cor acastanhada o suporte não pode ser utilizado, pois a reação do glutaraldeído está comprometida;
- A baixa força iônica da solução tampão é necessária para a adsorção iônica entre a proteína e o suporte;
- A incubação adicional sob 25°C é necessária para atingir um maior grau de ligação;
- A baixa força iônica da solução tampão de imobilização permite a primeira adsorção iônica da enzima no suporte. Depois desta adsorção, o glutaraldeído pode reagir covalentemente com o grupo amino primário da proteína, deixando a enzima ligada covalentemente ao suporte.

O mecanismo de reação da epícloridrina com quitosana também é bastante similar ao glutaraldeído, no entanto, este agente de reticulação reage preferencialmente com os grupos hidroxilas da quitosana (FANGKANGWANWONG *et al.*, 2006). Estas reações podem ser efetuadas entre grupos hidroxilas de duas moléculas de quitosana (reticulação intermolecular) ou reagir somente com um grupo hidroxila e o grupo epóxido livre seria utilizado para uma determinada reação de interesse (grupo reativo) (MENDES, 2009).

Glicidol apresenta em sua estrutura um anel oxirano e uma hidroxila, diferenciando-se da epícloridrina apenas pelo átomo de cloro que esta apresenta em sua cadeia e por isso sendo mais reativo (ADRIANO, 2008). Glicidol e epícloridrina reagem preferencialmente com os grupos hidroxila, produzindo géis glioxil (MENDES, 2009).

Suportes ativados com glicidol e epocloridrina (gloxil-suportes) não são capazes de promover imobilização de proteínas multipontualmente a pH 7,0 sendo necessário um pH alcalino cerca de 10,0. A pH alcalino, a imobilização acontece mais rapidamente devido à forte concentração de aminoácidos lisina não ionizados. Os grupos epóxidos são muito estáveis e, por isso, a obtenção de suportes contendo uma elevada densidade de tais grupos é absolutamente factível (ADRIANO, 2008).

### 2.11 Biorreatores para hidrólise enzimática de lactose

Como citado anteriormente, enzimas imobilizadas possibilitam sua utilização em reatores contínuos, trazendo com isso diversas vantagens. Assim, alguns reatores são usados para hidrólise enzimática de lactose, como: reator de leito fixo, de leito expandido (fluidizado) e de membrana (ROY e GUPTA, 2003; LI *et al.*, 2007; HAIDER e HUSAIN, 2009).

A escolha do sistema de reator apropriado depende principalmente do tipo de imobilização e do tipo de processo (ROY e GUPTA, 2003), além do que a mecânica e hidrodinâmica do derivado e suporte (GUISAN, 2006).

Reator de leito fixo é uma das melhores opções para sistemas de reação com inibição pelo produto (CARRARA *et al.*, 2003), como ocorre com a enzima  $\beta$ -galactosidase. Sendo muito utilizado, assim, em pesquisas relacionadas à imobilização de enzimas para hidrólise de lactose (NAKKHARAT e HALTRICH, 2007; MARIOTTI *et al.*, 2008; HAIDER e HUSAIN, 2009). Neste reator, as partículas de derivado são mantidas em uma coluna e o substrato é bombeado em uma direção de fluxo. Permite ainda o uso de biocatalisadores de alta densidade, resultando em elevada produtividade volumétrica. Contudo, a principal desvantagem deste reator é que a temperatura e pH não são facilmente controlados, especialmente em reatores com diâmetro menor que 15 cm, pois de acordo com OLIVEIRA *et al.* (2011) ocorrem flutuações aleatórias significativas de temperatura devido às não uniformidades do empacotamento mais pronunciadas quanto menor for a relação diâmetro do leito por diâmetro da partícula. É desejável usar derivados de tamanhos uniformes e em fluxo ascendente de substrato (LILLY e DUNNILL, 1976; GROSOVÁ *et al.*, 2008).

No reator de leito fluidizado, a solução de substrato é alimentada a partir da extremidade inferior da coluna a uma velocidade alta o suficiente para suspender as partículas

de derivado (GUISAN, 2006). As partículas de derivados são geralmente muito pequenas, se sua densidade é suficientemente alta, usam-se outras partículas maiores para impedir que as partículas mais densas saiam do reator. A principal desvantagem do reator de leito fluidizado é a dificuldade de dimensionamento e sua utilização é geralmente restrita para pequena escala de produtos de alto valor (ROY *et al.*, 2000).

Um reator de membrana possui uma membrana imersa em um tanque agitado, por exemplo, membrana de diálise, que contém a enzima (geralmente na forma livre) em uma câmara onde o substrato se move para dentro e o produto se move para fora (GROSOVÁ *et al.*, 2008). Reatores de membrana representam uma tentativa de integrar conversão catalítica, separação e/ou concentração do produto, e recuperação do catalisador em uma única operação (GUISAN, 2006). As principais vantagens deste processo são o funcionamento contínuo do reator a baixa pressão e alta concentração de enzima. Como desvantagem, apresenta necessidade de substituição regular de membranas e limitação de difusão através da membrana (RIOS *et al.*, 2004).

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, apresentam-se os materiais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho assim como a metodologia seguida para síntese dos suportes e análises de atividade hidrolítica. Sendo estes experimentos realizados nos laboratórios do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos – GPBio/DEQ/UFC e no laboratório de Ciências Farmacêuticas CES/UFCG.

#### 3.1 – Materiais

##### 3.1.1 *Suportes*

Foram utilizados como suporte para imobilização: quitosana em pó (grau de desacetilação de 85,9%) adquirido junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará; Fibra de casca de coco verde fornecido pela Embrapa Agroindústria Tropical e Sucos do Brasil S/A e bagaço de caju fornecido pela Embrapa Agroindústria Tropical e Sucos do Brasil S/A.

##### 3.1.2 *Reagentes utilizados para o tratamento dos suportes*

Para tratamento dos suportes, utilizaram-se os seguintes reagentes: ácido clorídrico 37% (m/v) (Vetec/SP), hidróxido de sódio P.A. (Vetec/SP), ácido acético glacial (Vetec/SP), hidróxido de potássio P.A. (Vetec/SP), fosfato de potássio monobásico P.A. (Vetec/SP), fosfato de potássio dibásico P.A. (Vetec/SP), Cloreto de manganês P.A. (Vetec/SP), Cloreto de magnésio P.A. (Vetec/SP), dentre outros reagentes, todos de grau analítico e marcas diversas.

### 3.1.3 Enzima

$\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluveromyces lactis*, Lactozyme<sup>®</sup> 2600 L,  $4491,8 \pm 139 \text{ U}_{\text{LAC}}.\text{mL}^{-1}$  de extrato enzimático ( $179,5 \pm 4,8 \text{ mg}$  de proteína. $\text{mL}^{-1}$  de extrato enzimático), atividade hidrolítica específica foi cerca de  $25,0 \text{ U}_{\text{LAC}}.\text{mg}^{-1}$  de proteína, da marca Sigma Chemical Company (St Louis, MO)

### 3.1.4 Agentes ativantes

Glutaraldeído 25% (v/v) comercializado pela Vetec/SP; glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) e epícloridrina (1-cloro-2,3-epóxido) adquiridos junto a Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

### 3.1.5 Substratos

Utilizaram-se a lactose P.A. (LAC) e soro de leite em pó (74%, m/m) (SORL), marca Alibra/SP, como substratos para as hidrólises enzimáticas do presente estudo.

### 3.1.6 Reagentes para análise de proteínas e glicose

Azul brilhante de Coomassie G 250 da marca Vetec/SP e kit enzimático para determinação de glicose da marca Labtest Diagnóstica S.A.

### **3.1.7 Reagentes para eletroforese**

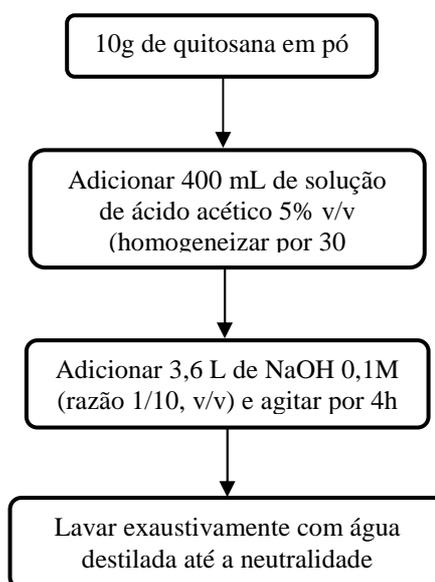
A acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina de soro bovino (BSA), persulfato de amônio, N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED), glicerol e ditiotreitol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Marcador de baixa massa molecular contendo as seguintes proteínas: (Fosforilase-b, Albumina, Ovalbumina, Anidrase carbônica, Inibidor de tripsina e  $\alpha$ -lactoalbumina) foi adquirido da GE Healthcare (EUA). Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Preparação de partículas de quitosana 2,5% (ADRIANO, 2008)**

A Quitosana em pó foi dissolvida em solução de ácido acético 5% v/v. A solução obtida foi homogeneizada por 30 minutos sob agitação mecânica constante. O sistema obtido foi adicionado lentamente à solução de NaOH 0,1M na razão de 1/10 (v/v) e mantido sob agitação moderada durante 4h a temperatura ambiente. Após este procedimento o suporte obtido foi filtrado e lavado exaustivamente com água destilada até a neutralidade, verificada com o uso de indicador de fenolftaleína. O procedimento para obtenção das partículas de quitosana 2,5% (m/v) está esquematizado através da Figura 7.

**Figura 7** - Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 2,5% (m/v)

### 3.2.2 Preparação de partículas de quitosana 2,0 % seguida de ativação

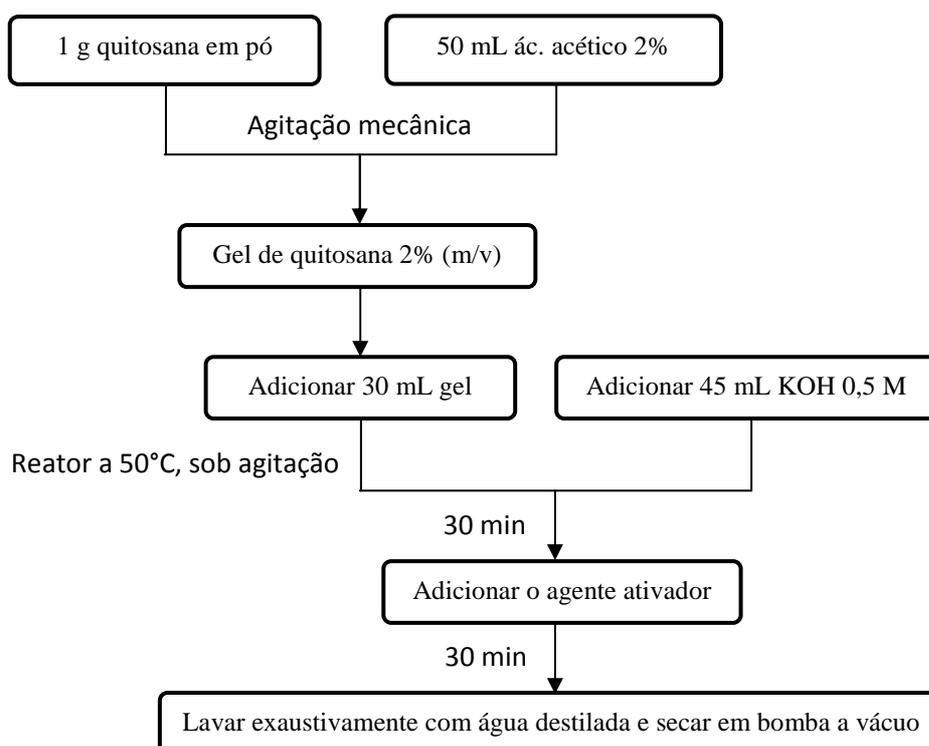
Utilizou-se esta metodologia, de acordo com BUDRIENE *et al.* (2005) e VIEIRA (2009), para preparação de partículas de quitosana 2,0% (m/v) para seguida ativação com três diferentes agentes ativadores: glutaraldeído, epícloridrina e/ou glicidol.

O presente suporte foi obtido a partir de 2,0% (m/v) de quitosana em pó solubilizada em ácido acético 2,0% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos em agitador mecânico sob temperatura ambiente. Posteriormente, 30 mL desta solução preparada foi colocada em reator à temperatura de 50°C e deixado sob agitação magnética alguns minutos para estabilização da solução. Em seguida, adicionaram-se 45 mL de KOH 0,5 M como agente coagulante, mantendo a agitação por mais 30 minutos.

Por seguinte, seguiu-se para ativação deste suporte, adicionando-se glutaraldeído 0,8 % ( $v_{\text{glutaraldeído}}/v_{\text{reator}}$ ) sob a solução de quitosana coagulada com KOH. Após 30 min de ativação sob 50°C as partículas foram lavadas e secas em bomba a vácuo com água destilada em excesso sob temperatura ambiente no intuito de remover o excesso de glutaraldeído.

A Figura 8 ilustra o procedimento para obtenção quitosana 2,0% (m/v).

**Figura 8** - Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 2,0% (m/v) seguida de ativação com glutaraldeído 0,8%, epícloridrina e/ou glicidol, ambos 3,2%, ( $V_{\text{ativador}}/V_{\text{reator}}$ ). (BUDRIENE *et al.*, 2005; VIEIRA, 2009). Observa-se no esquema apresentado a ordem e quantidade na qual os reagentes foram colocados para a realização do ensaio



### 3.2.3 Preparação de quitosana-alginato-epoxilado

Quitosana em pó (10 g) 2,5% (m/v) foi dissolvida em 400 mL de ácido acético 5,0% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica para homogeneização. Adicionaram-se a esta emulsão 40 mL de metanol e 4 mL de anidro acético para acetilação parcial da quitosana e prosseguiu-se com agitação por 1 h. Em seguida, 10 g de alginato de sódio 2,5% (m/v) foram adicionados ao gel o qual foi mantido por agitação por 1 h. Adicionaram-se esta solução aos poucos à 3,6 L de solução de NaOH 0,1 M (razão de 1/10 ( $V_{\text{SolQuitosana}}/V_{\text{NaOH}}$ )) para a formação do gel e mantidos sob moderada agitação mecânica durante 4 h. Lavaram-se exaustivamente o hidrogel com água destilada e o secou com o auxílio de bomba a vácuo.

Para cada 10 g de gel obtido, adicionaram-se 100 mL de dimetilformamida e manteve-se sob agitação mecânica por 30 min a 60°C. Em seguida, adicionaram-se 0,8g de KOH dissolvido em 3 mL de isopropanol e, ao final, 10 mL de epícloridrina, conforme ADRIANO (2008). O sistema foi mantido sob agitação branda por 12 h a 60°C. Após a epoxilação, o gel foi exaustivamente lavado com água destilada e Milli-Q e filtrado a vácuo.

### 3.2.4 *Preparação do bagaço de caju*

O bagaço de caju foi conservado em freezer dividido em vários recipientes até sua utilização.

Realizaram-se o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por DRAGONE *et al.* (2006) para o tratamento do bagaço de malte para produção de cervejas com algumas alterações e semelhante ao tratamento utilizado por PACHECO (2009).

Inicialmente, lavou-se o bagaço com água para retirada de impurezas. Repetiu-se a lavagem por 5 vezes. Em seguida o bagaço foi seco em estufa com recirculação de ar (Tecnal Modelo TE-397/4) a 50°C, posteriormente triturado em liquidificador e estocado a temperatura ambiente. Após ser triturado, o suporte foi submetido ao tratamento ácido e básico.

#### 3.2.4.1 *Tratamento ácido*

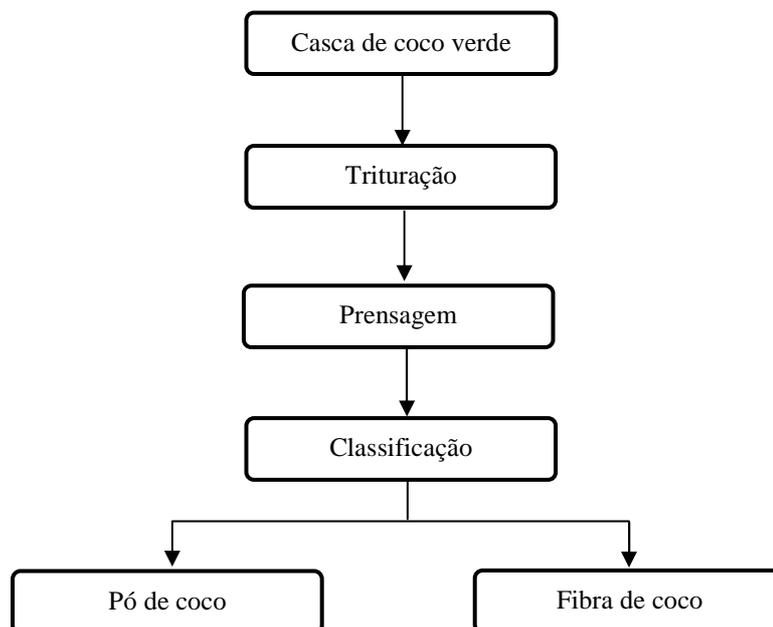
O tratamento ácido consistiu na adição de HCl 3% (v/v), objetivando a remoção da fração de hemicelulose presente no bagaço de caju (PACHECO, 2009). Para cada 100 g de bagaço de caju utilizaram-se 1,5 L de HCl 3% (v/v) em becker de 4L sob agitação constante em banho termostático (Tecnal, TE/0541) a 60 °C por 2,5 horas. Em seguida, o bagaço foi filtrado a vácuo e corrigiu-se o valor do pH utilizando solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 8,0. Posteriormente, lavou-se o bagaço com água na mesma proporção para retirar o excesso do tampão fosfato e depois secou o mesmo a 50 °C em estufa com recirculação de ar.

#### 3.2.4.2 Tratamento básico

O tratamento alcalino promove a deslignificação do bagaço de caju. Esta etapa foi realizada em agitador orbital a 120 rpm e 30 °C por 24 h. O tratamento de deslignificação com NaOH 2,0% (m/v) foi conduzido na mesma proporção utilizada no tratamento ácido, ou seja, para cada 100 g de bagaço utilizaram-se 1,5 L de NaOH 2% (m/v). Posteriormente, filtraram-se o bagaço tratado e ajustaram-se o pH com solução tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4. Em seguida, lavaram-se o material com água destilada, posteriormente secaram-se em estufa com recirculação de ar a 50 °C, trituraram-se em liquidificador e por fim o bagaço de caju foi peneirado em peneiras com diâmetro de poros entre 0,84 e 0,35 mm para obtenção do bagaço no tamanho desejado. A remoção da lignina tem como objetivo expor mais grupos hidrofílicos de carga positiva presentes na celulose (LIANG *et al.*, 2008).

#### 3.2.5 Preparação da fibra de casca de coco verde (BRÍGIDA, 2006; BRÍGIDA, 2010)

O processo de obtenção da fibra, desenvolvidos pela Embrapa Agroindústria Tropical (ROSA *et al.*, 2002), consiste em submeter a casca a trituração (em triturador helicoidal com motor trifásico de 30 HP), seguida de prensagem e classificação (em classificadora com motor trifásico de 5 HP e cilindro classificador que permite obter três frações granulométricas diferentes de pó e uma fração de fibra), de acordo com o fluxograma representado pela Figura 9.

**Figura 9** - Fluxograma do processo de obtenção da fibra de casca de coco verde

Fonte: BRÍGIDA (2010).

Para o presente trabalho, as fibras obtidas pelo processo acima foram selecionadas e cortadas até granulometria de 32 a 35 mesh.

### 3.2.6 Tratamento da fibra de casca de coco verde

A fibra de casca de coco verde foi utilizada de três formas: sem nenhum tratamento (fibra bruta), lavada com água destilada e tratada com peróxido de hidrogênio.

Tais metodologias visaram à remoção de possíveis impurezas, resquícios de pó e sais presentes no suporte, as quais poderiam influenciar na área superficial durante o processo de imobilização da enzima (SILVEIRA, 2010).

Após o processo de obtenção da fibra de casca de coco verde, esta foi utilizada sem qualquer tipo de tratamento, fibra de casca de coco verde bruta, bem como lavada com água destilada e submetida à secagem em bomba a vácuo, fibra de casca de coco verde lavada.

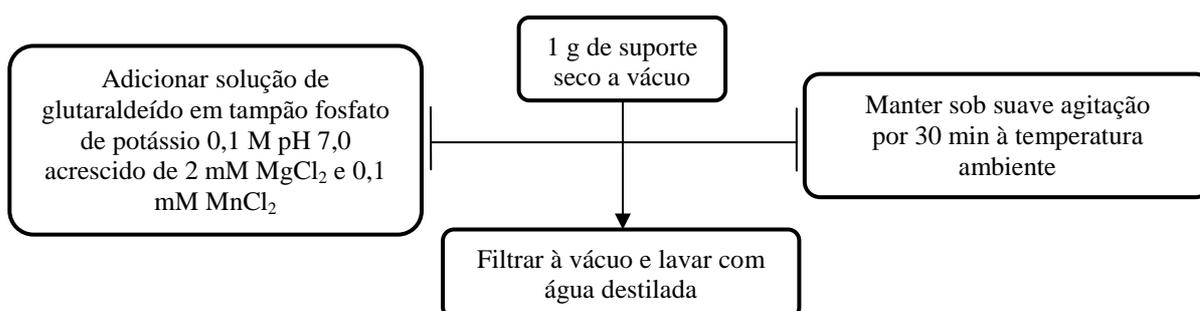
O tratamento da fibra de casca de coco verde com peróxido de hidrogênio teve como objetivo a eliminação de possíveis impurezas presentes e lignina. Trabalhos (SHUKLA e PAI, 2005; BRÍGIDA, 2006; BRÍGIDA 2010; SILVEIRA, 2010) relatam a utilização de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como meio de redução de impurezas, pigmentos, lignina, ceras e ácidos graxos presentes no suporte, o que não é possível com o simples tratamento com água destilada.

Este tratamento foi realizado de acordo com metodologia descrita por SHUKLA e PAI (2005). Para a oxidação da fibra de casca de coco verde, prepararam-se uma solução 12,5 mM NaOH (m/v), assim 18 mL de peróxido de hidrogênio (30%, v/v) foram completados para um volume de 100 mL com esta solução de NaOH. A cada 2 g de fibra, previamente lavada com água destilada, adicionaram-se 40 mL de solução de NaOH com  $H_2O_2$  e deixaram-se em banho Maria a 85°C, sob agitação, por 2 horas. Realizou-se lavagem com 200 mL de água destilada quente (temperatura de aproximadamente 100°C) e, posteriormente, lavagem com água fria (temperatura ambiente) em excesso. Por fim, secou-se em estufa com recirculação de ar a 60°C até peso constante.

### 3.2.7 Ativação dos suportes com glutaraldeído

A ativação dos suportes foi realizada com solução de glutaraldeído 5,0% (v/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 adicionado de 2 mM  $MgCl_2$  e 0,1 mM  $MnCl_2$ , por 30 min a 25°C (razão  $V_{gel}/V_{total}$  de 1/10). Após a ativação, as partículas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído (Figura 10).

**Figura 10** - Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos suportes preparados



### 3.2.8 Ativação dos suportes tratados com dimetilformamida

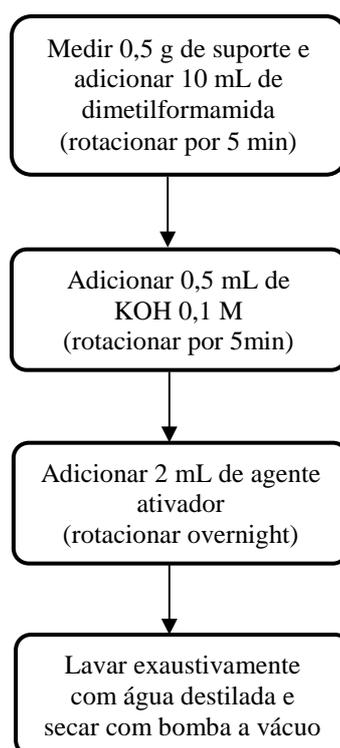
Para esta ativação mediu-se 0,5 g de suporte e o adicionou em tubo de Falcon de 50 mL. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de dimetilformamida e submeteu à agitação rotacional branda sob temperatura ambiente durante 5 min.

Posteriormente, adicionaram-se 0,5 mL de KOH 0,1 M e deixaram-se sob agitação branda novamente 5 min.

Por fim, adicionaram-se 2 mL de epicloridrina ou glicidol, e deixaram-se a mistura sob agitação leve e temperatura ambiente durante aproximadamente 18 h.

Após a ativação, os suportes foram lavados com água destilada para retirar o excesso dos reagentes utilizados (Figura 11).

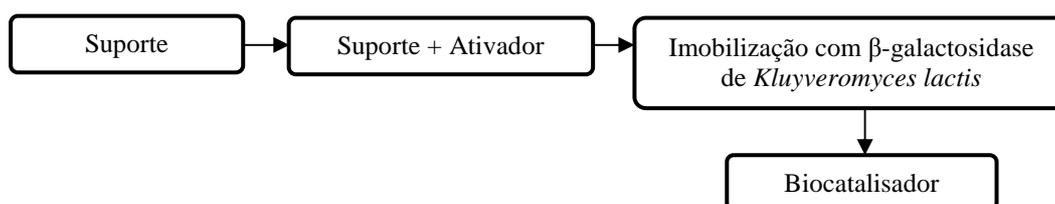
**Figura 11** - Ativação de suportes tratados com dimetilformamida



### 3.2.9 Procedimento de imobilização

Após a preparação e ativação dos suportes, realizou-se o procedimento de imobilização da  $\beta$ -galactosidase, conforme esquematizado na Figura 12.

**Figura 12** - Fluxograma do procedimento de imobilização da enzima em diferentes suportes



Para certificar-se que durante o processo de imobilização a atividade enzimática não decresceria, durante o período de incubação foi acompanhado paralelamente a possível queda de atividade, reservando uma pequena alíquota da solução enzimática utilizada para imobilização e verificada sua atividade hidrolítica seguindo o item 3.2.12.1.

#### 3.2.9.1 Procedimento de imobilização por ligação covalente

$\beta$ -galactosidase (10 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de suporte) foi adicionada em suportes previamente ativados em tampão fostato de potássio 100 mM pH 7,0, adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, razão  $m_{\text{Suporte}}/V_{\text{Sol}}$  de 1/10, incubados por um período de 3 h, sob suave agitação a 25°C. Ao final os derivados obtidos foram lavados com água destilada para eliminação de enzima residual e secos em bomba a vácuo.

Para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase em quitosana 2,0 % (m/m), procedeu-se da mesma maneira, modificando apenas a concentração da solução tampão para 20 mM.

### 3.2.9.2 Procedimento de imobilização por adsorção em bagaço de caju

$\beta$ -galactosidase (10 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de suporte) foi adicionada ao suporte desenvolvido no item 2.2.4 sem ativação em tampão fostato de potássio 100 mM, adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, razão m<sub>suporte</sub>/v<sub>Sol.</sub> de 1/10, incubados por um período de 3 h, sob suave agitação rotacional a 25°C. Ao final os derivados obtidos foram lavado com água destilada para eliminação de enzima residual e secos em bomba a vácuo.

### 3.2.10 Determinação de proteínas

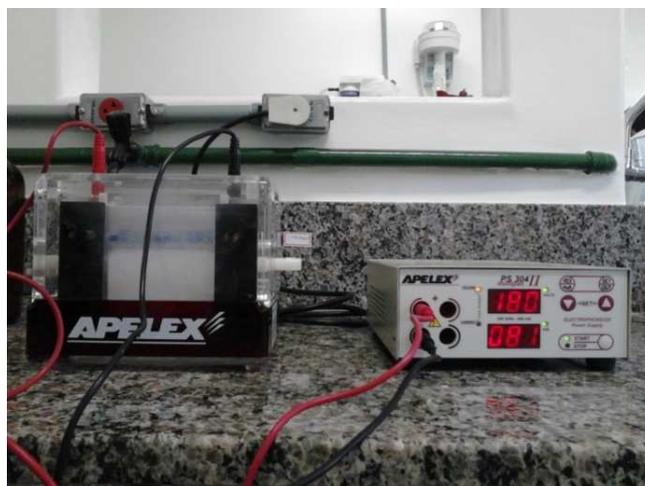
A concentração de proteínas das preparações enzimáticas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando curva de calibração do padrão soro albumina bovina cristalina (BSA) válida em uma faixa de concentração de 0 a 0,6 g. L<sup>-1</sup>.

### 3.2.11 Eletroforese SDS-PAGE

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutora (SDS-PAGE) foi utilizada para determinação da pureza das frações enzimáticas em diferentes concentrações de enzima  $\beta$ -galactosidase (0,9; 1,5; e 1,9 mg de proteína.mL<sup>-1</sup> de extrato enzimático). As análises foram realizadas no equipamento (Fonte PS 1006, Apelex, França) utilizando gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970), na concentração de 7,5%. As diferentes concentrações da enzima foram aquecidas a 100°C por 10 min e alíquotas de 10 a 15  $\mu$ L de cada amostra foram aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com nitrato de prata, conforme MORRISSEY (1981).

A Figura 13 representa o equipamento utilizado para a análise de eletroforese do presente trabalho, indicando a voltagem utilizada (180 V) e a corrente (81 mA).

Figura 13 - Sistema de eletroforese



### 3.2.12 Ensaio de atividade enzimática

#### 3.2.12.1 Determinação da atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase solúvel

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada pela hidrólise da lactose comercial. Na hidrólise da lactose a reação foi conduzida em frascos de vidro de 10 mL contendo 5 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, adicionado de 0,1 mM de  $MnCl_2$  e 2 mM de  $MgCl_2$  sob temperatura de 37°C (TORRES *et al.*, 2006; VIEIRA, 2009), inicialmente por 10 min para termostatização do substrato. Em seguida, adicionaram-se 56  $\mu$ L de amostra previamente diluída (enzima solúvel). A reação foi mantida a 37°C por 10 min, quando da retirada da alíquota a qual teve reação interrompida pelo uso de solução de 0,1M NaOH. A glicose produzida foi quantificada pelo método GOD-PAP utilizando um kit enzimático para dosagem de glicose (TRINDER, 1969).

A atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase foi quantificada através da concentração de glicose ( $g.L^{-1}$ ) formada, quantificada espectrofotometricamente a 550 nm. Para o branco, utilizou-se apenas a lactose 5% (m/v) sem a presença da amostra.

Uma unidade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições descritas acima. A atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At (U_{LAC}/mL) = \frac{[GLI](mg/mL) \times V_T(mL) \times 5,5(\mu mol/mg)}{T_H(min) \times V_E(mL)} \quad (1)$$

sendo [GLI] (concentração de glicose);  $V_T$  (volume do reator);  $T_H$  (tempo de hidrólise);  $V_E$  (volume de enzima) e 5,5 (fator de conversão de mg de glicose para  $\mu\text{mol}$  de glicose) .

### 3.2.12.2 Determinação da atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada

A atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise de lactose de acordo com metodologia modificada de TORRES *et al.* (2006). Mediuse 0,1 g de derivado (enzima imobilizada no suporte) e adicionaram-se em reator batelada a 37°C contendo 5 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 adicionado de 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  sob agitação mecânica suave (VIEIRA, 2009). A Figura 14 apresenta o sistema em batelada para hidrólise de lactose.

A reação foi mantida a 37°C por 10 min, quando da retirada da alíquota da fração solúvel a qual teve reação interrompida pelo uso de solução de 0,1M NaOH. A glicose produzida foi quantificada pelo método GOD-PAP (TRINDER, 1969).

A atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase foi quantificada através concentração de glicose ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) formada, quantificada espectrofotometricamente a 550 nm. Para o branco, utilizou-se apenas a lactose 5% (m/v) sem a presença da amostra.

**Figura 14** - Representação do sistema descontínuo para produção de galactose e glicose. Onde 1: agitador mecânico; 2: reator batelada encamisado contendo o derivado e substrato; 3: banho termostático com recirculação para manutenção da temperatura de reação



Uma unidade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições descritas acima. A atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At_{\text{Derivado}} (U_{\text{LAC}}/g) = \frac{[GLI](mg/mL) \times V_T(mL) \times 5,5(\mu\text{mol}/mg)}{T_H(\text{min}) \times M_E(g)} \quad (2)$$

sendo [GLI] (concentração de glicose);  $V_T$  (volume do reator);  $T_H$  (tempo de hidrólise) e  $M_E$  (Massa de derivado).

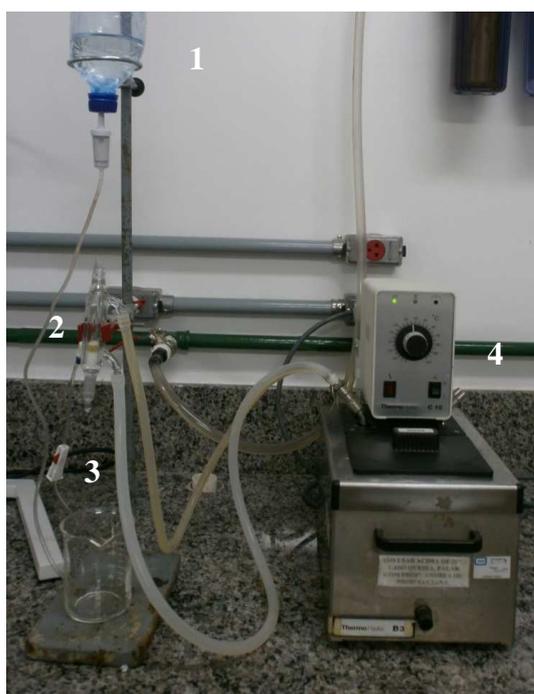
A hidrólise de lactose e soro de leite também foi realizada em reator contínuo, visando a determinação de concentração de glicose produzida.

### 3.2.13 Estabilidade operacional

Com o propósito de aplicar os derivados desenvolvidos no presente trabalho em processos de hidrólise contínua, realizaram-se a estabilidade operacional dos melhores derivados por meio do uso de reator de leito fixo alimentado com solução de lactose 2,0 % (m/v) e de soro de leite com teor lactose de 5,0 % (m/v) em solução tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM, adicionado de 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , sob  $37^\circ\text{C}$  durante 10 horas.

Utilizaram-se baixas (10 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de suporte) e altas cargas de imobilização (400 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de suporte) oferecidas para aplicação destes derivados no reator contínuo de leito fixo. Contudo, para todos os ensaios o reator continha carga enzimática de 23,7 U<sub>LAC</sub> para todos os derivados aplicados, assim como a vazão de operação foi de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. A Figura 15 representa o sistema de reação.

**Figura 15** – Representação do sistema contínuo para produção de galactose e glicose. Onde 1: alimentação de substrato; 2: reator tubular encamisado de leito fixo contendo o derivado e algodão para controle inicial da vazão e como prevenção de perda de biocatalisador; 3: equipo para controle da vazão do substrato 4: Banho termostático com recirculação para manutenção da temperatura de reação



A coluna apresentava as seguintes dimensões: comprimento de 80 mm e diâmetro de 9 mm. A massa de cada derivado estudado variou em função da sua atividade aparente, desta forma, serão citados nos resultados, de modo a apresentar 23,7 U<sub>LAC</sub> no reator.

Alíquotas do produto foram coletadas a cada 30 min e quantificada através da concentração de glicose (g.L<sup>-1</sup>) formada, com o uso do kit enzimático com leitura em espectrofotômetro a 550 nm, sendo cada ponto em triplicata.

Ao final do tempo de reação, 10 h, avaliaram-se a atividade residual deste derivado de acordo com o item 3.2.12.2.

#### ***3.2.14 Ensaios de temperatura – atividade enzimática***

Verificou-se a influência da temperatura sobre a atividade da β-galactosidase solúvel, assim como também imobilizada, através da reação de hidrólise de lactose 5 % (m/v) em tampão fostato de potássio 100 mM pH 7,0, adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, de acordo com os itens 3.2.11.1 e 3.2.11.2, dentro do intervalo de 15 a 70°C.

Atividade relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a uma determinada temperatura e a atividade inicial enzimática máxima.

#### ***3.2.15 Ensaios de pH – atividade enzimática***

Verificaram-se a influência do pH do meio reacional sobre a atividade da β-galactosidase solúvel e imobilizada por meio da hidrólise de lactose 5 % (m/v), a 37°C, em tampão fostato de potássio 100 mM, adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> com diferentes valores de pH, variando de 5,5 a 9,0, de acordo com os itens 3.2.11.1 e 3.2.11.2.

A atividade relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a um determinado pH e a atividade inicial enzimática máxima.

### 3.2.16 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C

A avaliação da interação enzima-suporte foi verificada incubando-se o derivado obtido em solução tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM, adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, conservado em geladeira a 10°C. A cada 30 dias, a atividade do derivado foi medida de acordo com o item 3.2.12.2., sendo este descartado após sua medição.

A escolha do tampão fosfato de potássio e não de sódio é preferível, uma vez que os íons de sódio desfavorecem a atividade da enzima β-galactosidase (VIEIRA, 2009), motivo pelo qual é utilizado como agente (0,1 M NaOH) para interrupção da reação de hidrólise. De acordo com VIEIRA (2009), para hidrólise de lactose através da β-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* este tampão com seus respectivos co-fatores apresentou maior eficiência hidrolítica, frente a outras diferentes concentrações e tampões. Segundo RODRÍGUEZ *et al.* (2006), a presença dos cátions bivalentes Mg<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> estimula a atividade da presente enzima.

### 3.2.17 Determinação dos parâmetros de imobilização

Alíquotas da solução enzimática sobrenadante no início (branco) e ao término da imobilização foram retiradas para a quantificação da atividade hidrolítica inicial e residual. As Equações 3, 4 e 5 foram utilizadas para a realização dos cálculos dos parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização (RI), atividade teórica (At<sub>Teórica</sub>) e atividade de recuperada (At<sub>Recuperada</sub>).

$$RI(\%) = \frac{At_0(U_{LAC} \cdot mL^{-1}) - At_{Residual}(U_{LAC} \cdot mL^{-1})}{At_0(U_{LAC} \cdot mL^{-1})} \times 100 \quad (3)$$

Sendo At<sub>0</sub> (atividade oferecida no início da imobilização, diluída em tampão) e At<sub>Residual</sub> (atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização).

$$At_{Teórica}(U_{LAC} \cdot g^{-1}) = \frac{At_0(U_{LAC} \cdot mL^{-1}) \times C_{Oferecida}(mg \cdot g^{-1})}{[P](mg \cdot mL^{-1})} \times RI \quad (4)$$

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

$$At_{Recuperada}(\%) = \frac{At_{Derivado}(U_{LAC} \cdot g^{-1})}{At_{Teórica}(U_{LAC} \cdot g^{-1})} \times 100 \quad (5)$$

Sendo  $At_{Derivado}$  (Atividade hidrolítica aparente do derivado).

### 3.2.18 Ensaios de carga máxima e efetividade

Ensaios de carga máxima de imobilização e efetividade foram realizados com os melhores derivados obtidos. Empregaram-se cargas enzimáticas de 5 a 400 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de suporte.

Para o cálculo da efetividade ( $\eta$ ) utilizou-se a Equação 6:

$$\eta = \frac{At_{Recuperada}(\%)}{100} \quad (6)$$

Sendo  $At_{Recuperada}$  (Atividade recuperada do derivado).

### ***3.2.19 Influência da variação de tempo de imobilização***

O ensaio de variação de tempo de imobilização visou avaliar a influência do tempo de incubação em relação ao rendimento de imobilização, atividade recuperada e estabilidade operacional do melhor biocatalisador, utilizando tempos entre 3 e 48 h.

### ***3.2.20 Determinação dos parâmetros cinéticos***

Determinaram-se os parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $V_{máx}$ , por meio do ajuste do moldeo de Michaelis-Menten, bem como também o modelo de Lineweaver-Burk aos pontos experimentais. Para tanto, analisaram-se a atividade enzimática frente à variação de concentração de lactose (4 a 8%, m/v), utilizando a mesma carga enzimática para  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada ( $10 U_{LAC}$ ) a  $37^\circ C$ .

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, apresentar-se-ão os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados.

Inicialmente serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos no processo de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suportes desenvolvidos a partir de quitosana, bagaço de caju e fibra de coco verde, tais como rendimento de imobilização e atividade recuperada, assim como também, caracterizações da enzima solúvel. Em seguida, apresentam-se as aplicações dos melhores derivados, com suas devidas aplicações, objetivando dados relacionados à carga máxima, efetividade e estabilidade operacional. Por fim, expõem-se acerca de estudos complementares para o melhor biocatalisador, entre eles, cinética enzimática, tempo de imobilização e estabilidade de estocagem a baixas temperaturas.

### 4.1. Atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, apresentou um valor de  $4491,8 \pm 139,4 \text{ U}_{\text{LAC}}.\text{mL}^{-1}$  de extrato enzimático, determinado em triplicata. Para tal resposta, utilizou-se tampão fosfato 100 mM pH 7,0 adicionado de 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

### 4.2 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glutaraldeído 5% (v/v)

Os suportes preparados foram ativados com glutaraldeído e utilizados para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. Lactis*, de acordo com o item 3.2.9.1, em pH 7,0 e temperatura ambiente. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos relativos aos parâmetros de imobilização para os derivados obtidos.

**Tabela 4** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com glutaraldeído 5% (v/v) por 3 horas. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitosana 2,5% (m/v) (QUIT <sub>GLU1</sub> )	100	13,8	342,1	47,2
Quitosana-Alginato-Epoxilado (QAE)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	19,3	3,6	74,3	2,7
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	37,6	2,4	159,8	3,9
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	59,1	0,8	274,1	2,2
Bagaço de caju (BC)	38,7	2,9	175,0	5,1

Observa-se que o melhor suporte para este tipo de ativação e imobilização foi quitosana 2,5% (m/v) (QUIT<sub>GLU1</sub>), visto o rendimento de imobilização e atividade aparente de 100% e 47,2 U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup>gel, respectivamente. Este 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 enzima, 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. A atividade aparente apresenta este resultado possivelmente por conta do transporte de massa, impedimento estérico, assim como também deformações da enzima durante o processo de imobilização, como verificado em alguns estudos (PESSALA *et al.*, 2007; ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009).

A escolha do tampão fosfato de potássio na presença de sais também favorece o resultado, pois influencia na estabilização da enzima.

Nota-se ainda que o tempo de incubação, 3 h, mostrou-se suficiente para que toda carga enzimática oferecida fosse imobilizada, como observado por VIEIRA (2009), visto que a imobilização de enzimas em suportes ativados com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse reagente ativante (ALONSO, 2005). A escolha do pH 7,0 para imobilização baseia-se no fato deste ser o que apresenta melhores resultados para a enzima solúvel (Ver item 3.15 – melhor pH). Além do que, em pH 7,0 o glutaraldeído e a enzima

formam ligações covalentes devido à reatividade do glutaraldeído, explicando-se assim também a queda da atividade recuperada.

A Tabela 4 ainda nos mostra que a imobilização da  $\beta$ -galactosidase, em mesmas condições, nos suportes fibra de casca de coco verde bruta (CB), fibra de casca de coco lavada (CL), fibra de casca de coco oxidada (CO) e bagaço de caju (BC) não ultrapassou 60% de rendimento de imobilização, sendo o derivado CO o melhor destes, 59,0%, 3 vezes superior ao derivado CB. A ausência de grupos amino nos suportes, oposto ao verificado em quitosana, pode desfavorecer seus resultados com relação à percentual de imobilização e atividade recuperada, assim como também a baixa porosidade e baixa área superficial.

Porém, comparando-se a atividade recuperada destes quatro derivados, percebemos que o CO apresentou o menor valor, 0,8% e que ainda, o derivado com menor percentual de atividade recuperada, CB com 19,3%, atingiu o maior valor para atividade recuperada dentre estes, 3,7%.

O derivado de bagaço de caju (BC) apresentou resultados intermediários, comparado à CV. Também com rendimento de imobilização baixo (38,7%), apresentou atividade aparente, 5,1%, superior à CL, 3,9%. O tratamento básico por meio do uso de hidróxido de sódio, como objetivo de remover a lignina do BC, promove ainda o aumento da possibilidade da enzima penetrar no suporte por conta do aumento da porosidade, e assim realizar sua imobilização, como verificado por (PACHECO, 2009; GONDIM, 2010). Por outro lado, a utilização de NaOH no tratamento básico (item 3.2.4.2) pode ter prejudicado a atividade da enzima, resultando em baixos parâmetros, uma vez que pode ainda haver resíduos deste reagente no suporte por falha operacional, prejudicando sua aplicação com a  $\beta$ -galactosidase, a qual, como dito anteriormente, tem seu desempenho prejudicado na presença de hidróxido de sódio.

Portanto, o tratamento básico e ácido deve ser realizado corretamente para total remoção das porções de lignina e hemi-celulose, diminuindo a rigidez e impermeabilidade da parede celular do BC, além do que o uso de reagentes adequados a cada aplicação de enzima.

Mesmo utilizando tampão fosfato de potássio suplementado com íons de  $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  com pH adequado para  $\beta$ -galactosidase, não se obteve imobilização no suporte quitosana-alginato-epoxilado (QAE), conseqüentemente a atividade aparente do derivado foi nula. A reatividade do suporte pode justificar os baixos parâmetros de imobilização, contudo a utilização de outros agentes ativantes possa resultar melhores respostas. Assim, conclui-se que

esta metodologia de ativação e imobilização não se mostrou aplicável para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

VIEIRA (2009) realizou imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em QAE e obteve baixos valores para rendimento de imobilização e atividade recuperada. Segundo VIEIRA (2009), o protocolo de imobilização de enzimas em suportes epóxido requer alta força iônica (1 M) para forçar a adsorção hidrofóbica da enzima.

### 4.3 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glutaraldeído 0,8% (v/v) a 50°C (BUDRIENE *et al.*, 2005; VIEIRA, 2009)

A Tabela 5 apresenta os resultados relativos aos parâmetros de imobilização para os derivados obtidos. Os suportes foram preparados a 50°C e seguiu-se a mesma temperatura ao serem ativados com glutaraldeído 0,8% (v/v), por fim utilizou-os para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. Lactis*, de acordo com o item 3.2.9.1, utilizando sob pH 7,0 e temperatura ambiente.

**Tabela 5** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com glutaraldeído 0,8% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitossana 2,0% (m/v) (QUIT <sub>GLU2</sub> )	100	19,2	395,5	76,1
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	0	0	0	0
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

As condições de obtenção dos suportes e ativação para aplicação para imobilização de  $\beta$ -galactosidase adotadas foram baseadas na metodologia de BUDRIENE *et al.* (2005).

VIEIRA (2009) estudou na preparação do suporte a variação do coagulante da quitosana, temperatura de preparação e tempo de imobilização para obtenção de derivado de quitosana 2,0% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>). Assim as melhores condições (rendimento de imobilização e atividade recuperada, 100% para ambos) foram com coagulante 0,5 M KOH, temperatura de 50°C e 3 h de imobilização, justificando-se assim a escolha destes parâmetros no presente trabalho.

Segundo EL-TAHLAWY e HUDSON (2005), hidróxido de potássio é o melhor coagulante alcalino para quitosana, comparado ao hidróxido de sódio e de lítio, uma vez que apresenta a maior taxa de difusão de KOH na quitosana. Desta forma a utilização de KOH para este procedimento (QUIT<sub>GLU2</sub>) pode ter sido um dos fatores para melhores resultados de atividade recuperada e aparente, aliado ao uso de altas temperaturas (50°C), quando comparado aos do QUIT<sub>GLU1</sub>, o qual utilizou NaOH como agente coagulante sob temperatura ambiente.

Porém, como pode ser verificado na Tabela 5, o valor de atividade recuperada não atingiu 100%, mesmo diante da total imobilização da enzima no suporte QUIT<sub>GLU2</sub>. Por outro lado, percebe-se que o método utilizado mostrou melhores resultados quando comparado ao QUIT<sub>GLU1</sub> (Tabela 4), modificado a concentração do suporte, coagulante e sua concentração, além da temperatura superior. O rendimento de imobilização e atividade aparente para QUIT<sub>GLU2</sub> apresentou um acréscimo de 39 e 61%, respectivamente, quando comparado ao QUIT<sub>GLU1</sub>.

Assim como verificado por VIEIRA (2009), uma etapa importante para melhores resultados para esta metodologia é o rápido resfriamento do suporte após sua preparação ser finalizada. Uma vez que o uso de altas temperaturas (50°C) pode gerar o aumento dos diâmetros dos poros para favorecer a eficiência da imobilização, o resfriamento lento pode promover retrocesso, o que provoca o retorno dos diâmetros de poros da quitosana para o tamanho inicial.

Durante a imobilização, efeitos de distorção da estrutura ativa da enzima também podem ter ocorrido, causando má orientação durante o processo de imobilização. A distorção da enzima é consequência da alta reatividade das moléculas de glutaraldeído, reatividade essa

capaz da formação de dímeros, trímeros ou grandes polímeros insaturados alfa e beta entre suas moléculas (MENDES, 2009).

Ao contrário do derivado QUIT<sub>GLU2</sub> (Tabela 5), os derivados CB, CL, CO e BC apresentaram rendimento de imobilização nulo, sugerindo que a metodologia não é aplicável para estes, assim como a variação de temperatura e agente coagulante não proporciona resultados melhores quando comparados aos da Tabela 4, pois nas fibras, por haver baixa área superficial (0,9 m<sup>2</sup>/g) e porosidade (BRÍGIDA 2010), o glutaraldeído pode ter polimerizado sobre a fibra prejudicando uma possível adsorção e ou ligações covalente da enzima sobre esta, como observado na tabela 1. Essa polimerização pode ter sido induzida pela temperatura.

#### **4.4 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com epicloridrina 3,2% (v/v)**

A Tabela 6 mostra que a ativação de quitosana 2,0% (m/v) com epicloridrina (QUIT<sub>EPI</sub>) apresentou um resultado ainda melhor que para QUIT<sub>GLU1</sub> e QUIT<sub>GLU2</sub> apresentados anteriormente. O rendimento de imobilização permaneceu sendo 100%. Com relação à atividade recuperada do derivado o resultado foi superior, 26,6%, comparado aos derivados QUIT<sub>GLU1</sub> e QUIT<sub>GLU2</sub>.

O mecanismo de reação da epicloridrina com quitosana é bastante semelhante ao do glutaraldeído, no entanto, este agente de ativação reage preferencialmente com os grupos hidroxilas da quitosana (MENDES *et al.*, 2011a). Nesta ativação, podem-se gerar grupos epóxidos muito reativos que facilitarão a imobilização da enzima.

**Tabela 6** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes ativados com epícloridrina 3,2% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitosana 2,0% (m/v) (QUIT <sub>EPI</sub> )	100	26,6	247,9	65,9
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	0	0	0	0
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

Ainda de acordo com a Tabela 6, nota-se que, da mesma forma que na Tabela 5, não houve imobilização da enzima nos suportes CB, CL, CO e BC. Mostrando assim, que esta metodologia não é aplicada para estes suportes mesmo modificando o agente ativador. Tais resultados podem ser promovidos pela temperatura e metodologia de ativação dos suportes. Assim como discutido no item anterior, este tipo de suporte possui baixa área superficial e porosidade, e assim como o glutaraldeído, a epícloridrina pode ter polimerizado sobre a fibra prejudicando uma possível adsorção e ou ligações covalente da enzima sobre esta. Essa polimerização pode ter sido induzida pela temperatura.

#### 4.5 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte ativado com glicidol 3,2% (v/v)

Observando-se a Tabela 7, verificamos que a imobilização de  $\beta$ -galactosidase em quitosana 2,0% (m/v) ativado com glicidol (QUIT<sub>GLI</sub>), assim como os derivados de quitosana apresentados anteriormente, apresentou 100% de rendimento de imobilização, o que evidencia que a mudança de agente ativador não desfavoreceu este parâmetro. Com relação à atividade recuperada, este apresentou semelhança com o derivado QUIT<sub>EPI</sub>, 26,6 e 27,2,

respectivamente. Tal comportamento contraria o conceito que define a epícloridrina mais reativa que o glicidol, como verificado por ADRIANO (2008) e RODRIGUES *et al.* (2008), talvez pelo fato da utilização de altas temperaturas no processo de ativação, bem como metodologia de imobilização ou a ausência da oxidação com periodato de sódio para geração de grupos glioxil.

**Tabela 7** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes ativado com glicidol 3,2% (v/v) coagulados com KOH a 50°C, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 20 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitosana 2,0% (m/v) (QUIT <sub>GLI</sub> )	100	27,2	277,7	75,6
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	0	0	0	0
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

Vale ressaltar que, quando comparado com o derivado QUIT<sub>GLU2</sub>, percebemos que este mesmo com uma atividade recuperada menor (19,2%), apresentou valor semelhante para atividade aparente, enquanto para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> foi 76,1 U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup> de gel.

Com relação aos derivados CB, CL, CO e BC, o mesmo resultado se repete como visto nas seções 4.3 e 4.4, apresentando rendimento de imobilização nulo. Assim, a mudança de agente ativador, para estes derivados, não apresentou melhoria. Embasando-se no fato destes tipos de suportes (CB, CL e CO) possuírem baixa área superficial e porosidade (BRÍGIDA, 2010), e assim como o glutaraldeído e epícloridrina, o glicidol pode ter polimerizado sobre a fibra prejudicando uma possível adsorção e ou ligações covalente da enzima sobre esta. Essa polimerização foi possivelmente induzida também pela temperatura ou por conta da ausência da oxidação com periodato de sódio para geração de grupos glioxil.

#### 4.6 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte tratado com dimetilformamida e ativado com epícloridrina

Com a finalidade de deixar a quitosana intumescida e, assim, favorecer a reação pela maior exposição dos grupos funcionais reativos (GARCIA *et al.*, 2008), aplicou-se dimetilformamida (DMF) nos suportes para fase de ativação.

De acordo com a Tabela 8, constatamos que o percentual de rendimento de imobilização decaiu pouco mais de 50% para o derivado de quitosana 2,5% (m/v) (QUIT-DMF<sub>EPI</sub>) quando comparado aos dados obtidos para outros derivados utilizando quitosana como suporte citados anteriormente, uma vez que o DMF pode ter causado uma “barreira” à formação de novos grupos funcionais durante a ativação que favorecesse a imobilização da enzima, ou possivelmente o tempo de imobilização de 3 h para esta metodologia de ativação não tenha sido suficiente.

**Tabela 8** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes tratados com dimetilformamida e ativados com epícloridrina, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitosana 2,5% (m/v) (QUIT-DMF <sub>EPI</sub> )	49	68,1	252,3	171,8
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	0	0	0	0
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

Por outro lado, para este baixo valor de rendimento de imobilização, 49%, apresentou-se uma considerável atividade recuperada, 68,10%, 2,5 vezes maior que QUIT<sub>EPI</sub> (Tabela 6). Ainda para este mesmo derivado, observou-se uma boa atividade aparente, 171,8 U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup> de gel, um aumento de 127% quando também comparado ao derivado QUIT<sub>EPI</sub>. Diante destes resultados para QUIT-DMF<sub>EPI</sub>, esta metodologia aplicada apresenta-se como

ótima alternativa para potencializar tanto a atividade recuperada, assim como a atividade aparente do derivado, promovidos, possivelmente, pela utilização do reagente dimetilformamida. Contudo, o baixo rendimento de imobilização mostra necessidade de melhoramento quanto a este parâmetro, uma vez que, neste caso, 51% da carga enzimática oferecida foi perdida, acarretando custos de perda ao processo.

Os derivados de CB, CL, CO e BC, exibidos na Tabela 8, mostram que mesmo com a modificação da metodologia de ativação mais uma vez, permanece apresentando 0% de imobilização. Estudos relacionados à morfologia, por exemplo, destes materiais poderiam auxiliar no entendimento e desenvolvimento de metodologias que pudessem proporcionar melhores resultados.

#### 4.7 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por ligação covalente em suporte tratado com dimetilformamida e ativado com glicidol

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de imobilização de suportes tratados com dimetilformamida e ativados com glicidol.

**Tabela 9** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes tratados com dimetilformamida e ativados com glicidol, incubados por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

Suporte	RI (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>TI</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	A <sub>ap</sub> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Quitosana 2,5% (m/v) (QUIT-DMF <sub>GLI</sub> )	55	62,5	199,7	124,8
Fibra de casca de coco verde bruta (CB)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco verde lavada (CL)	0	0	0	0
Fibra de casca de coco oxidada (CO)	0	0	0	0
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

Assim, podemos conferir que para este caso o ativador epícloridrina realmente apresenta maior reatividade quando comparado com glicidol. Os dados da Tabela 9 para imobilização de suporte de quitosana 2,5% (m/v) (QUIT-DMF<sub>GLI</sub>) ativados com glicidol mostram que apesar de apresentar rendimento de imobilização de 55%, pouco maior que o derivado QUIT-DMF<sub>EPI</sub> (49%), ainda assim apresenta atividade recuperada inferior, 62,5%, e atividade aparente cerca de 27% inferior, 124,8 U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup> de gel.

Ainda acerca do derivado QUIT-DMF<sub>GLI</sub>, verificamos, ao comparar com a os dados do derivado QUIT<sub>GLI</sub>, que mesmo apresentando metade do valor para rendimento de imobilização, o presente derivado apresentou o dobro de atividade recuperada, assim como atividade aparente 65% maior. Como discutido anteriormente, o DMF pode ter promovido impedimentos para a formação de novos grupos funcionais durante a ativação, os quais favoreceriam a imobilização da  $\beta$ -galactosidase. Todavia, assim como para o derivado QUIT-DMF<sub>EPI</sub>, o rendimento de imobilização baixo demonstra necessidade de melhoria no processo de imobilização, tendo em vista a perda de carga enzimática oferecida de 45% adicionando custos de perda ao processo.

Como já reportado ao longo dos diferentes resultados para derivados de CB, CL, CO e BC, estes não apresenta aplicação tendo em vista o rendimento de imobilização ser 0%. Mostrando que nenhum processo de tratamento de suporte, assim como tipo de ativação e imobilização é satisfatório para o presente estudo. Segundo WASTOWSKI (2009), suportes de matérias celulósicos apresentam baixa reatividade, necessitando de condições bem específicas para então reagirem.

#### 4.8 Atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase imobilizada por adsorção

Como estratégia de estudo, modificou-se o tipo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suporte de bagaço de caju (BC), a qual se deu por adsorção (Tabela 10), ausência da etapa de ativação.

**Tabela 10** Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase incubado por 3 horas sob temperatura ambiente. Carga oferecida de  $10 \pm 1,5$  mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel. Tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>. Sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (A<sub>ap</sub>) atividade aparente

<b>Suporte</b>	<b>RI</b> (%)	<b>A<sub>R</sub></b> (%)	<b>A<sub>TI</sub></b> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)	<b>A<sub>ap</sub></b> (U <sub>LAC</sub> .g <sup>-1</sup> suporte)
Bagaço de caju (BC)	0	0	0	0

A Tabela 10 mostra que tal modificação não promoveu nenhuma modificação dos resultados vistos nas outras metodologias de imobilização, pois o rendimento de imobilização permaneceu nulo.

#### 4.9 Determinação dos melhores biocatalisadores

Dentre os 32 derivados produzidos a partir de diferentes matérias-primas, ativadores e formas de imobilização, obtiveram-se seis biocatalisadores baseados no percentual de imobilização e atividade recuperada, sendo destes (QUIT<sub>GLU1</sub>, QUIT<sub>GLU2</sub>, QUIT<sub>EPI</sub>, QUIT<sub>GLI</sub>, QUIT-DMF<sub>EPI</sub>, QUIT-DMF<sub>GLI</sub>), escolhidos apenas quatro por apresentarem rendimento de imobilização de 100%. Desta forma, prosseguiu-se com estes biocatalisadores para as análises a seguir.

#### 4.10 Estabilidade operacional

Objetivando a aplicação dos biocatalisadores em reatores de sistema contínuo de maior interesse na indústria, realizaram-se testes de estabilidade operacional não em termos de reutilizações por meio de várias bateladas seguidas, mas sim com a aplicação em reator contínuo de leito fixo.

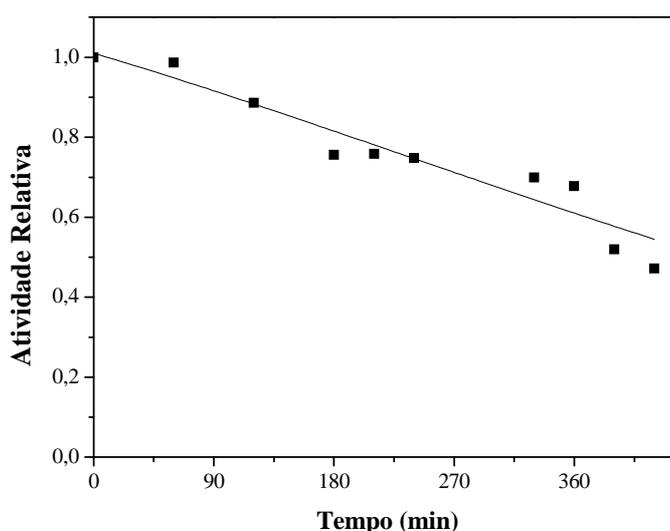
Desta forma, a nível de indústria, promove-se economia ao processo, uma vez que a cada nova batelada dispõem-se gastos de limpeza, além de paralisar a produção por conta desta etapa do processo. Outra falha no processo descontínuo é a perda de massa durante a etapa de lavagem e secagem, etapa eliminada e perda solucionada, aplicando-se regimes contínuos.

Segundo GUIÁN (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, que por sua vez torna o processo de difusão controlado.

Processos que utilizam enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que processos com enzima solúveis, se for possível que o derivado seja capaz de manter atividade enzimática ao longo de um período em reator contínuo.

Objetivando-se determinar o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima solúvel como comparativo ao desempenho do reator contínuo aplicado para estabilidade operacional dos derivados, verificou-se a atividade enzimática relativa desta ao longo de 420 min, como pode ser visto na Figura 16.

**Figura 16** – Estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* solúvel a 37°C. A linha contínua representa o modelo de desativação de primeira ordem



A solução enzimática (enzima solúvel em tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM adicionado de 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>) foi mantida em banho termostático sob 37°C e a cada 30 min realizou-se medida de atividade enzimática com lactose 5,0 % (m/v) como substrato de acordo com o item 3.2.12.1.

Para determinação do t<sub>1/2</sub> utilizou-se a Equação 7 que representa o modelo de desativação de primeira ordem.

$$t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln 2}{k} \quad (7)$$

Observou-se que o t<sub>1/2</sub> foi equivalente a 407,8 min, ou seja, a atividade enzimática decaiu ao longo do tempo até atingir 50%, em menos de 420 min de reação.

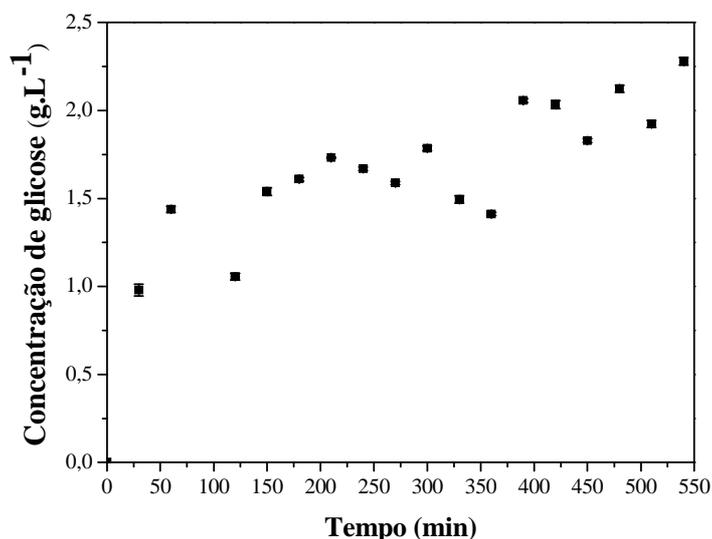
Desta forma, seguiu-se para análises de estabilidade operacional com os derivados Quitosana 2,5% (m/v) ativado com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU1</sub>), Quitosana 2,0% (m/v) ativado com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>), Quitosana 2,0% (m/v) ativado com epiclorigrina (QUIT<sub>EPI</sub>) e Quitosana 2,0% (m/v) ativado com glicidol (QUIT<sub>GLI</sub>).

#### 4.10.1 Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLU1</sub>

Segundo CETINUS e ÖZTOP (2003) a ativação com glutaraldeído confere à quitosana maior resistência mecânica, promovendo o aumento da estabilidade operacional.

Desta forma, a Figura 17 mostra a conversão de lactose 2,0% (m/v) em glicose ao longo de 600 min utilizando QUIT<sub>GLU1</sub> como biocatalisador sob 37°C e vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

**Figura 17** – Estabilidade operacional de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,5% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU1</sub>) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,5g



Verifica-se que empregando 23,7 U<sub>LAC</sub> deste derivado como carga oferecida para o sistema, atinge-se uma concentração máxima de 2,3 g.L<sup>-1</sup>, em um intervalo de 600 min, representando uma conversão de até 16% do substrato em glicose.

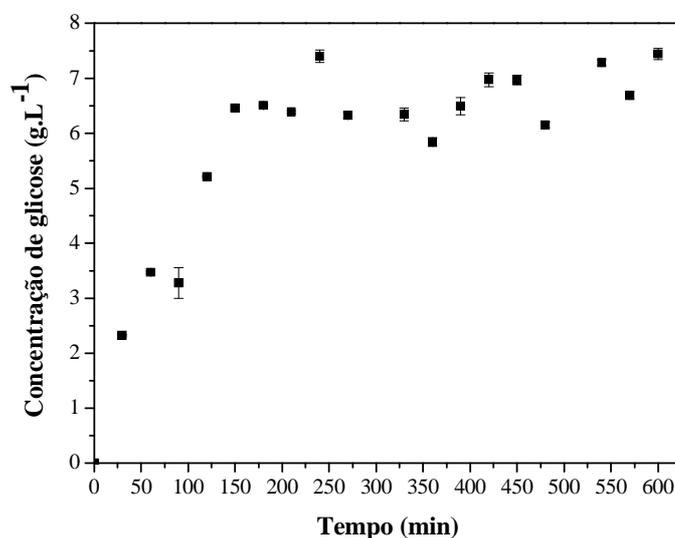
HAIDER e HUSAIN (2009) realizaram estudos comparativos para variação de vazão (0,16, 0,33 e 0,5 mL.min<sup>-1</sup>) de lactose frente ao percentual de conversão em glicose para  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de sódio (ativado com glutaraldeído) em reator de leito fixo, sem recirculação do substrato, utilizando altas cargas (1525 U<sub>LAC</sub>) sob temperatura ambiente. Desta forma, verificou-se então que quanto menor a vazão e maior a carga do derivado, maior a taxa de conversão do substrato em produto, atingindo em torno de 91 % após 5 dias de reação, ou seja, tempo de residência aliado à alta carga enzimática.

Ao final da reação, recolheu-se o derivado e mediu-se sua atividade residual (U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup>), a qual decaiu 86% comparada à atividade inicial, antes de ser adicionado ao reator contínuo, mostrando que mesmo com a queda de atividade aparente do derivado, ele ainda pode promover uma conversão contínua de lactose.

#### 4.10.2 Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLU2</sub>

A Figura 18 mostra a conversão de lactose 2,0 % (m/v) em glicose ao longo de 600 min utilizando QUIT<sub>GLU2</sub> como biocatalisador sob 37°C e vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

**Figura 18** – Estabilidade operacional de β-galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,31g



Comparando com a Figura 17, pode-se verificar o aumento de conversão de lactose em glicose, uma vez que o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> apresenta como formação máxima de produto 7,4 g.L<sup>-1</sup>, equivalendo a 37% de conversão, no tempo de 600 min utilizando uma carga de 23,7 U<sub>LAC</sub>.

Ainda de acordo com a Figura 18, evidencia-se o provável comportamento de constância de conversão em produto, visto que a partir de 150 min, a produção de glicose estabeleceu-se na faixa de 6,5 e 7,5 g.L<sup>-1</sup>, assim como também não apresentou queda de produção, mesmo com o decorrer de 600 min.

A metodologia de ativação assim como de imobilização pode ter influenciado diretamente nestes resultados, mostrando-se assim, um derivado de boa aplicação. Possivelmente ocorreram diminuições de problemas difusionais tendo em vista o grande

aumento da concentração de glicose, corroborando os resultados obtidos para atividade recuperada e aparente (Tabela 5), os quais foram melhores que os resultados para o  $QUIT_{GLU1}$  (Tabela 4).

GIACOMINI *et al.* (1998) estudaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em diferentes suporte aplicados para um mini reator contínuo sob temperatura ambiente com vazão de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Foram empacotadas cargas de derivados de sílica e agarose de  $5527 U_{LAC}$  e  $859 U_{LAC}$ , respectivamente, obtendo-se conversão de cerca de 90 % e 100% de lactose 5% (m/v) na primeira hora de reação, respectivamente.

Novamente, comprova-se a maior eficiência do sistema frente à utilização da enzima solúvel em regime batelada, uma vez que neste caso o sistema apresenta produção contínua e com baixa variação de glicose, sem apresentar queda em 600 min de reação.

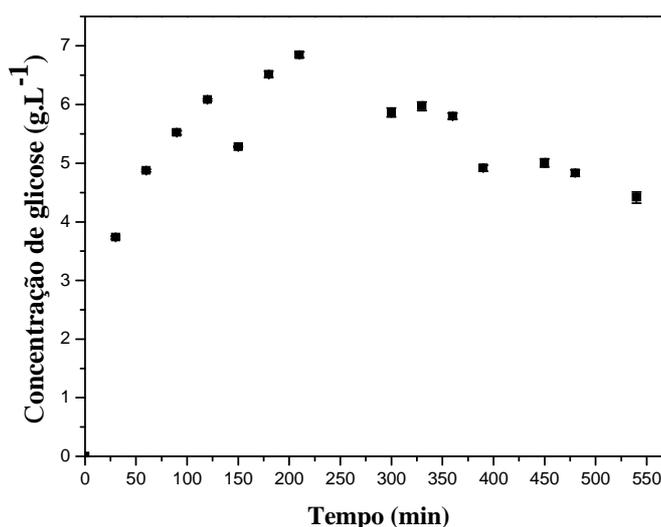
Tais resultados são comprovados mais uma vez por meio da utilização de elevadas cargas enzimáticas oferecidas ao reator, promovendo maiores conversões logo no início do processo.

Assim como realizado no item anterior, observou-se no derivado, após ser submetido ao reator contínuo, uma queda na atividade de 56%, mostrando que mesmo com pouco mais da metade da atividade inicial, o derivado revelou valores de conversão constantes e sem decréscimo, mesmo com 600 min de duração de reação, percentual este inferior ao verificado para o derivado  $QUIT_{GLU1}$ .

#### 4.10.3 Estabilidade operacional do derivado $QUIT_{EPI}$

A Figura 19 revela a conversão de lactose 2,0 % (m/v) em glicose ao longo de 600 min utilizando  $23,7 U_{LAC}$  do derivado  $QUIT_{EPI}$  em reator contínuo encamisado a  $37^\circ\text{C}$  e vazão de  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Figura 19** – Estabilidade operacional de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com epiclorigrina (QUIT<sub>EPI</sub>) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,36g



Percebe-se que a conversão de lactose apresenta seu máximo em 210 min com 32,5% de produção de glicose. Entre o tempo 200 a 300 min, a conversão de lactose decai até valores próximos a 4 g.L<sup>-1</sup> de glicose (510 min). Tal deficiência pode ser justificada por uma baixa interação enzima-substrato, promovido possivelmente por problemas de limitação difusional do suporte. Este comportamento pode gerar dificuldades para o controle do processo de hidrólise de lactose. O derivado em estudo apresenta possivelmente boa porosidade e baixa limitação quando comparado ao QUIT<sub>GLU1</sub> (Figura 17) e similar ao QUIT<sub>GLU2</sub> (Figura 18). Entretanto a estabilidade apresenta-se um pouco mais baixa, uma vez que podem ter ocorrido problemas de interação enzima-suporte após a imobilização, não levando a uma melhor estabilização, ou pode-se considerar ainda a ocorrência de algum tipo de inibição pelo produto, o qual não foi observado nos outros dois ensaios, já que a atividade inicial ainda era de 52%.

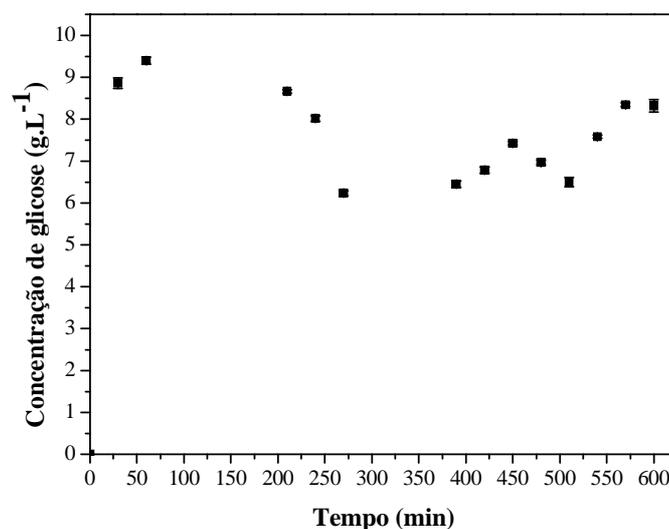
Ao final, verificou-se que 48% de atividade enzimática deste derivado foi perdida quando comparado com o inicial, demonstrando menor perda quando comparado com os derivados QUIT<sub>GLU1</sub> e QUIT<sub>GLU2</sub>. Mesmo diante deste resultado, o derivado QUIT<sub>GLU2</sub>,

mostra-se mais vantajoso visto que apresentou maior estabilidade, assim como também apresentou valores maiores de conversão em glicose.

#### 4.10.4 Estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLI</sub>

A Figura 20 representa a conversão de lactose 2,0 % (m/v) em glicose em um período de 600 min utilizando 23,7 U<sub>LAC</sub> do derivado QUIT<sub>GLI</sub> em reator contínuo encamisado a 37°C e vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

**Figura 20** – Estabilidade operacional de β-galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) ativada com glicidol (QUIT<sub>GLI</sub>) em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,32g



Apesar de apresentar picos de conversão mais elevados, tais como 9,4 g.L<sup>-1</sup> aos 60 min, correspondendo a 47% de conversão do substrato em glicose, a variação da formação de produto oscilou na faixa de aproximadamente 6 a 8 g.L<sup>-1</sup>. Comportamento totalmente contrário ao verificado na Figura 16, onde a enzima solúvel apresentou queda de conversão e atingiu o t<sub>1/2</sub> em menos de 420 min de reação, reforçando assim a boa estabilidade operacional deste derivado, assim como dos derivados QUIT<sub>GLU1</sub>, QUIT<sub>GLU2</sub> e QUIT<sub>EPI</sub>.

Após a utilização deste biocatalisador no reator contínuo, avaliou-se a perda de atividade hidrolítica frente à original, constatando-se uma perda de 55%, próxima a estimada para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub>, o qual apresentou percentuais de conversão semelhantes e o mais importante, de forma constante.

#### 4.11 Ensaios de carga máxima de imobilização e efetividade

Realizaram-se ensaios para investigar a carga máxima de enzima que pode ser imobilizada por massa de suporte, visando sua saturação, preparado por diferentes protocolos de ativação. Segundo MENDES (2009), o protocolo de ativação pode alterar tanto a estrutura da quitosana quanto a concentração de grupos reativos no suporte, afetando, conseqüentemente, o rendimento de imobilização e as propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima imobilizada.

Estudou-se também o parâmetro efetividade ( $\eta$ ), o qual representa a relação entre a atividade aparente ( $A_{ap}$ ) do derivado e a atividade teoricamente imobilizada ( $A_{TI}$ ), avaliando o seu decréscimo de acordo com o aumento da carga enzimática oferecida.

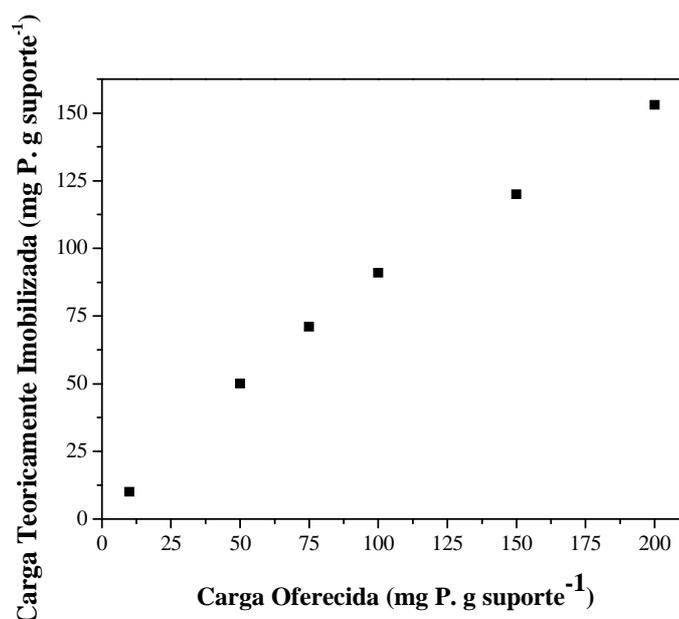
##### 4.11.1 Carga máxima do derivado QUIT<sub>GLU1</sub>

A capacidade máxima de imobilização representa uma das principais propriedades de um suporte. Desta forma, a Figura 21 representa o Gráfico para carga máxima para o suporte quitosana 2,0% (m/v) ativado com glutaraldeído QUIT<sub>GLU1</sub> com carga enzimática oferecida entre 10 e 200 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte.

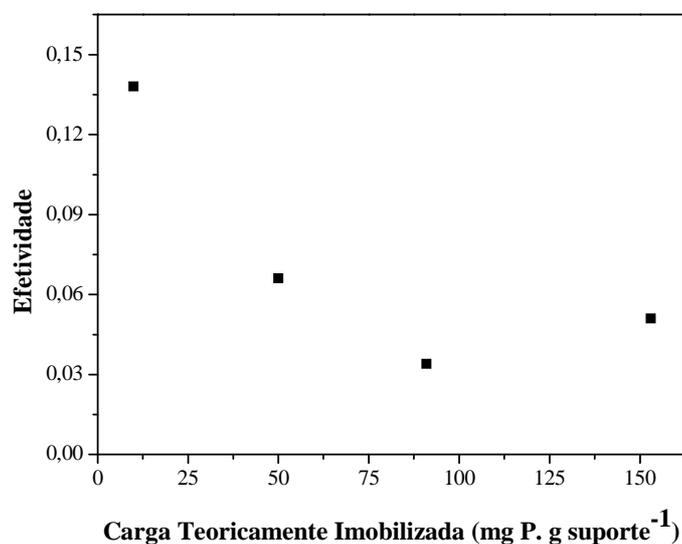
Pode-se verificar que ensaios conduzidos com carregamentos de proteínas até 50 mg.g<sup>-1</sup> de suporte resultou em 100% de imobilização. O máximo resultado de imobilização foi de 153 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte, representando 77% de rendimento de imobilização. Estes resultados mostram que este suporte apresenta alta capacidade de imobilização, a qual não apresentou saturação até carregamentos de 200 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte.

Um fato importante a ser considerado é em relação à alta massa molecular da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, que mesmo assim apresentou derivados com alta concentração de proteína imobilizada.

**Figura 21** – Capacidade máxima de imobilização de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT<sub>GLU1</sub>



A Figura 22 refere-se à efetividade ( $\eta$ ) do derivado, ou seja, relação da atividade aparente do derivado e carga teoricamente imobilizada. Como esperado, a efetividade diminui conforme o aumento da carga enzimática imobilizada. O valor máximo atingido foi de aproximadamente 0,14.

**Figura 22** – Efetividade de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT<sub>GLU1</sub>

GIACOMINI *et al.* (1998), imobilizaram  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em sílica e agarose com 100% de rendimento de imobilização apenas até carregamentos de 12,6 e 1,0 mg P.mL<sup>-1</sup> de suporte.

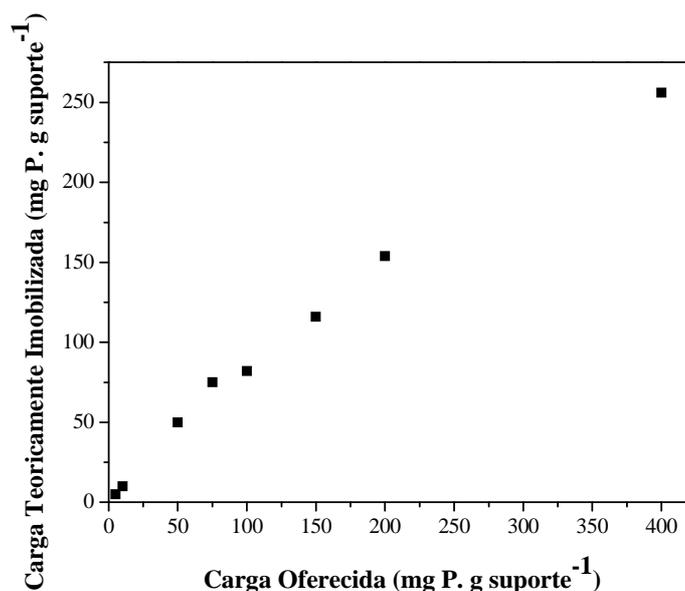
TORRES e BATISTA-VIEIRA (2012) realizaram estudos de carga máxima para  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* em suportes de acrílica, obtendo-se rendimento de imobilização igual a 100% apenas para carga de 3,0 mg P.mL<sup>-1</sup> de gel. Resultado muito inferior ao encontrado no presente estudo, justificado possivelmente pelo diâmetro dos poros do suporte, o qual diminuiu limitações difusionais, a qual só se torna relevante com carregamentos acima de 50 mg P.g<sup>-1</sup> de suporte.

Com o aumento do carregamento da enzima há um aumento da velocidade da reação e redução da difusividade do substrato nos poros do gel, reduzindo a efetividade. Porém, mesmo diante desta queda de efetividade, é compensador pelo fato de haver muita enzima imobilizada, destacando ainda que reatores industriais operam com derivados com alta carga.

#### 4.11.2 Carga máxima do derivado QUIT<sub>GLU2</sub>

A Figura 23 representa o Gráfico para carga máxima para o suporte QUIT<sub>GLU2</sub> com carga enzimática oferecida entre 5 e 400 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte.

**Figura 23** – Capacidade máxima de imobilização de β-galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT<sub>GLU2</sub>



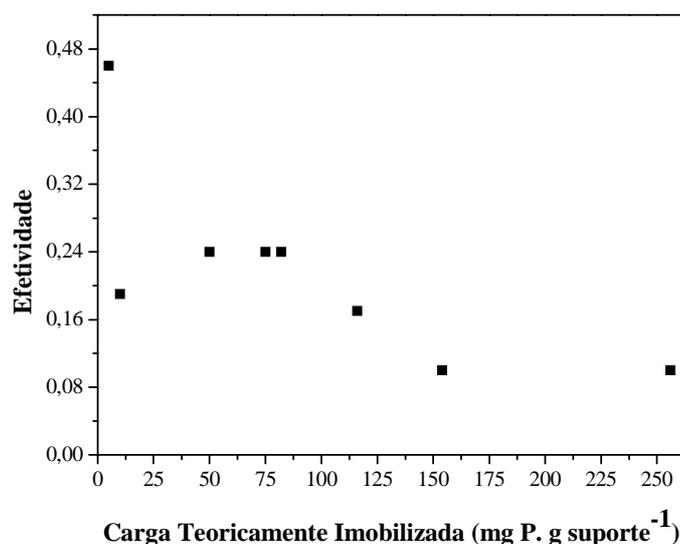
Com a mudança da metodologia de preparação do suporte, pode-se verificar o aumento da capacidade de imobilização, uma vez que comparado com o QUIT<sub>GLU1</sub>, o QUIT<sub>GLU2</sub> apresentou 100% de imobilização até o carregamento de 75 mg P.mg<sup>-1</sup> de suporte. Este resultado pode ter sido promovido pelo uso de altas temperaturas (50°C) desta metodologia, como dito anteriormente, possivelmente promove o aumento do diâmetro dos poros, facilitando a difusão da enzima.

VIEIRA (2009) estudou o aumento da carga enzimática de β-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* com essa mesma metodologia e suporte, obtendo 100% de imobilização até o carregamento de 50 mg P.mg<sup>-1</sup> de quitosana, o que indica que a β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em quitosana ativada por esta metodologia desenvolve derivados com alta concentração de proteína imobilizada e elevada atividade.

A Figura 24 mostra o comportamento esperado para efetividade, ou seja, diminuição da atividade aparente com o aumento da carga teoricamente imobilizada, a qual

atingiu 0,46, valor superior ao verificado para os derivados de  $QUIT_{GLU1}$ , o que reforça mais uma vez que esta metodologia de desenvolvimento de suporte e ativação promove ótimos resultados, quando comparado com outras metodologias, justificado possivelmente pela diminuição dos efeitos difusionais substrato-enzima ocasionado pelo aumento do diâmetro dos poros proporcionado por esta metodologia.

**Figura 24** – Efetividade de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em  $QUIT_{GLU2}$

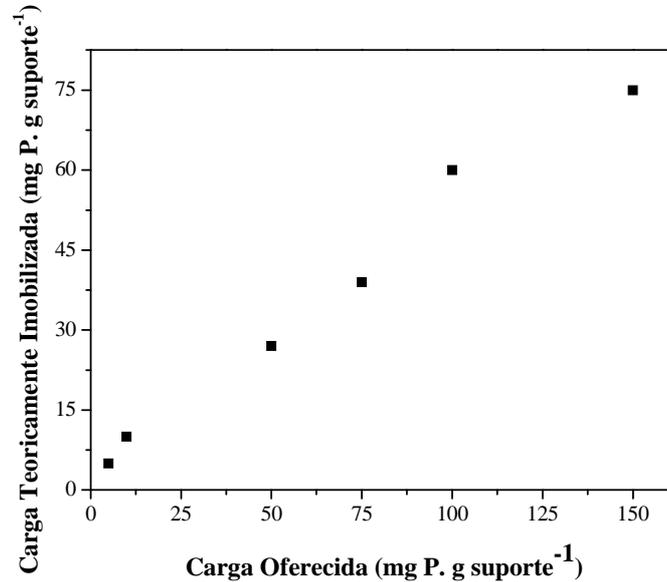


#### 4.11.3 Carga máxima do derivado $QUIT_{EPI}$

O estudo de carga máxima para o suporte  $QUIT_{EPI}$  com concentrações de proteína entre 5 e 150 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte está representado pela Figura 25. Ao contrário dos ensaios anteriores ( $QUIT_{GLU1}$  e  $QUIT_{GLU2}$ ), o presente suporte imobilizou 100% até o carregamento de 10 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte. Para a carga de 50 mg de proteína. g<sup>-1</sup> de suporte,  $QUIT_{EPI}$  apresentou baixo rendimento de imobilização, 54%, demonstrando que o uso de epícloridrina como agente ativador para esta metodologia apresenta resultados inferiores quando comparado ao  $QUIT_{GLU2}$ , gerados possivelmente pela menor expansão do diâmetro dos poros e baixa área superficial, porém, considerando-se sua estabilidade operacional (Figura 14), este ainda é um derivado de boa aplicação.

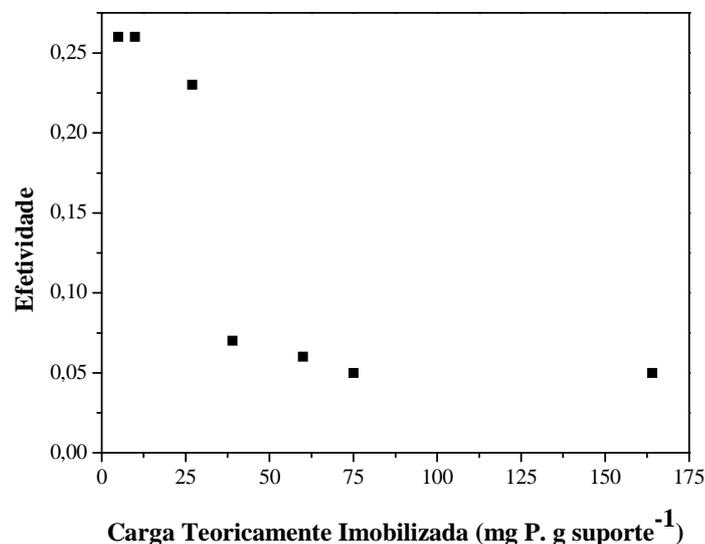
Desta forma a máxima carga imobilizada foi 75 mg de proteína.  $\text{g}^{-1}$  de quitosana.

**Figura 25** – Capacidade máxima de imobilização de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT<sub>EPI</sub>



A Figura 26 representa a efetividade do derivado QUIT<sub>EPI</sub> frente às várias cargas enzimáticas teoricamente imobilizadas. Nota-se que a partir da carga 39 mg de proteína.  $\text{g}^{-1}$  de suporte ocorre uma diminuição brusca da atividade aparente, em torno de 70%, tendendo ao comportamento constante.

**Figura 26** – Efetividade de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em QUIT<sub>EPI</sub>

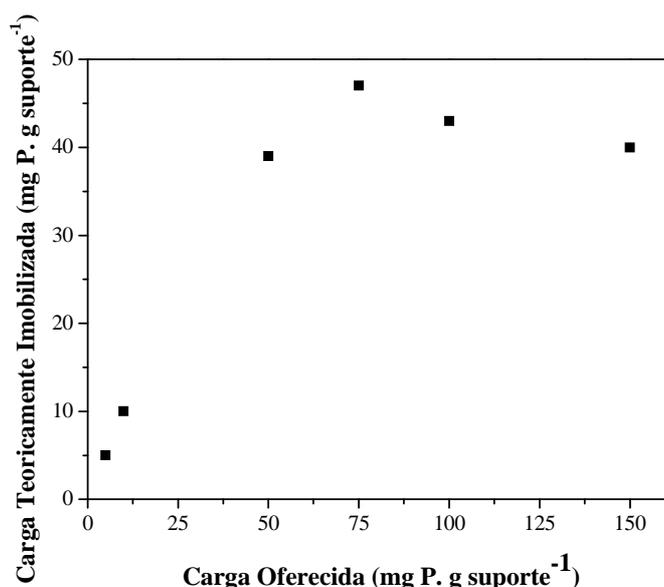


Como esperado, a efetividade tendeu ao decréscimo, atingindo um valor mínimo de aproximadamente 0,5. Seu valor máximo foi em torno de 0,26, o qual se apresentou muito inferior quando comparado ao  $QUIT_{GLU1}$  e  $QUIT_{GLU2}$ . A queda da efetividade está relacionada com a má difusão do substrato nos poros do suporte, proporcionada pelo aumento da carga enzimática oferecida.

#### 4.11.4 Carga máxima do derivado $QUIT_{GLI}$

A Figura 27 representa o estudo de carga máxima para o suporte  $QUIT_{GLI}$  com carga enzimática oferecida entre 5 e 150 mg de proteína.  $g^{-1}$ . Assim como no ensaio anterior ( $QUIT_{EPI}$ ), o presente suporte imobilizou 100% até o carregamento de 10 mg de proteína.  $g^{-1}$  de suporte. Porém, para a carga de 50 mg de proteína.  $g^{-1}$  de suporte,  $QUIT_{GLI}$  apresentou um menor decréscimo do rendimento de imobilização, 79%. Contudo, Este suporte também não apresenta resultados tão promissores quando comparado ao  $QUIT_{GLU2}$ , justificados, possivelmente, pela menor expansão do diâmetro dos poros e baixa área superficial, assim como citado no item anterior.

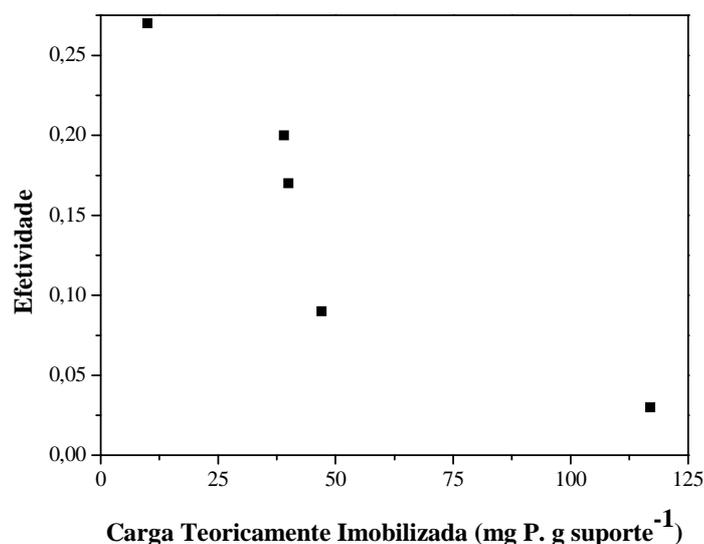
**Figura 27** – Capacidade máxima de imobilização de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em  $QUIT_{GLI}$



A máxima carga imobilizada foi 40 mg de proteína.  $\text{g}^{-1}$  de quitosana. Observando-se ainda que a partir da carga de 50 mg de proteína.  $\text{g}^{-1}$  de suporte inicia-se o comportamento de saturação.

A Figura 28 representa a efetividade do derivado  $\text{QUIT}_{\text{GLI}}$  com relação às várias cargas enzimáticas teoricamente imobilizadas.

**Figura 28** – Efetividade de  $\beta$ -galactosidase teoricamente imobilizada em  $\text{QUIT}_{\text{GLI}}$



A efetividade apresentou seu valor máximo em torno de 0,27, o qual se apresentou muito inferior quando comparado ao  $\text{QUIT}_{\text{GLU1}}$  e  $\text{QUIT}_{\text{GLU2}}$ , e semelhante ao verificado para  $\text{QUIT}_{\text{EPI}}$ , possivelmente também pela ocorrência de restrições difusionais nos poros do suporte, a qual se eleva à medida que o carregamento de enzima no suporte é aumentado. ADRIANO (2008) verificou este mesmo comportamento para o estudo de carga máxima das enzimas quimotripsina e carboxipeptidase A, justificando pela existência de severos efeitos estéricos e/ou conformacionais, devido ao tamanho do substrato.

#### 4.12 Determinação do melhor biocatalisador

Dentre os quatro melhores biocatalisadores submetidos às análises de estabilidade operacional, carga máxima e efetividade, determinou-se o melhor biocatalisador, Quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C ativado com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>), por apresentar resultados superiores, maior estabilidade, maior carga máxima e efetividade, quando comparado aos demais derivados, Quitosana 2,5% (m/v) ativado com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU1</sub>), Quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C ativado com epiclorigrina (QUIT<sub>EPI</sub>) e Quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C ativado com glicidol (QUIT<sub>GLI</sub>). Desta forma, realizaram-se ensaios com este biocatalisador para as análises a seguir.

#### 4.13 Ensaios de variação de tempo de imobilização

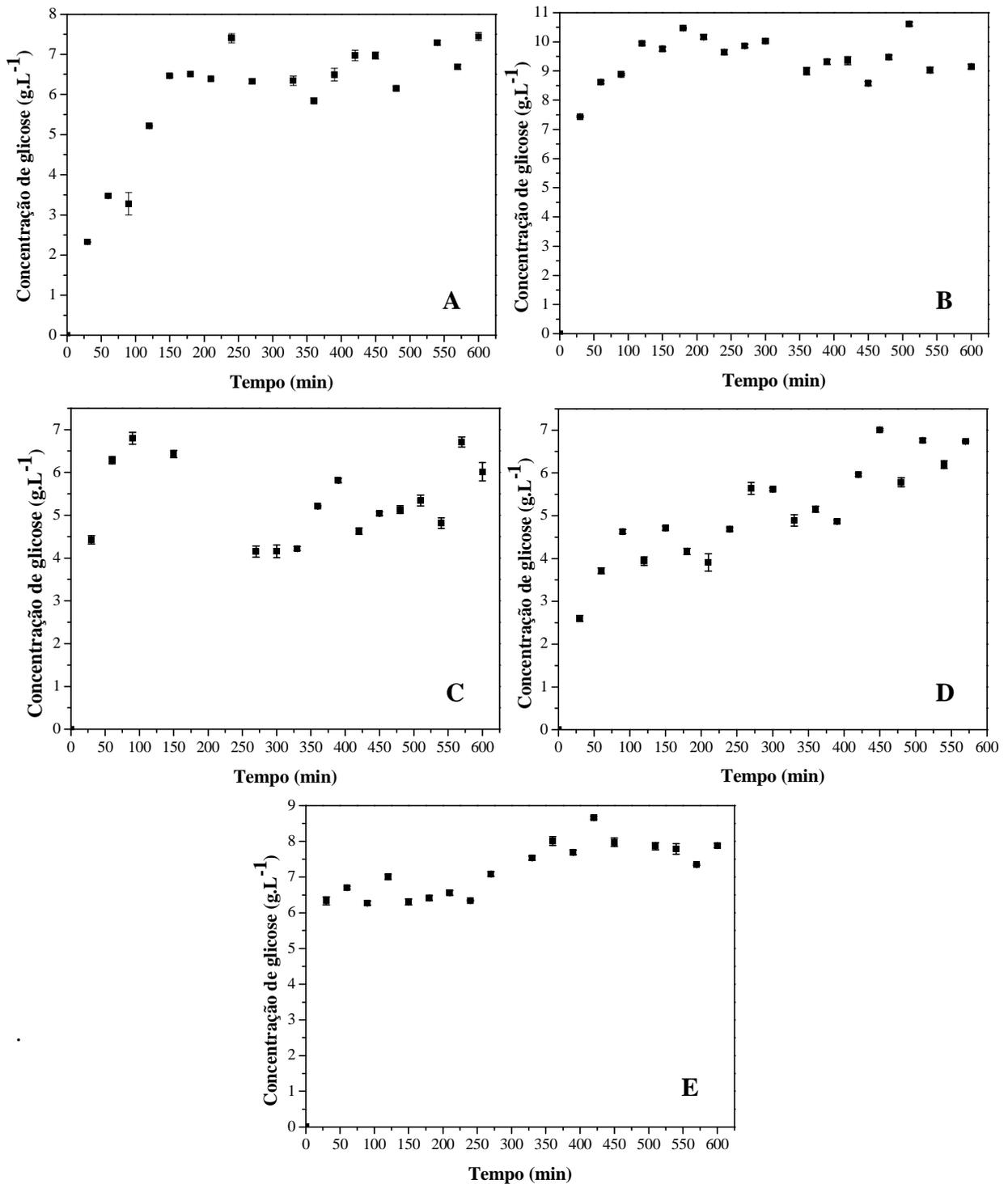
Este estudo objetivou verificar a influência do tempo de imobilização com relação à conversão de lactose em glicose, através do uso de reator contínuo, buscando maior estabilidade operacional. Assim, os tempos de imobilização estudados foram de 3 a 48h.

A Figura 29 representa a estabilidade operacional do derivado QUIT<sub>GLU2</sub> obtido com 3, 6, 12, 24 e 48 horas de imobilização.

Como discutido anteriormente, a conversão de lactose em glicose atingiu seu máximo em 600 min com aproximadamente 7,5 g.L<sup>-1</sup>, variando entre 6,5 e 7,5 g.L<sup>-1</sup> ao longo das 600 min de reação, para 3 h de imobilização, apresentando um comportamento de conversão contínua a partir de 150 min. Percebe-se ainda que a velocidade de reação ocorreu de forma mais lenta no início da reação, visto que apenas a partir de 150 min atingiu-se a média de conversão em glicose.

Ao final do ensaio, o derivado foi recolhido, lavado e avaliado sua atividade enzimática remanescente, a qual foi igual a 44%. Mesmo com um decréscimo de quase 50% de sua atividade hidrolítica, o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> obtido após 180 min de imobilização apresentou boa estabilidade operacional, visto sua contínua hidrólise de substrato, sem apresentar queda de concentração de glicose em 600 min de reação.

**Figura 29** – Estabilidade operacional de QUIT<sub>GLU2</sub> em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de lactose 2,0% (m/v) com 3 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D) e 48 h (E) de imobilização. Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de baixa carga enzimática – 10 ± 1,5 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,31; 0,29; 0,31; 0,31; 0,32 g, respectivamente



Como se pode verificar na Figura 29, com o aumento do tempo de imobilização de 3 para 6 h, a velocidade de conversão ocorre mais rápida, uma vez que em 30 min já se pode visualizar a alta conversão inicial ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), pico máximo visualizado para o tempo de imobilização de 3 h. A concentração de glicose se mantém de forma constante, assim como verificado no tempo de 3 h, porém com concentrações na faixa aproximada de  $8,5$  a  $10,5 \text{ g.L}^{-1}$ , superior ao tempo de imobilização de 3 h.

Segundo PEDROCHE *et al.* (2007), RODRIGUES *et al.* (2008) e MENDES (2009) o tempo de imobilização é uma variável muito importante, pois os enlaces entre grupos reativos da enzima e grupos reativos do suporte é um processo lento, já que a enzima tem que se realinhar para que seus grupos reativos se aproximem do suporte, o que condiz com os resultados. Este processo é mais evidente se tratando de reações reversíveis, ou seja, suportes ativados com glicidol e epícloridrina.

Por fim, verificou-se a atividade enzimática do derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 6 h de imobilização, a qual foi 64% menor que a inicial. Uma perda maior, quando comparado ao tempo de imobilização de 3 h, porém, sua capacidade de conversão de lactose em glicose foi maior. Assim, este derivado apresenta também uma boa estabilidade operacional.

De acordo ainda com a Figura 29, verifica-se a estabilidade operacional para o derivado de QUIT<sub>GLU2</sub> obtido após 12 h de incubação. Comparando com os tempos de incubação de 3 e 6 h, pode-se perceber que a concentração de glicose é inferior. Tal resultado pode ter ocorrido provavelmente por conta de um número excessivo de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, causando a distorção da estrutura protéica da enzima, como verificado por VIEIRA (2009).

A máxima concentração de glicose foi de  $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ , aos 90 min, apresentando uma variação em torno de  $4$  a  $6,5 \text{ g.L}^{-1}$  ao longo dos 600 min do ensaio. Assim como verificado no tempo de 6 h de imobilização, a velocidade da reação dá-se mais rapidamente no início do ensaio, aos 60 min, quando comparado com o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 3 h de imobilização.

Por fim, a atividade remanescente do derivado foi medida e verificou-se que houve perda de 65% da atividade enzimática inicial, semelhante ao derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 6 h de imobilização, porém com concentrações de glicose inferior. Revelando a inviabilidade da utilização do tempo de 12 h para imobilização.

A Figura 29 também representa a estabilidade operacional para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 24 h de imobilização. A concentração de glicose máxima foi de  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$  no tempo 450 min, sendo observado ainda que a formação de produto comportou-se de forma

crescente, levando cerca de 450 min para atingir a concentração de glicose próxima à apresentada no tempo de imobilização 3 h, em 150 min, o que não é interessante, uma vez que se espera alcançar o máximo de conversão em um curto período de tempo.

Assim como verificado para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 12 h de imobilização, 24 h de incubação também resultou em uma perda de 65% da atividade enzimática do derivado, após uso no ensaio de estabilidade operacional. Tal resultado, também pode ter sido promovido por possíveis distorções da estrutura protéica da enzima. Assim, o presente derivado apresentou baixas concentrações de glicose, assim como perda de atividade hidrolítica. Revelando assim que a aplicação de 24 h como tempo de imobilização não é uma metodologia interessante, diante dos resultados obtidos.

Observando-se ainda a Figura 29, com relação à estabilidade operacional para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com 48 h de imobilização, percebe-se um comportamento de constância para concentração de glicose, a qual atinge seu máximo no tempo 420 min, com 8,6 g.L<sup>-1</sup>. A média de concentração de glicose encontra-se em torno de 6 a 8 g.L<sup>-1</sup>. Este comportamento se estende até os 600 min de reação, sem apresentar queda de concentração de glicose.

Assim como para o tempo de imobilização de 6 h, a velocidade de conversão é rápida, atingindo valor de concentração de glicose próximo aos da média com apenas 30 min, o que se mostra muito interessante, porém, visto ao elevado tempo de incubação, tal metodologia torna-se inviável, uma vez que se aplicando o tempo de 6 h de imobilização, atingiram-se valores de concentração de glicose maiores e constantes, empregando um menor período de tempo.

Após o ensaio, verificou-se que 58% da atividade enzimática deste derivado foi perdida, valor este menor que o apresentado para o derivado incubado por 6 h, porém este último apresentou maiores concentrações de glicose. Desta forma, 48 h de imobilização não se torna um tempo viável para aplicação na obtenção do derivado QUIT<sub>GLU2</sub>.

Frente aos resultados obtidos com a variação do tempo de imobilização (Tabela 11), percebe-se que o tempo de imobilização não influencia na conversão. Segundo ALONSO (2005) a imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse agente ativante, o que condiz com os resultados alcançados no presente trabalho. Assim, podemos concluir que o tempo não melhorou a estabilização bem como a conversão. Observa-se que possivelmente tenha ocorrido algum problema operacional que possa ter causado maior quantidade de enzima no reator para obter-se tais resultados. Desta forma, o tempo de 3 h de imobilização mostra-se suficiente.

**Tabela 11** Dados relacionados à variação do tempo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8% (v/v) coagulados com KOH a 50°C (QUIT<sub>GLU2</sub>). Carga presente no reator contínuo: 23,7 U<sub>LAC</sub>

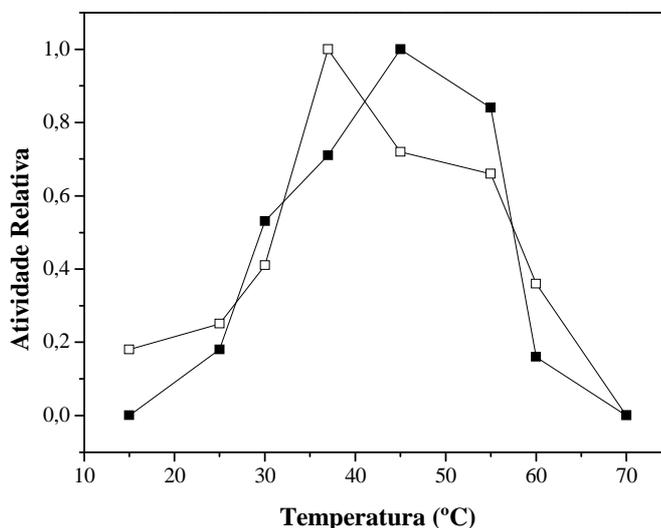
Tempo de Imobilização (h)	Decréscimo da atividade enzimática após reação em reator contínuo (%)
3	44
6	64
12	65
24	65
48	58

#### 4.14 Ensaios de temperatura – Atividade enzimática

O conhecimento da faixa de atividade hidrolítica ótima da enzima é de fundamental importância para a otimização dos processos. Assim, o efeito da variação da temperatura sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada é observado na Figura 30. Percebe-se que à medida que se eleva a temperatura, a atividade relativa tende a aumentar, alcançando o seu máximo, 100%, na temperatura de 45°C e 37°C, para enzima solúvel e imobilizada, respectivamente.

Ao passo que se prossegue com o aumento da temperatura, a atividade da enzima solúvel tende a decair rapidamente por conta da inativação da enzima, como verificado na temperatura de 70°C. Pode-se verificar também que a enzima imobilizada apresenta maior resistência às altas temperaturas do que a enzima solúvel, como é visto na temperatura de 60°C.

**Figura 30** – Efeitos da temperatura na atividade da (■)  $\beta$ -galactosidase solúvel e (□) imobilizada por 3 h em quitosana 2,0% ativada com glutaraldeído na hidrólise de lactose 5,0% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 adicionado de 2 mM  $MgCl_2$  e 0,1 mM  $MnCl_2$



De acordo com VIEIRA (2009), a máxima atividade hidrolítica da enzima  $\beta$ -galactosidase de origem da *Kluyveromyces fragilis* solúvel e imobilizada foi atingida com a temperatura de 45°C, utilizando também como substrato lactose 5%.

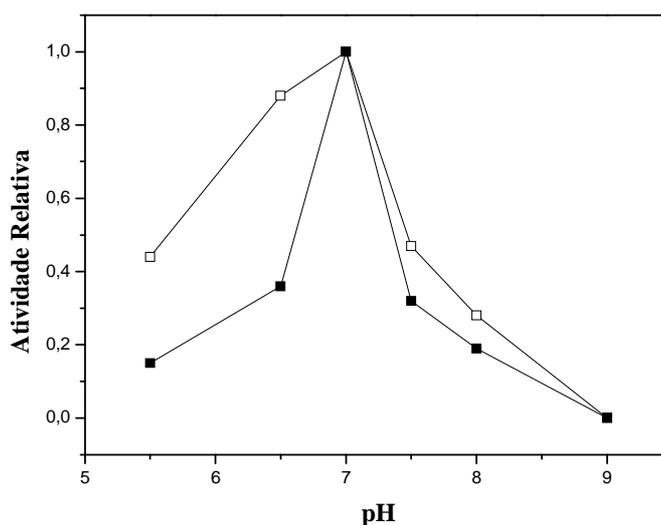
ZHOU e CHEN (2001) verificaram a máxima atividade da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* solúvel, utilizando ONPG como substrato, 40°C, o que se encontra próxima à temperatura do presente estudo. NUMANOĞLU e SUNGUR (2004) observaram que a melhor temperatura foi 40°C, não somente para enzima solúvel, mas como também para enzima imobilizada.

#### 4.15 Ensaios de pH – Atividade enzimática

De acordo com a Figura 31, pode-se verificar que a máxima atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi com a utilização de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0. Com o aumento do valor de pH a atividade relativa da enzima tende a aumentar, alcançando seu máximo, e volta a decair até apresentar inativação,

como observado para o pH 9,0. Nota-se que a enzima imobilizada tende a resistir mais a pH ácido e alcalino.

**Figura 31** – Efeitos do pH na atividade da (■)  $\beta$ -galactosidase solúvel e (□) imobilizada por 3 h em quitosana 2,0% ativada com glutaraldeído na hidrólise de lactose 5,0% (m/v) a 37°C



De acordo com CAVAILLE e COMBES (1995), a faixa de maior atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase de origem da *Kluyveromyces lactis* é entre 7,0 e 7,5, demonstrando coerência com os dados obtidos neste estudo.

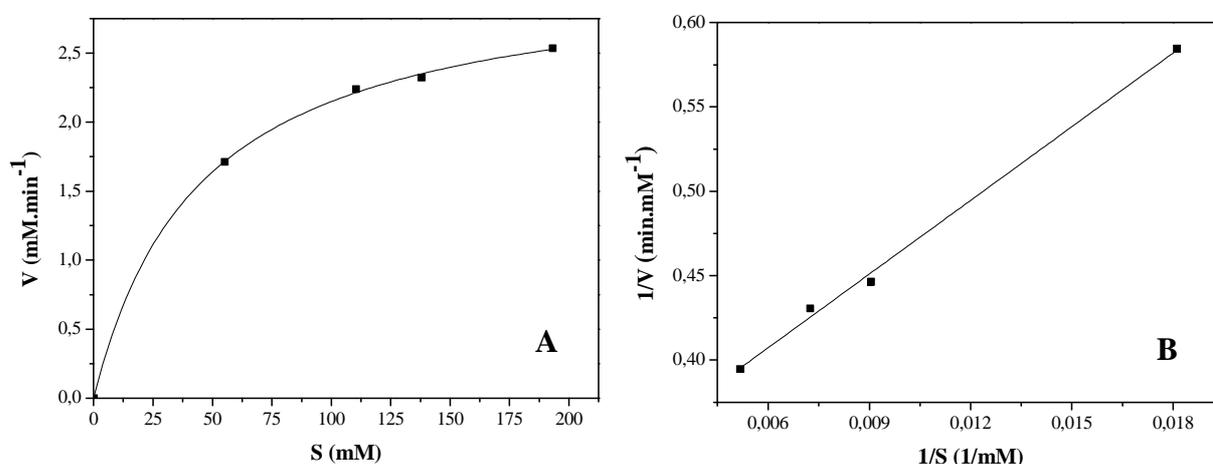
ANSARI e HUSAIN (2011) apresentaram resultados muito semelhantes aos da Figura 25, onde a atividade hidrolítica foi máxima no pH 7,0, tanto para enzima solúvel como para imobilizada.

#### 4.16 Determinação dos parâmetros cinéticos

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.

O método de Michaelis-Menten foi utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), tanto para  $\beta$ -galactosidase solúvel (Figura 32) como para o derivado  $QUIT_{GLU2}$  (Figura 33) para hidrólise enzimática de lactose de 2,0 a 8,0 % (m/v). Em seguida procedeu-se com a linearização de Lineweaver-Burk como forma comparativa das constantes, como pode ser visto na Tabela 12. Em ambos os casos, enzima solúvel e imobilizada, adicionaram-se 10  $U_{LAC}$  ao reator, igualmente para todas as variações de concentração de substrato.

**Figura 32** – Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com o modelo de (A) Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para  $\beta$ -galactosidase solúvel a pH 7,0 e 37°C



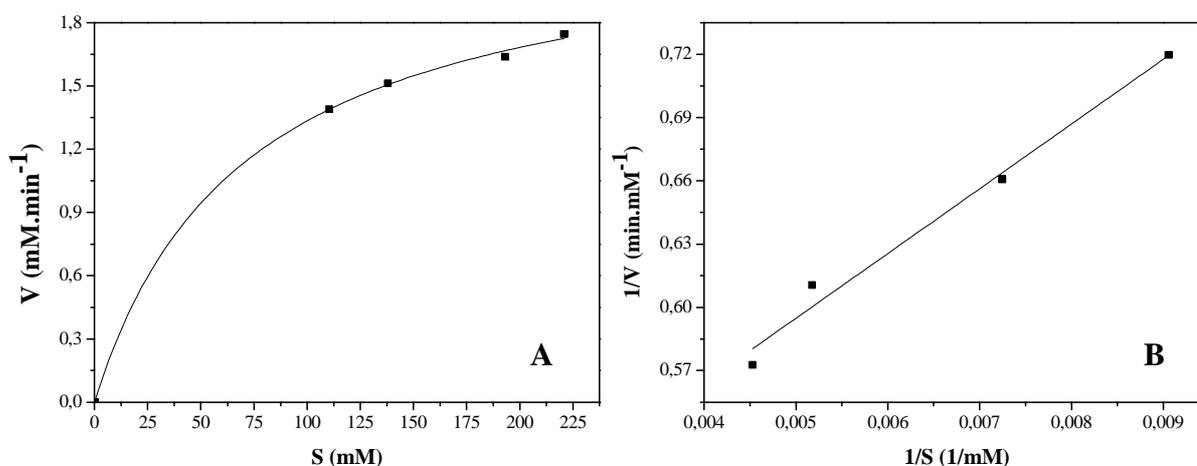
Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos através do gráfico ilustrado na Figura 32 foram 3,12  $mM \cdot min^{-1}$  como  $V_{m\acute{a}x}$ , e  $K_m$  igual a 45,12  $mM$  para o ajuste do modelo de Michaelis-Menten. Bem próximo a este resultado foram os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  para o ajuste do modelo de Lineweaver-Burk, 3,13  $mM \cdot min^{-1}$  e 45,57  $mM$ , respectivamente. Nota-se ainda, o bom ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais principalmente do modelo de Michaelis-Menten.

A Figura 33 representa o estudo cinético do derivado  $QUIT_{GLU2}$  utilizando o modelo de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk. Percebe-se também o bom ajuste dos modelos aos dados experimentais, resultando em um  $V_{m\acute{a}x}$  de 2,28  $mM \cdot min^{-1}$  e  $K_m$  de 70,57  $mM$  para o modelo de Michaelis-Menten, e  $V_{m\acute{a}x}$  de 2,27  $mM \cdot min^{-1}$  e  $K_m$  de 69,69  $mM$  para o modelo de Lineweaver-Burk.

**Tabela 12** Parâmetros cinéticos do derivado QUIT<sub>GLU2</sub>. Carga presente no reator batelada: 10 U<sub>LAC</sub>. Sendo ( $V_{\text{máx}}$ ) velocidade máxima e ( $K_m$ ) constante de Michaelis-Menten

Condição da enzima	Modelo	$V_{\text{máx}}$ (mM.min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)
Solúvel	Michaelis-Menten	3,12	45,12
	Lineweaver-Burk	3,13	45,57
Imobilizada	Michaelis-Menten	2,28	70,57
	Lineweaver-Burk	2,27	69,69

**Figura 33** – Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com o modelo de (A) Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C e ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>), a pH 7,0 e 37°C



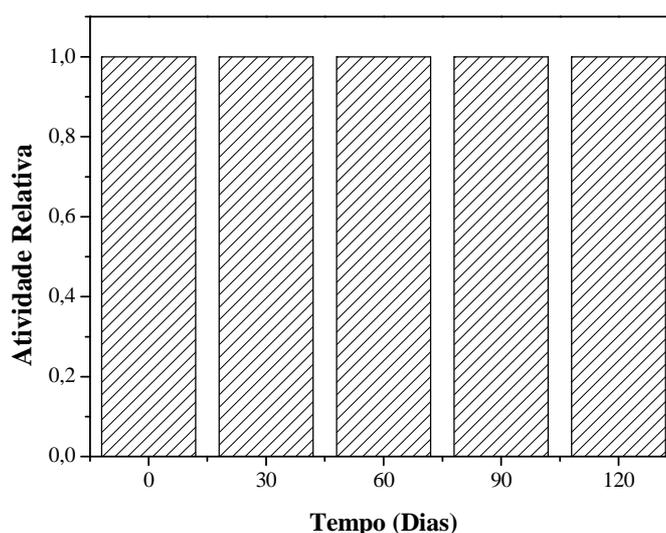
O derivado QUIT<sub>GLU2</sub> apresentou valor de  $K_m$  maior quando comparado ao resultante para enzima solúvel, representando uma menor afinidade do derivado com o substrato, provocada possivelmente pela limitação difusional, como por exemplo, problemas de transferência de massa (substrato-suporte).

#### 4.17 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C

Um outro parâmetro de estabilidade importante e que deve ser avaliado para os biocatalisadores é a estabilidade à estocagem, pois este quando estocado em condições favoráveis de pH e temperatura, tendem a manter seu potencial catalítico (BRÍGIDA, 2006).

Desta forma, realizou-se a estocagem do derivado QUIT<sub>GLU2</sub> em solução tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionada de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> sob 10°C, por um período de 120 dias, sendo a atividade hidrolítica do derivado acompanhada a cada 30 dias. Assim, obtiveram-se os seguintes resultados de acordo com o gráfico abaixo (Figura 34).

**Figura 34** – Estabilidade à estocagem sob refrigeração (10°C) de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana 2,0% (m/v) coagulada com KOH a 50°C e ativada com glutaraldeído (QUIT<sub>GLU2</sub>) em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionada de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>



De acordo com os resultados, pode-se avaliar que esta metodologia de imobilização para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* promove uma ótima estabilidade à estocagem sob 10°C, permitindo a permanência de sua atividade original por até 60 dias nestas condições de incubação. VIEIRA (2009) realizou este mesmo estudo para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído e verificou que com 60 dias ocorreu uma perda de 10 % da atividade hidrolítica deste

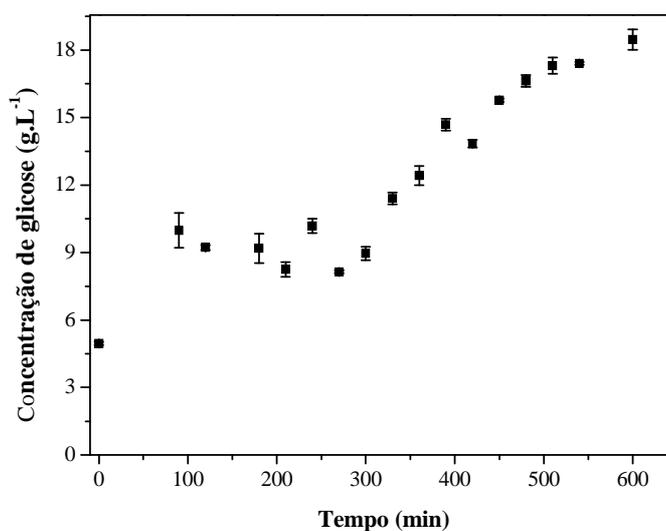
derivado, revelando assim uma melhor estabilidade à estocagem para o derivado desenvolvido no presente trabalho, possivelmente por conta da ausência de desorção durante o período de estocagem promovido pela afinidade da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* ao suporte.

#### 4.18 Estabilidade operacional para o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> com alta carga em soro de leite

Objetivando alcançar altas conversões em um curto período de tempo, realizou-se hidrólise da lactose do soro de leite 5,0 % (m/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 adicionado de 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, sem qualquer tratamento prévio, utilizando alta carga de enzima oferecida (400 mg P.g<sup>-1</sup> suporte). Segundo GUIBAL (2004), quanto maior a carga de enzima imobilizada, maior será a estabilidade operacional aparente deste catalisador permitindo operar em reatores contínuos por tempos prolongados.

Os resultados para concentração de glicose ao longo de 10 h de reação estão dispostos na Figura 35.

**Figura 35** – Estabilidade operacional de QUIT<sub>GLU2</sub> em reator contínuo à 37°C com vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de soro de leite 5,0% (m/v). Carga enzimática presente no reator: 23,7 U<sub>LAC</sub>. Derivado de alta carga enzimática – 400 ± 60 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel de Carga oferecida. Massa de derivado: 0,05 g



A concentração de glicose apresenta-se crescente, sendo seu máximo visualizado no tempo 600 min, com aproximadamente  $18,5 \text{ g.L}^{-1}$ , o que representa em torno de 37 % de conversão de lactose proveniente de soro de leite em glicose. Possivelmente com a continuação da reação, maiores valores de concentração de glicose poderiam ser atingidos. O biocatalisador apresentou ainda uma boa estabilidade operacional, visto seu uso contínuo sem apresentar queda até 10 h de processo. Contudo, pode ter ocorrido uma demora em atingir o estado estacionário, por volta de 510 min.

LI *et al.* (2007) projetaram um reator de escala piloto de leito fixo para hidrólise contínua de lactose de leite integral através da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em tecido de algodão ativado com glutaraldeído (carga enzimática de  $7151 \text{ U}_{\text{LAC}}$ ), utilizando uma alta vazão de substrato ( $866 \text{ mL.min}^{-1}$ ), sob  $37^\circ\text{C}$ , o qual obteve 30,23% de conversão de lactose para o tempo de residência de 11,8 min. Assim, a conversão de lactose foi inferior à obtida na Figura 30, mesmo utilizando uma carga enzimática muito superior, o que revela a boa aplicação do derivado QUIT<sub>GLU2</sub>.

Após a reação ser finalizada, o derivado foi analisado quanto a sua atividade enzimática residual, a qual decaiu 32 %, perda bem inferior à apresentada nos demais ensaios de estabilidade operacional realizados neste estudo, corroborando com GUIBAL (2004).

## 5 – CONCLUSÕES

Neste estudo foram aplicadas metodologias para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* 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 através de diferentes protocolos. Estudaram-se os melhores derivados obtidos, sendo os resultados obtidos bem satisfatórios, como os citados a seguir.

Possibilitou-se agregar valor aos processos, uma vez que o presente estudo objetivou o aproveitamento de rejeitos da indústria de laticínios, soro de leite, o convertendo em co-produto para indústria de alimentos, com inúmeras aplicações. Além da utilização de rejeitos também da indústria pesqueira e agroindústria, através das matérias-primas, quitosana e, fibra de casca de coco verde e bagaço de caju, utilizados como suportes alternativos, reduzindo o impacto ambiental.

Observou-se que suportes como fibra de casca de coco verde e bagaço de caju não foram adequados para imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, para as metodologias de imobilização e ativação desenvolvidas, perante seus resultados de parâmetros e imobilização, provavelmente por conta da baixa porosidade e diâmetro dos poros destes.

A quitosana apresentou-se como um bom suporte para imobilização da enzima, mesmo já existindo diversos estudos na literatura, ainda se faz necessário variar estratégias de imobilização e ativação buscando resultados positivos quanto rendimento de imobilização, atividade recuperada e estabilização. O suporte quitosana-alginato-epoxilado não apresentou resultados positivos como suporte para imobilização da  $\beta$ -galactosidase, o que também foi verificado na literatura.

Suportes com tratamento com dimetilformamida apresentaram baixos rendimentos de imobilização, apesar da alta atividade recuperada, não se apresentaram como bons derivados para aplicação industrial, devido ao seu baixo rendimento de imobilização.

Contudo, melhores resultados foram obtidos através da ativação com glutaraldeído a quente (50°C) da quitosana 2,0 % (m/v) coagulada com KOH (QUIT<sub>GLU2</sub>), o que possivelmente favoreceu o aumento no diâmetro dos poros do suporte.

Este derivado apresentou alta carga máxima, quando comparado com a literatura, com imobilização de 100 % até cargas de 75 mg P.g<sup>-1</sup> suporte, assim como melhor efetividade comparada a outros derivados utilizando o suporte porém ativados com epícloridrina e

glicidol. Estes resultados favorecem a aplicação do derivado em ensaios que requerem elevada carga enzimática. Além deste parâmetro, apresentou também, ótimos resultados de estabilidade operacional, as quais também foram relacionadas à estabilidade térmica da enzima solúvel, com bons resultados de conversão de lactose 2,0 % (m/v) em glicose, 37 %, e estabilidade por 10 h de reação de hidrólise contínua.

Com relação à estabilidade operacional, no presente trabalho não se utilizou dados de reuso dos derivados através de seguidas bateladas, pois adaptou tal ensaio visando à aplicabilidade na indústria, uma vez que ensaios estabilidade operacional com o uso de reator contínuo agregam diversas vantagens ao processo, sobre tudo econômicas.

Verificou-se ainda que a variação do tempo de imobilização não trouxe influência significativa, avaliado através de ensaios de estabilidade operacional que o tempo de 3 h de imobilização é o suficiente.

Ensaio de melhor pH e temperatura concluíram que o derivado QUIT<sub>GLU2</sub> e a enzima solúvel apresentam o mesmo valor para melhor pH 7,0 e diferentes temperaturas, sendo 37°C para o derivado e 45°C para a enzima solúvel.

Os ensaios de cinética enzimática permitiram conhecer os dados de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para a enzima solúvel (45,12 mM e 3,12 mM.min<sup>-1</sup> e imobilizada (70,57 mM e 2,28  $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ , respectivamente, para o modelo de Michaelis-Menten.

O derivado QUIT<sub>GLU2</sub>, apresentou ainda ótima estabilidade à estocagem sob 10°C por 120 dias, sem apresentar queda da atividade relativa, o qual apresentou carga teoricamente imobilizada igual a 490 U<sub>LAC</sub>.g<sup>-1</sup>sup.

Analisou-se também a aplicação do derivado com altas cargas (400 mg P.g<sup>-1</sup> quitosana) para hidrólise de soro de leite em reator contínuo para avaliação da sua estabilidade operacional e conversão da lactose em glicose. O ensaio mostrou que o derivado apresentou boa estabilidade operacional, apesar da alta carga no suporte, visto que a conversão em lactose se deu de forma crescente, sem apresentar queda até o final do ensaio, 10 h.

Desta forma, esta dissertação de mestrado mostra que a aplicação de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada é viável e promissora para indústria de alimentos, uma vez que se obtém um produto de alto valor agregado, glicose, utilizando rejeitos industriais, como da indústria pesqueira e de laticínios, gerando impactos econômicos e reduzindo os ambientais.

---

## 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados obtidos e visando a complementação do presente estudo, sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Estudar outras metodologias de imobilização e ativação, como por exemplo, imobilizações de origem física;
- Aplicar a mesma metodologia do melhor biocatalisador para  $\beta$ -galactosidase de outras origens;
- Realizar outros estudos relacionados ao tratamento da quitosana com dimetilformamida, visando à melhoria dos parâmetros de imobilização;
- Realizar a caracterização do suporte de quitosana coagulado com KOH a 50°C, verificando as modificações realizadas;
- Utilizar reator contínuo que permita o melhor controle dos parâmetros de reação, visto a utilização de um mini reator;
- Aumentar o tempo de reação de hidrólise do soro de leite, para observar a conversão em maiores períodos;
- Realizar a modelagem de reatores contínuos empregando o melhor catalisador obtido e empregando uma cinética com inibição pelo produto;
- Separar os produtos formados através da hidrólise da lactose e estudar a sua aplicação na indústria de alimentos;
- Realizar co-imobilização da  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase em quitosana visando à produção contínua de tagatose, assim como evitar a inibição pelo produto gerada pela galactose.

---

**7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

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.

ALONSO, N. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sepharose supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 35, p. 57-61, 2005.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$  galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles – Its future aspects in biosensor applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, p. 119–126, 2011.

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.

ANTHONSEN, M. W.; WARUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. **Carbohydr. Polym.**, v. 22, p. 193-201, 1993.

ANTUNES, A. J. Proteínas do Leite. In: **Funcionalidades de proteínas do soro de leite bovino**. 1. Ed. Barueri: Manole Ltda, 2003. cap. 1, p. 17-36

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, 2010, v. 2, p. 880-890.

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. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.

BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte**. 2006. 177 f. 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.

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

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A. C. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chitosan. **Biotechnol. Prog.** V. 10, p. 220-224, 1994.

CARRARA, C.R.; MAMMARELLA, E.J.; RUBIOLO, A.C. Prediction of the fixed-bed reactor behaviour using dispersion and plug-flow models with different kinetic for immobilised enzyme. **Chem. Eng.**, v. 92, p. 123–129, 2003.

CAVILLE, D.; COMBES, D. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 22, p. 55-64, 1995.

CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CETINUS, S. A., ÖZTOP, H. N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 889-894, 2003.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes-Research and development**. New York: John Wiley & Sons, 1978. 284 p.

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

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.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M.G; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DRAGONE, G., MUSSATO, S. I.; SILVA, J. B. A. Fermentación de Cervezas de Altas Densidades por Processo Continuo Utilizando Levaduras Inmovilizadas, **In: XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química e V Congreso Argentino de Ingeniería Química**, Buenos Aires, Argentina, 2006.

DSM FOOD SPECIALITIES. **Maxlact<sup>®</sup> A lactase de levedura lacteal – aplicações em leite e soro**. The Netherlands, Boletim Técnico, 6 p., 2009.

ELKAOUTIT, M.; NARANJO-RODRIGUEZ, I.; DOMÍNGUEZ, M.; HIDALGO-HIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 24, p. 10926-10935, 2011.

EL-TAHLAWY, K.; HUDSON, S. M. Chitosan: Aspects of Fiber Spinnability. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 2, p. 1162-1168, 2006.

EMBRAPA. Industrialização do leite no Brasil - 2007. **Embrapa Gado de Leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0406.php>>. Acesso em: 16 jan. 2012a.

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 jan. 2012b.

FERNANDEZ, V. N. V. **Avaliação da qualidade do leite e de queijos produzidos pela agricultura familiar, em sistemas de produção ecológico e convencional, no Leste do Rio Grande do Sul**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M.; LÔBO, R. N. B.; VÂNIA, R. V.; Valor Nutritivo das Silagens de Capim-Elefante com Diferentes Níveis de Subprodutos da Indústria do Suco de Caju. **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n. 6, p. 1380-1385, 2004.

FANGKANGWANWONG, J.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v. 47, p. 6438-6445, 2006.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **Int Dairy J.**, v. 18, p. 685–694, 2008.

GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P.; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, 2008.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Hydrolysis of Lactose – a Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 1985.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, p. 313-327, 1998.

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.

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

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.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 43-74, 2004.

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

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

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

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

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.

HU, X.; ROBIN, S.; O'CONNELL, S.; WALSH, G.; WALL, J. G. Engineering of a fungal  $\beta$ -galactosidase to remove product inhibition by galactose. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 1772-1782, 2010.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2000.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic and enzymatic adsorption model in a recirculation hollow-fibre bioreactor. **Bioprocess biosyst. Eng.** v. 28, p. 27-36, 2005.

KELIN, M. P. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 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.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, G. X. M.; ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Pilot scale lactose hydrolysis using  $\beta$ -Galactosidase immobilised on cotton fabric. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 497-500, 2007.

LIANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; ZHU, M. J.; LIANG, S.; HUANG, Y. J. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. **Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 35, p. 1605–1613, 2008.

LILLY, M.; DUNNILL, P. Immobilized-enzymes reactors. **Methods of Enzymology**, v. 44, p. 717–738, 1976.

OLIVEIRA, L. G.; de LIMA, W. C. P. B.; de LIMA, A. G. B. Transporte de calor em regime permanente em um reator cilíndrico circular de leito fixo: um estudo experimental. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 1, p. 48-58, 2011.

LOPES, E. L.; JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, K. F.; NUNES, R. C.; ARAÚJO, L. F. Soro de leite em pó e farinha de peixe+lactose em rações com dois níveis de proteína para leitões na fase inicial. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 217-226, 2007.

MACHADO, K. C.; DAMM, D. D.; JUNIOR, C. C. M. F. Reaproveitamento tecnológico de resíduo orgânico: casca de coco verde na produção de gabinetes ecológicos de computadores. In: Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, 2., 2009, Porto Alegre. **Anais do II Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre, 2009.

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.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 51, n. 6, p. 1233-1240, 2008.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during

lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v. 107, p. 258-264, 2008.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L. GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A. Use of Fibres Obtained from the Cashew (*Anacardium occidentale, L*) and Guava (*Psidium guayava*) Fruits for Enrichment of Food Products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 143-150, 2005.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

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, 2011a.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W. ; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; L. C. GIORDANO, R. 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. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1055-1066, 2011b.

MONTEIRO Jr, O. A. C.; AIRDOLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interactions in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119-128, 1999.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D.  $\beta$ -Galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized onto Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in a packed-bed reactor. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 3, p.759-764, 2007.

NUMANOĞLU, Y.; SUNGUR, S.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004.

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, E. A. **Imobilização da enzima frutotransferase extracelular de *rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulases**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

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**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

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

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUIBAN, J. M.; MILLAN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1160-1166, 2007.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Braz. J. Food Technol.**, v. 2, p. 145-151, 2008.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil**. 1996. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

PESSELA, C. C. B.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, L. J.; CARRASCOSA, V. A.; GUIBAN, M. J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decrease product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 199-205, 2003.

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

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RIOS, G. M.; BEELLEVILLE, M. P.; PAOLUCCI, D.; SANCHEZ, J. Progress in enzymatic membrane reactors - a review. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p. 186-196, 2004.

ROCHA, M. V. P.; SOUZA, M. C. M.; BENEDICTO, S. C. L.; BEZERRA, M. S.; MACEDO, G. R.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, G. A. S. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice. **Humana Press Inc.**, v. 137-140, p. 185-194, 2007.

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.

RODRÍGUEZ, A. P.; LEIRO, R. F.; TRILLO, M. C.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G.; BECERRA, M. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis-Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 41-54, 2006.

ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 1 – Processo de obtenção. In: Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, 6., 2002, Gramado. **CD-ROM de Anais do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 2002, 5p.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochem.** v. 39, p. 325-332, 2003.

SANTOS, J. C. S. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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, 18., 2011. Caxias do Sul. **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Caxias do Sul, 2011.

SHUKLA, S. R.; PAI, R. S. Adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) on modified jute fibres. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1430-1438, 2005.

SILVA, F. D.; NETO, P. O.; PATROCINIO, D. E. S. Imobilização da enzima papaína em quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Anais XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. São José do Rio Preto, 2009. Disponível em: <[http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_31138722863.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_31138722863.pdf)>. Acesso em: 2 fev.

SILVEIRA, M. B. **Fibra de coco verde como suporte para imobilização de lipase do tipo b de *Candida Antarctica***. 2010. 55 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

TANAKA, A.; KAWAMOTO, T. Cell and Enzyme Immobilization. In: **American Society for Microbiology**, Washington: 94 p., 1999.

TELLO-SOLÍS, S. R.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; SARABIA-LEOS, C.; GÓMEZ-RUÍZ, L.; CRUZGUERRERO, A. E.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G. M.; GARCÍA-GARIBAY, M. Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase by Circular Dichroism and its Structure-Activity Relationship as a Function of the pH. **J. Agric. Food Chem.** v. 53 n. 26, p. 10200-10204, 2005.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 212-225, 2006.

TORRES, A. A.; REGENHARDT, A. S.; MAMMARELA, J. E.; RUBIOLO, C. A. Estudio del proceso conjunto de recuperación de proteínas e hidrólisis de la lactosa presentes en el suero dulce de quesería en una unidad de ultrafiltración con enzimas inmovilizadas. In: Interamerican Confederations of Chemical Engineering, 12., 2006, Santa Fe. **Anais do XXII Interamerican Confederations of Chemical Engineering**. Santa Fe: Universidad Nacional Del Litoral – UNL, 2006.

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<sup>®</sup> e Lactozym<sup>®</sup>**. 2006, 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**. V. 6, p. 24-27, 1969.

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

WASTOWSK, A. D. **Celulose & Papel**. Rio Grande do Sul: UFSM, 2009. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/35809498/27/Derivados-de-Celulose>>. Acesso em: 9 fev. 2012.

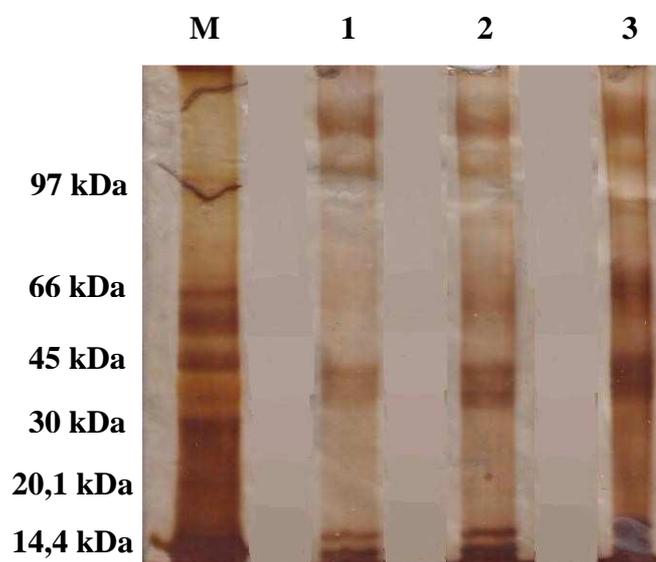
ZADOW, J. G. Lactose: properties and uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 2654-2679, 1984.

ZHOU Q. Z. K.; CHEN X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2001.

## ANEXOS

## ANEXO A - Eletroforese SDS-PAGE

A Figura 36 apresenta o perfil eletroforético das proteínas do extrato da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes concentrações, na qual podemos verificar três bandas superiores, duas intermediárias e duas inferiores. Ressaltando que moléculas de menor massa molecular tendem a passar primeiro (parte inferior). Por se tratar de uma enzima de massa molecular de 135 kDa (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985), o ideal seria a utilização de marcadores de alta massa molecular, porém não foi possível.



**Figura 36** – Perfil eletroforético da  $\beta$ -galactosidase em gel de agarose. (M) marcador de baixa massa molecular; (1)  $0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; (2)  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; (3)  $1,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A visualização de bandas superiores com massa molecular de 97 kDa demonstrou a presença de fosforilase-b, condizendo com resultados obtidos por TELLO-SOLÍS *et al.* (2005), assim como bandas próximas a 45 kDa, sugerindo a presença de ovoalbumina. Verificaram-se também bandas inferiores com massa molecular de 14,4 kDa, sugerindo a presença de  $\alpha$ -lactalbumina. De acordo com a linha 3, pode-se perceber a proximidade às bandas de 66 kDa.