



**RENORBIO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**ARIOSVANA FERNANDES LIMA**

**IMOBILIZAÇÃO DE UMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces*  
*lactis* NRRL Y-1564 CULTIVADA EM SORO DE LEITE**

**Fortaleza-CE  
2012**

ARIOSVANA FERNANDES DE LIMA

IMOBILIZAÇÃO DE UMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 CULTIVADA EM SORO DE LEITE

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Industrial.

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

FORTALEZA-CE

2012

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

---

L696i Lima, Ariosvana Fernandes.

Imobilização de uma  $\beta$ -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y – 1564  
cultivada em soro de leite / Ariosvana Fernandes Lima – 2012.  
101 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, 2012.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas – Aplicações industriais. I. Título.

---

CDD 660.6

**Ariosvana Fernandes Lima**

**Imobilização de uma  $\beta$ -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis*  
NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite**

*Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, da Rede Nordeste de  
Biotecnologia-RENORBIO Ceará, como  
requisitos parcial à obtenção do título  
de Doutor em Biotecnologia.*

*Área de concentração: Biotecnologia  
Industrial.*

*Tese aprovada em: 24/02/2012*

**BANCA EXAMINADORA**

*LucianaRochaBarros*  
Profa Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará

*Sueli Rodrigues*  
Profa Dra Sueli Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará

*Maria Valdez Ponte Rocha*  
Profa Dra Maria Valdez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará

*Wellington Sabino Adriano*  
Prof Dr Wellington Sabino Adriano  
Universidade Federal de Campina Grande

*Dasciana de Sousa Rodrigues*  
Dra Dasciana de Sousa Rodrigues  
Centro Nacional de Pesquisa de  
Agroenergia - Embrapa - DF

*Aos meus pais, João Gonçalves e  
Maria Diuzete, e irmãos.  
Aos meus sobrinhos e sobrinhas*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades em minha vida.

Aos meus pais por dedicarem sua vida a educação dos filhos e a família. A vocês toda a minha gratidão pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A profa. Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves pela orientação, conhecimento e oportunidade de participar do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio).

Agradeço aos membros (Prof<sup>a</sup> Dra Maria Valderez Ponte Rocha, Prof<sup>a</sup> Dra Sueli Rodrigues, Dra Dasciana de Sousa Rodrigues e Prof. Dr Wellington Sabino Adriano) da banca de defesa pelas contribuições e participação.

Aos colegas do GPBio pela convivência e troca de conhecimentos: Bete, Camilla, Cristiane, Cleiton, Léo e demais integrantes do grupo. As amigas Karine e Larissa.

Aos amigos do curso de doutorado, pelos conhecimentos compartilhados e adquiridos durante essa trajetória, em especial a Amanda e Stella.

Em especial a Valderez e a Tigressa pela amizade, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis. Muito obrigada.

A Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Engenharia Química por possibilitar a realização desse trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE Campus Limoeiro do Norte pelo apoio para a obtenção deste título.

## RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose por  $\beta$ -galactosidase desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, sendo uma das aplicações à obtenção de leite com lactose reduzida para o consumo por indivíduos com intolerância à lactose, produção de cápsulas de enzimas para tratamento e a prevenção da cristalização em produtos lácteos. Neste contexto, este trabalho foi desenvolvido visando a seleção de cepas de *Kluyveromyces* produtoras da enzima  $\beta$ -galactosidase usando um resíduo agroindustrial, o soro de leite como meio de cultivo. Inicialmente, realizou-se a seleção de espécies de *Kluyveromyces* capazes de produzir  $\beta$ -galactosidase utilizando lactose como fonte de carbono, em meio complexo e posteriormente em soro de leite (50 g/L de lactose) desproteinado e suplementado com extrato de levedura (1 g/L). Após definir a levedura que apresentava maior produção da enzima de interesse, estudou-se a produção e a viabilidade de imobilizá-la em quitosana. Após, caracterizou-se a enzima solúvel e imobilizada, consistindo na determinação do pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica, estimativa dos parâmetros termodinâmicos e determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx}$  usando como substrato ONPG. As cepas de *K. marxianus* LAMI CE025 e CCA 510 não consumiram lactose em meio complexo. As demais cepas foram avaliadas quanto à produção de  $\beta$ -galactosidase em soro de leite. A atividade máxima de 3,7 U/mL foi obtida por *K. lactis* NRRL Y-1564 após 12 h de cultivo a 180 rpm e 30°C, sendo selecionada como micro-organismo para a produção da  $\beta$ -galactosidase. O pH ótimo para a enzima solúvel e imobilizada foram 6,5 e 7,0, respectivamente, e temperatura ótima de 50 e 37°C para a  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada, respectivamente. A enzima solúvel e imobilizada mostrou perfis semelhantes de desactivação a 40 ° C. Durante mais de 200 min, ambos os biocatalisadores mostrou a mesma estabilidade, retendo cerca de 50% da sua actividade inicial. Entretanto, a 50°C, a enzima imobilizada mostrou uma maior estabilidade térmica, sendo 8 vezes mais estável. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram 3,34 mM e 1,78 mM/min para a  $\beta$ -galactosidase solúvel comparado com 3,68 mM e 3,38 mM.min para a enzima imobilizada. Na hidrólise de lactose utilizando a enzima solúvel a 37°C e pH 7,0 foi verificada uma conversão de 30,77% da lactose para a carga de 2,0 U e 9,8% usando 0,5 U. Após o 10º reciclo de uso, a enzima imobilizada reteve 74% da atividade inicial. A  $\beta$ -galactosidase imobilizada, estocada em tampão fosfato de potássio pH 7,0 a 4°C manteve 100% de sua atividade enzimática inicial no período de 93 dias. A  $\beta$ -galactosidase solúvel perdeu 9,4% de sua atividade inicial quando foi estocada nas mesmas condições. De acordo com os resultados obtidos, o soro de leite mostrou-se uma fonte de carbono alternativa para produção de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y1564 e a quitosana ativada com glutaraldeído é um suporte alternativo adequado de baixo custo para imobilização da  $\beta$ -galactosidase, proporcionando a enzima imobilizada estabilidades térmicas, operacional e de armazenamento comparado com a enzima solúvel.

**Palavras-chave:** *Kluyveromyces*,  $\beta$ -galactosidase, caracterização enzimática, imobilização enzimática.

## ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase plays an important role in the processing of dairy products, such as the production of milk containing low concentrations of lactose, the prevention of crystallization in dairy products, and the use of galactosyltransferase for synthesizing galacto-oligosaccharides. In this context, this work aims to study how *Kluyveromyces* strains can be used to produce  $\beta$ -galactosidase from an agro-industrial by-product such as whey. The species studied were *K. marxianus* (LAMI CE 025, CCA 510, ATCC 36907) and *K. lactis* (NRRL Y-1564 and Y-4087). This work also aims to investigate the immobilization of the enzyme onto chitosan and determine its properties such as the optimal operating pH and temperature, the thermal stability of the enzyme, the thermal desnaturation constant, the half-life and the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  using ONPG as substrate of the enzyme  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* strain NRRL Y1564. *K. marxianus* LAMI CE 025 and CCA 510 did not consume lactose of the complex medium. The other strains were studied for  $\beta$ -galactosidase production in whey. The maximum enzymatic activity of 3.7 U/mL was achieved by *K. lactis* NRRL Y-1564 after 12h of fermentation at 180 rpm and 30°C, being selected as a microorganism for  $\beta$ -galactosidase production. The optimal pH for soluble  $\beta$ -gal activity was found to be 6.5 while the optimal pH for immobilized  $\beta$ -gal activity was found to be 7.0, while the optimal operating temperatures were 50°C and 37°C, respectively. The soluble and immobilized enzyme showed similar deactivation profiles at 40°C. For more than 200 min, both biocatalysts showed the same stability, retaining approximately 50 % of their initial activities. However, the immobilized enzyme showed an increased stability (8 times) at 50°C. In the lactose hydrolysis at 37°C and pH 7.0 by soluble enzyme was observed a conversion of 58.68% using a enzymatic charge of 2.0 U and 17.57% to 0.5 U. The immobilized enzyme was reused for 10 cycles, showing a good operational stability by retaining more than 74% of its initial activity. The immobilized enzyme retained 100% of its initial activity when it was stored at 4°C and pH 7.0 for a period of 93 days. The soluble  $\beta$ -galactosidase lost 9.4% of its initial activity when it was stored at the same conditions. According to these results, an alternative culture medium prepared by using deproteinized whey supplemented with yeast extract was efficiently used for the production of  $\beta$ -galactosidase through the cultivation of *Kluyveromyces* strains. Chitosan activated with glutaraldehyde is a suitable alternative low cost support for  $\beta$ -galactosidase immobilization, providing the immobilized enzyme with higher thermal, operational and storage stabilities in comparison with the soluble enzyme.

**Keywords:** *Kluyveromyces*,  $\beta$ -galactosidase, enzyme characterization, enzyme immobilization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura molecular básica de uma molécula de lactose .....	20
Figura 2 -	Mecanismo de hidrólise da lactose por $\beta$ -galactosidase .....	23
Figura 3 -	Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose .....	37
Figura 4 -	Métodos para Imobilização de Enzimas .....	40
Figura 5 -	Perfil do crescimento celular, consumo de lactose, atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase por <i>K. lactis</i> NRRL Y1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm .....	67
Figura 6 -	Velocidades específicas para o crescimento de biomassa ( $\mu_X$ ) consumo de lactose ( $\mu_S$ ) e produção de $\beta$ -galactosidase ( $\mu_{P1}$ ) por <i>K. lactis</i> NRRL Y1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm .....	68
Figura 7 -	Produtividades de biomassa e da enzima $\beta$ -galactosidase por <i>K. lactis</i> NRRL Y1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm.....	69
Figura 8 -	Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 adicionado de 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> .....	73
Figura 9 -	Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM adicionado de 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> à temperatura de 37°C.....	75
Figura 10-	Velocidade de reação da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada de <i>K. lactis</i> em função da concentração de ONPG a 37°C.....	78
Figura 11-	Estabilidade térmica de $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada a 40°C.....	79
Figura 12-	Estabilidade térmica de $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada a 50°C.....	80
Figura 13-	Estabilidade térmica de $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada a 60°C.....	80
Figura 14-	Conversão da lactose (50 g/L) em glicose pela $\beta$ -galactosidase	

solúvel.....	84
Figura 15- Estabilidade operacional da enzima $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise do ONPG a 37°C.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.....	21
Tabela 2-	Micro-organismos produtores de $\beta$ -galactosidase.....	29
Tabela 3-	$\beta$ -galactosidases de origens diferentes imobilizadas por vários métodos para uma variedade de matrizes.....	41
Tabela 4-	Indicação de crescimento celular e consumo de lactose para diferentes espécies de <i>Kluyveromyces</i> cultivadas a 30°C e 180 rpm.....	61
Tabela 5-	Influência do tratamento do soro de leite no crescimento celular e produção da enzima $\beta$ -galactosidase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 a 30°C e 180 rpm por 24h, pH 6,0 .....	63
Tabela 6-	Crescimento celular, consumo de lactose e atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase produzida pelas leveduras <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564; <i>K. lactis</i> NRRL Y-4087 e <i>K. marxianus</i> ATCC 36907; cultivadas a 30°C e 180 rpm por 24h.....	64
Tabela 7-	Determinação da atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase produzida por <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite tratado a 30°C e 180 rpm. Comparação de metodologias. (Metodologia 1) Vieira (2009) e (Metodologia 2) Inchaurrondo, Yantorno e Voget (1994) .....	66
Tabela 8-	Parâmetros de imobilização da $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564, em quitosana ativada por glutaraldeído.....	71
Tabela 9-	Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ), em função da temperatura, aplicando modelo de ordem 1..	81
Tabela 10	Parâmetros termodinâmicos da desativação térmica de $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1564 solúvel e imobilizada em quitosana nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

At	Atividade enzimática
At <sub>t</sub>	Atividade enzimática teórica
At <sub>i</sub>	Atividade enzimática inicial
At <sub>f</sub>	Atividade enzimática final
At <sub>d</sub>	Atividade enzimática do derivado
A <sub>ofe</sub>	Atividade enzimática oferecida
At <sub>r</sub>	Atividade enzimática recuperada
At <sub>rel</sub>	Atividade relativa
DO	Densidade Ótica
FE	Fator de estabilização
k <sub>d</sub>	Constante de desativação térmica
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
ONPG	Ortonitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
ONP	ortonitrofenol
RI	Rendimento de imobilização
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida, minutos ou hora
U	Unidade de β-galactosidase que libera 1 μmol de o-nitrofenol por minuto
v	velocidade de hidrólise
V <sub>máx</sub>	velocidade máxima de reação
μ <sub>x</sub>	velocidade específica de crescimento
μ <sub>s</sub>	velocidade específica de consumo de substrato
μ <sub>P</sub>	velocidade específica de elaboração de produto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	17
<b>2.1.1 Propriedades do soro .....</b>	18
<b>2.2 Lactose.....</b>	19
<b>2.2.1 Propriedades químicas da lactose.....</b>	19
<b>2.2.2 Usos da lactose.....</b>	21
<b>2.2.3 Hidrólise da lactose.....</b>	22
<b>2.3 Enzimas.....</b>	24
<b>2.4 <math>\beta</math>-galactosidase .....</b>	25
<b>2.5 Cultivo submerso .....</b>	27
<b>2.6 Micro-organismos produtores de <math>\beta</math>-galactosidase .....</b>	28
<b>2.6.1 Leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i>.....</b>	30
<b>2.7 Produção de <math>\beta</math>-galactosidase .....</b>	31
<b>2.8 Recuperação de enzimas intracelulares .....</b>	33
<b>2.9 Imobilização de enzimas.....</b>	35
<b>2.9.1 Tipos de suporte para imobilização.....</b>	36
<b>2.9.1.1 Quitosana .....</b>	37
<b>2.9.1.2 Modificações químicas na estrutura da quitosana.....</b>	39
<b>2.9.2 Métodos de imobilização de enzimas.....</b>	39
<b>2.9.3 Efeitos causados pela imobilização da enzima .....</b>	41
<b>2.9.4 Imobilização de <math>\beta</math>-galactosidase em diferentes suportes .....</b>	42
<b>3 MATERIAS E MÉTODOS .....</b>	45
<b>3.1 Materiais.....</b>	45
<b>3.2 Micro-organismos .....</b>	45
<b>3.3 Soro de leite.....</b>	46
<b>3.4 Seleção de leveduras consumidoras de lactose em meio sintético .....</b>	46
<b>3.5 Estudo da influência do pré-tratamento do soro de leite na produção da enzima <math>\beta</math>-galactosidase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 .....</b>	46
<b>3.5.1 Pré-tratamento ácido do soro de leite .....</b>	47
<b>3.5.2 Pré-tratamento enzimático do soro de leite .....</b>	48
<b>3.6 Produção da enzima <math>\beta</math>-galactosidase.....</b>	48
<b>3.6.1 Preparo do inóculo.....</b>	48

<b>3.6.2 Condições de cultivo para a produção de <math>\beta</math>-galactosidase .....</b>	48
<b>3.7 Extração da enzima <math>\beta</math>-galactosidase .....</b>	49
<b>3.8 Estudo da metodologia da determinação da atividade enzimática .....</b>	49
<b>3.9 Preparação e ativação do suporte para imobilização da enzima .....</b>	51
<b>3.9.1 Preparação das partículas de quitosana e ativação com glutaraldeído....</b>	51
<b>3.10 Imobilização da <math>\beta</math>-galactosidase de <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564 em gel de quitosana ativado com glutaraldeído .....</b>	52
<b>3.11 Determinação dos parâmetros de imobilização .....</b>	52
<b>3.11.1 Determinação do rendimento de imobilização .....</b>	52
<b>3.11.2 Determinação da Atividade recuperada .....</b>	52
<b>3.12 Determinação do pH ótimo da <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada.....</b>	53
<b>3.13 Determinação da temperatura ótima da <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada.....</b>	53
<b>3.14 Estudo da estabilidade térmica <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada .....</b>	54
<b>3.15 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos .....</b>	55
<b>3.16 Hidrólise de lactose catalisada por <math>\beta</math>-galactosidase solúvel .....</b>	56
<b>3.17 Estabilidade operacional da enzima <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada .....</b>	56
<b>3.18 Estabilidade de armazenamento da enzima <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada.....</b>	56
<b>3.19 Métodos analíticos .....</b>	57
<b>3.19.1 Determinação da concentração celular.....</b>	57
<b>3.19.2 Determinação do pH.....</b>	57
<b>3.19.3 Determinação da concentração de açúcares redutores .....</b>	57
<b>3.19.4 Determinação da concentração de lactose.....</b>	57
<b>3.19.5 Determinação da concentração de proteínas .....</b>	58
<b>3.19.6 Determinação da Atividade Hidrolítica .....</b>	58
<b>3.19.7 Determinação dos parâmetros cinéticos durante o cultivo de <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564 para a produção de <math>\beta</math>-galactosidase.....</b>	59
<b>3.19.8 Determinação dos parâmetros cinéticos (<math>K_m</math> e <math>V_{máx}</math>) de hidrólise de ONPG catalisada por <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada .....</b>	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	61
<b>4.1 Seleção de leveduras consumidoras de lactose em meio sintético .....</b>	61
<b>4.2 Estudo da influência do pré-tratamento do soro de leite na produção da enzima <math>\beta</math>-galactosidase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 .....</b>	62

<b>4.3 Produção de <math>\beta</math>-galactosidase utilizando soro de leite como fonte de carbono pelas cepas <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564, <i>K. lactis</i> NRRL Y-4087 e <i>K. marxianus</i> ATCC 36907.....</b>	64
<b>4.4 Estudo da metodologia de determinação da atividade enzimática .....</b>	65
<b>4.5 Estudo cinético da produção de <math>\beta</math>-galactosidase por <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564...</b>	66
<b>4.6 Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase em gel de quitosana .....</b>	70
<b>4.6.1 Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático contendo a enzima <math>\beta</math>-galactosidase produzida por <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564.....</b>	70
<b>4.6.2 Estudo do tempo de imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase de <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564 .....</b>	70
<b>4.7 Caracterização da <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada .....</b>	72
<b>4.7.1 Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada .....</b>	72
<b>4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{máx}</math> para a <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada .....</b>	77
<b>4.8 Estudo dos parâmetros termodinâmicos da enzima <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada.....</b>	82
<b>4.9 Hidrólise da lactose pela <math>\beta</math>-galactosidase solúvel de <i>K. lactis</i> NRRL Y-1564.....</b>	83
<b>4.10 Estabilidade operacional da <math>\beta</math>-galactosidase imobilizada em quitosana...</b>	84
<b>4.11 Estabilidade de estocagem a 4°C da enzima <math>\beta</math>-galactosidase solúvel e imobilizada.....</b>	86
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	89
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	90
<b>ANEXO .....</b>	101

## 1 INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma das mais promissoras enzimas empregadas em processos industriais, e tem diversas aplicações nas indústrias de alimentos, de fermentações e em laticínios (KAUR *et al.*, 2009). Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em dois monossacarídeos glicose e galactose, permitindo a obtenção de alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes a lactose (SANTIAGO *et al.*, 2004). Ressalta-se ainda que a hidrólise enzimática da lactose desempenha um papel importante no processamento de produtos lácteos, a exemplo da obtenção de leite com baixo teor de lactose, prevenção da cristalização em produtos de laticínios (HSU *et al.*, 2007, JURADO *et al.*, 2004).

Segundo Lane e Morrissey (2010), linhagens de *Kluyveromyces* têm sido extensivamente estudadas para produzir  $\beta$ -galactosidase, especialmente *K. lactis* e *K. marxianus*, devido a sua capacidade de assimilar a lactose como fonte de carbono. A levedura *K. lactis*, foi inicialmente a espécie predominante, dentro do gênero *Kluyveromyces*, entre os estudos sobre metabolismo de lactose (FUKUHARA, 2006).

A levedura *Kluyveromyces lactis* é tradicionalmente conhecida como fonte de  $\beta$ -galactosidase para a indústria de alimentos e tem seu uso seguro em aplicações destinadas à indústria alimentícia ou farmacêutica (SANTIAGO *et al.*, 2004). Além disso, é capaz de hidrolisar a lactose (MANERA, 2006), o carboidrato presente no soro de leite, subproduto de indústrias de laticínios, cujo aproveitamento é necessário, devido aos problemas ambientais gerados com seu descarte. A levedura *K. lactis* apresenta algumas vantagens em relação a outros micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase, tais como, bom rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; aceitabilidade como um micro-organismo seguro (GRAS – Generally Recognized as Safe), aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias (KAUR *et al.*, 2009).

Uma alternativa para a redução do custo de produção da enzima  $\beta$ -galactosidase é utilização de meio de cultura mais barato, como soro de leite

(BRAGA *et al.* 2011; MANERA, 2006; PINHO; PASSOS, 2010; RECH; AYUB, 2007). O soro de leite é um subproduto das indústrias de laticínios, representa a porção aquosa que é formada durante a coagulação da caseína do leite durante a fabricação de queijo ou durante a produção de caseína. O soro representa uma faixa de 85 a 95% do volume de leite e retém 55% de seus nutrientes (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Em geral, a maioria do soro de leite provém das indústrias produtoras de queijos, que são de pequeno porte, não possuindo meios econômicos ou tecnologia disponível para o reprocessamento deste resíduo, que poderia ser transformado em produtos de maior valor agregado.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção anual de queijo inspecionada é de aproximadamente 500 mil toneladas, originando um volume estimado de 4,5 bilhões de litros de soro de leite (FARIAS, 2011). A produção de soro de leite no mundo supera 160 milhões de toneladas por ano (estimado em nove vezes a produção do queijo), mostrando uma taxa de crescimento anual de 1-2% (OECD-FAO, 2008; SMITHERS, 2008).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, devido sua especificidade e alto poder catalítico, sua aplicação industrial não é tão imediata. Esses biocatalisadores geralmente são caros e como são solúveis e estão presentes em baixa concentração no meio, sua recuperação após o uso dificilmente será economicamente viável. A imobilização de enzimas normalmente é necessária, pois esta permite inúmeras vantagens, tais como: a reutilização do biocatalisador; a redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator; a facilidade do controle operacional; operar de forma contínua; a fácil purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, visto que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação.

Vários trabalhos já determinaram as propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos da enzima  $\beta$ -galactosidase, um grande número de dados foi obtido para enzima comercial, imobilizada ou purificada e enzimas de diversas fontes microbianas (JURADO *et al.* 2004; NAGY *et al.* 2001; VIEIRA, 2009; ZHOU; CHEN, 2001). No entanto, para enzimas produzidas pela levedura *Kluyveromyces lactis*, estes dados são limitados.

Com base no exposto acima, este trabalho visou selecionar um micro-organismo produtor da enzima  $\beta$ -galactosidase dentre diversas cepas de *Kluyveromyces*, utilizando o soro de leite como fonte de carbono. Após a escolha do micro-organismo, que obtiver a maior produção, caracterizar a enzima a partir do extrato enzimático, obtido da extração das células, pois a  $\beta$ -galactosidase é uma enzima intracelular. Também estudou-se a imobilização da enzima produzida utilizando como suporte quitosana. Para a caracterização determinou-se os perfis de temperatura e pH, estabilidade térmica e estabilidade operacional como, também, determinou-se os parâmetros cinéticos da Equação de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Soro de leite

O soro de leite é um subproduto do processamento de queijos nos laticínios. Caso não seja aproveitado das inúmeras maneiras possíveis, seu descarte na estação de tratamento de efluentes representará custos adicionais para a empresa que o gera. Segundo estudo da FAO - Food Agriculture Organization (1974), o efeito poluidor de 250 mil litros de soro corresponde ao despejo no ambiente do esgoto de uma cidade de 50 mil habitantes (ZACARCHENCO *et al.*, 2008). Isto pode representar problema ambiental, custos para tratamento de efluentes ou grande quantidade de matéria-prima para fabricar produtos a partir de soro de leite.

Uma forma de aproveitamento do soro de queijo após a remoção da gordura e caseína é como matéria-prima para a produção de lactoalbumina, lactose, fosfatos do leite, mistura de esteróis, gordura-solúvel, vitamina K e vitaminas solúveis em água. Além dessas alternativas tem-se a utilização desse subproduto com alto teor de proteínas e vitaminas no processamento do leite para a fabricação de certos derivados. Produtos tais como soro em pó, proteína do soro, queijo ricota, lactose, ácido láctico, álcool, vinagre e embutidos (hambúrgueres, salsichas, bolos de carne) enriquecidos com concentrados protéicos, bebidas lácteas e na alimentação animal (PORTO, 2001). De acordo com Zacarchenco *et al.* (2008), o soro de leite na forma fluida, em pó, concentrado ou seus ingredientes fracionados são utilizados no mundo inteiro em bebidas, barras energéticas e outros alimentos processados.

Segundo Farias (2011), a produção brasileira de queijo inspecionada (SIF, Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura) é de aproximadamente 500 mil toneladas (ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) e dá origem a um volume estimado de 4,5 bilhões de litros de soro de leite. Este volume corresponde a cerca de 281.250 toneladas equivalentes de Soro de Leite em Pó, sem retirada ou concentração de nenhum de seus nutrientes ou componentes. No Brasil, parte destes 4,5 bilhões de litros de soro de leite tem sido

processada em sistemas de torre de secagem (spray-dryer), sistemas utilizados nas principais áreas de processamento de leite e soro de leite ao redor do mundo.

### **2.1.1 Propriedades do soro**

Na visão de Panesar *et al.* (2008), a lactose, reservatório de carboidrato do soro de leite e a presença de outros nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, faz do soro uma matéria-prima potencial para produção de diversos bioprodutos através de meios biotecnológicos.

O soro é a parte líquida do leite obtida após a precipitação da caseína para a produção de queijos e outros produtos de leite acidificado. Na produção de queijo 75 a 85% do volume do leite resulta em soro. Os principais constituintes do soro apresentam uma composição global semelhante à do leite, do qual se extraiu caseína e gordura com aproximadamente 94% de água, 0,8% de proteína, 0,2% de matéria gordurosa, 4,8% de lactose, 0,5% de cinzas minerais e outras substâncias, incluindo vitaminas (RECH; AYUB, 2007). Cerca da metade dos sólidos totais presentes no leite permanece no soro, no qual a quantidade de extrato seco representa em média 7% do peso total. Os componentes hidrossolúveis do leite tais como, lactose, alguns sais, vitaminas e as proteínas que não coagulam com a caseína, as albuminas e as globulinas, ficam dissolvidos no soro (OLIVEIRA, 1982).

Há basicamente dois tipos de soro de lácteo:

- Soro doce – proveniente da coagulação enzimática do leite em pH próximo de 6,7, sendo obtido nos processos de fabricação de queijos tipo Cheddar, Minas frescal, Minas padrão, Mussarela, Prato e Suíço. Sua acidez titulável em ácido lático é de 0,15 a 0,18%, correspondente a um pH de 6,3 a 6,7 (ORDÓÑEZ, 2005).

- Soro ácido - resultante da produção de caseína ou de queijos com leites coagulados inicialmente por ácido, tal como a do tipo cottage, quark, requeijão e da ricota. Esse tipo de soro apresenta uma acidez titulável de 0,5 a 0,6% em ácido lático e apresenta pH de 4,6 a 4,7 (ORDÓÑEZ, 2005).

No entanto, de acordo com Peres (2011) existem vários tipos de soro:

- Soro de leite em pó “doce” que advém da produção de queijos; sendo o produto mais simples também conhecido como integral;
- Soro de leite em pó desmineralizado, com 25% a 90% dos seus minerais extraídos;
- Soro delactosado, com até 30% de concentração de proteína;
- Concentrados protéicos de soro de leite conhecidos como, proteína de soro concentrada (PSC), com mais de 30% de concentração de proteínas;
- Isolados protéicos de soro de leite (IPS), a partir de 80% de concentração de proteína de soro.

Do processamento dos concentrados e isolados protéicos de soro de leite, ainda se obtém o soro de leite “desproteinizado” ou permeado, geralmente com 80% no mínimo de lactose, além de uma porcentagem residual de proteína, cujo perfil e qualidade é menos relevante nutricionalmente.

## 2.2 Lactose

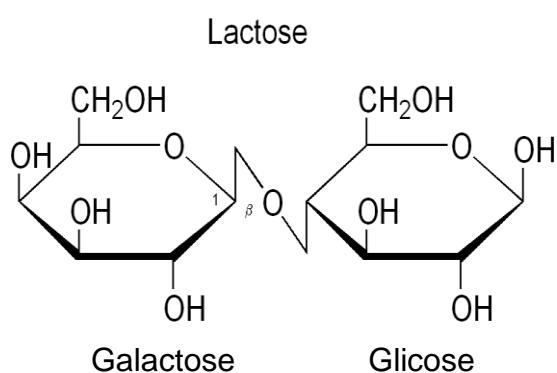
A lactose é o carboidrato mais importante do leite e conhecida popularmente como “açúcar do leite”. Praticamente, o leite e o soro de queijo são as fontes exclusivas de lactose. No leite é encontrada nas proporções (em termos de sólidos totais) de 40%, 50% no leite desnatado e 75% no soro de leite. Além das altas concentrações de lactose no leite e nas glândulas mamárias, baixas concentrações aparecem no sangue e na urina, especialmente durante a gravidez e amamentação (GONZÁLEZ; DURR; FONTANELLI, 2001). A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono para micro-organismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando à produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (ORDÓÑEZ, 2005).

### 2.2.1 Propriedades químicas da lactose

Quimicamente, a lactose é um dissacarídeo redutor constituída por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4. Pelo fato de ambas as moléculas que compõem a lactose se apresentarem na forma

de anel piranosílico, esta deve ser denominada propriamente de 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranose (CAMPBELL, 2000). Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 1.

Figura 1- Estrutura molecular básica de uma molécula de lactose.



As reações químicas da lactose implicam na ligação hemicetal dos carbonos 1 e 5 da molécula de glicose, da ligação glicosídica  $\beta$ -1 → 4, dos açúcares cíclicos e da ligação -C-C- dos anéis. A estrutura hemicetal se apresenta na forma de um equilíbrio entre os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  que diferem na configuração de -OH e -H de C-1. Estes anômeros diferem em rotação ótica específica e em solubilidade (LONGO, 2006).

As duas formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$  da lactose são responsáveis pelas diferentes propriedades físicas deste açúcar como solubilidade e doçura. A forma  $\alpha$  é a mais estável dos tipos cristalinos em temperaturas ordinárias. Em soluções supersaturadas, abaixo de 93,5°C, ela cristaliza na forma  $\beta$  anidra. Quando uma solução de lactose ou produtos derivados do leite, contendo altos teores de lactose, são secos rapidamente, a lactose ocorre como um cristal amorfó higroscópico. Os cristais hidratados de lactose são duros e dão a impressão de natureza arenosa (ORDÓÑEZ, 2005). Em comparação com outros açúcares, como sacarose, glicose e frutose, a solubilidade da lactose é baixa. Outras características como a baixa digestibilidade e reduzido poder edulcorante limitam a aplicação comercial da lactose (ORDÓÑEZ, 2005).

Na Tabela 1 é apresentado o poder edulcorante de alguns açúcares, entre eles a lactose, e sua solubilidade com o aumento da temperatura.

Tabela 1 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos (ZADOW, 1984 *apud* Santiago, 2002).

	Poder edulcorante	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

Com o objetivo de ampliar a utilização de produtos lácteos, uma das alternativas é hidrolisar enzimaticamente a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Esta conversão por meio da enzima  $\beta$ -galactosidase é interessante tanto do ponto de vista tecnológico com a finalidade de produzir um açúcar mais doce, mais facilmente fermentável e mais solúvel, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose e aumentando o período de estocagem, como do ponto de vista nutricional, possibilitando a obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digerível para pessoas com problemas relacionados à intolerância a lactose (LONGO, 2006).

A intolerância à lactose é definida como síndrome clínica de desconforto intestinal, que ocasiona ao paciente diarréia e flatulência, após a sua ingestão. Testes efetuados para esta síndrome consiste em fornecer 0,2 g de lactose por kg de massa corporal ao paciente, ministrada em solução aquosa de 20% m/v e durante as horas seguintes, amostras de sangue indicam os níveis de glicose. Nas pessoas tolerantes à lactose, a concentração de glicose no sangue aumenta, e se for intolerante essa concentração aumenta pouco ou não aumenta (TEIXEIRA, 2000).

## 2.2.2 Usos da lactose

A lactose purificada obtida do soro de queijo é utilizada em diversas indústrias como a farmacêutica a fim de fornecer compressibilidade, lubrificação e

firmeza na confecção de comprimidos, no revestimento de pílulas e em cosméticos; na indústria química, para a produção de ácido láctico e cítrico, corantes e espumas de poliuretano; na indústria de alimentos, a lactose por ser menos doce que os outros açúcares comerciais, confere aos alimentos maior viscosidade e textura sem obter um produto tão doce; em produtos de confeitoria e biscoitos é usada em recheios, como carregador de flavorizantes e corantes; em produtos de panificação a adição de lactose à massa aumenta a cor dourada da crosta do pão (freqüentemente uma característica desejável) (PORTO, 2001).

Outra utilização da lactose obtida do soro é como fonte de carbono para alguns micro-organismos, tais como: *Escherichia coli*, *Saccharomyces thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *K. marxianus* e outros, para a produção de produtos metabólicos como, ácidos, álcool, enzimas e oligossacarídeos (SANTIAGO, 2002).

### **2.2.3 Hidrólise da lactose**

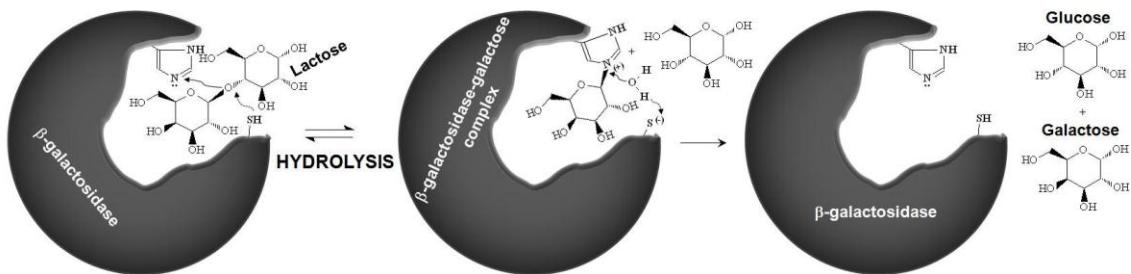
A lactose pode ser hidrolisada tanto pelo método ácido, como pelo método enzimático, utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase (CAMPBELL, 2000; TREVISAN 2008).

A principal vantagem da hidrólise ácida é o baixo custo por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como, ácido sulfúrico e clorídrico, contudo opera em condições severas de pH e temperatura (pH 1,0 a 2,0 e temperatura de 100 a 150°C). Devido essa característica, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, síntese de sub-produtos indesejáveis e desnaturação de proteínas (ORDÓÑEZ, 2005).

O método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima  $\beta$ -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes,  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glicose (ORDÓÑEZ, 2005). Realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas (pH de 3,5 - 8,0; temperatura de 5 a 60°C), reduz não só a possibilidade de alteração de compostos

sensíveis ao calor, bem como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do processo sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (ORDÓÑEZ, 2005). A Figura 2 mostra o mecanismo de hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase.

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise da lactose por  $\beta$ -galactosidase



Fonte: Neri (2008) adaptado de Shukla (1975)

A hidrólise de lactose pode ocorrer em leite fluido, o que é alcançado por adição direta (processamento em batelada) da enzima de levedura que pode alcançar aproximadamente 70% de hidrólise e subseqüentemente a enzima é destruída pela pasteurização. O soro de leite ou os sólidos do permeado do soro podem ser processados por reatores de enzima imobilizada, usando-se a  $\beta$ -D-galactosidase de *Aspergillus* e alcançando-se aproximadamente 90% de hidrólise de lactose (PARKIN, 2010).

A aplicação industrial das enzimas deve-se ao fato destas apresentarem alta especificidade entre enzima e substrato e possibilitar o controle de atividade da enzima mediante ajuste das condições da reação (temperatura e pH) interrompendo a reação quando necessário (SEGEL, 1993).

Torna-se evidente a grande importância nutricional e comercial da hidrólise da lactose no leite e de seus derivados, sendo a hidrólise enzimática, um dos métodos mais interessantes para esta finalidade (TEIXEIRA, 2000).

O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da  $\beta$ -galactosidase, é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as  $\beta$ -galactosidases são também galacto-transferases,

enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos, constituindo assim, importantes pesquisas na última década (ALMEIDA; PASTORE, 2001).

### 2.3 Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores químicos (LEHNINGER, 1997). Catalisadores são compostos capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo (BORZANI *et al.*, 2005a).

Ao contrário dos catalisadores sintéticos comuns, as enzimas podem apresentar uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo dessa forma, os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluentes. Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam. As enzimas, de um modo geral, são mais frágeis, porém à temperatura ambiente, são mais ativas que os catalisadores sintéticos (SEGEL, 1993).

Para ser comercialmente utilizável, do ponto de vista industrial, a enzima deve proporcionar a obtenção de produtos com melhor qualidade e possibilitar uma melhoria no processo, de tal forma a reduzir custos e equipamentos envolvidos (BORZANI *et al.*, 2005b).

As enzimas são empregadas na forma solúvel, normalmente em processos batelada ou na forma imobilizada, mais indicada em operações contínuas. A vantagem de imobilização da enzima é aumentar sua estabilidade já que a maioria é relativamente instável, seu custo é alto e a recuperação na forma ativa da enzima solúvel no processo final é difícil (VASILJEVIC; JELEN, 2001; ZHOU; CHEN, 2001).

O mercado industrial de enzimas no Brasil é expressivo e dinâmico, mas muito aquém do mercado mundial de enzimas, que movimenta US\$ 1,8 bilhões, centralizados na Europa e Estados Unidos. No Brasil, a comercialização totaliza US\$ 45 milhões, dos quais US\$ 35 milhões em importações. O Brasil é um país

dependente em biocatalizadores, apesar de ter cerca de 500 pesquisadores na área (MANERA, 2006).

As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por micro-organismos. A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: a natural, formada por tecidos animais e vegetais, de onde as enzimas podem ser extraídas e usadas *in natura*, ou extraídas e purificadas; e a cultivada, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas (REGULY, 2000).

As vantagens da utilização de enzimas microbianas são a sua versatilidade, grande aplicação e sofisticação dos processos que as empregam, possibilidade de utilização de matérias-primas de baixo custo, rendimento de produção que podem ser aumentados pelo aprimoramento das linhagens microbianas e a otimização das condições de fermentação (REGULY, 2000).

A maioria das enzimas tem aplicações vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais; enzimas para uso médico; e para uso analítico e científico. As principais aplicações industriais encontram-se dentro da área de biotecnologia, envolvendo microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química (BORZANI *et al.*, 2005b).

## 2.4 $\beta$ -galactosidase

A enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C.3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose ( $\text{Gal}\beta1\text{-}4\text{Glc}$ ) para formar glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactooligosacarídeos (ZHOU; CHEN, 2001). Popularmente conhecida como lactase ou formalmente como  $\beta$ -D-galactosídeo-galactohidrolase, é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura (SANTIAGO, 2002).

É encontrada em mamíferos (trato intestinal) e micro-organismos, e pertence à família 2 das glicosil-hidrolases. Tipicamente existem como tetrâmeros de cadeias polipeptídicas com aproximadamente 90 a 120 kDa, sendo a enzima (*lacZ*) de *Escherichia coli* representativa das lactases. Cada unidade dimérica contribui com o sítio de união  $Mg^{2+}$  e dois resíduos catalíticos (um de cada polipeptídeo); logo, existem dois sítios ativos para cada tetrâmero, e o local de ligação é um sulco profundo na interface das cadeias de polipeptídeo (PARKIN, 2010).

As  $\beta$ -galactosidases são também encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssegos, damascos, maçãs; em órgãos de animais como intestino, cérebro, placenta. Podem ser produzidas por grande quantidade de micro-organismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Com poucas exceções, as  $\beta$ -galactosidases são sintetizadas intracelularmente por micro-organismos que utilizam a lactose para produzir energia (BECERRA *et al.*, 2001).

De acordo com Rech e Ayub (2007), a produção comercial de lactase parece se restringir aos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, e às leveduras *K. lactis*, *K. marxianus* e *Candida pseudotropicalis*.

Atuam também como catalisador biológico da reação que hidrolisa ligações  $\beta$ -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos, e compostos tais como orto e para-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeos, sendo esses dois últimos usados para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase (BLANCH; CLARK, 1997).

As propriedades da lactase variam conforme sua fonte. A massa molecular da enzima pode variar de 850.000 Dalton para a enzima de *E. coli* e até 201.000 e 90.000 Dalton para *K. marxianus* e *A. oryzae*, respectivamente. A temperatura e o pH ótimos de operação também diferem de acordo com a preparação comercial particular (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

As enzimas de fontes microbianas oferecem um amplo intervalo de pH ótimo (5,5 a 6,5 para bactérias, 6,2 a 7,5 para leveduras, e 2,5 a 5,0 para fungos) para aplicações comerciais. As temperaturas ótimas são de 35 a 40°C para as enzimas de bactérias e leveduras e até 55 a 60°C para fungos. A enzima fúngica é a única forma não ativada por  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . Tal diversidade operacional permite o uso

de  $\beta$ -D-galactosidases microbianas em alimentos ácidos (soro ácido, alimentos lácteos fermentados), assim como em leite e soro doce. A enzima está sujeita à inibição por produto (galactose),  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (PARKIN, 2010).

Nas últimas décadas, observou-se um aumento no interesse pelo desenvolvimento de métodos para hidrólise da lactose em grande escala usando a enzima  $\beta$ -galactosidase (RUBIO-TEXEIRA, 2006). A hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos tendo em vista seus efeitos benéficos na assimilação de alimentos contendo lactose, bem como as possíveis vantagens tecnológicas e ambientais de aplicação industrial. Aumento da doçura, não necessitando adicionar outro carboidrato; ausência de cristalização nos produtos congelados. Nos sorvetes pode ser substituído 20% da sacarose por xaropes de lactose hidrolisada. A  $\beta$ -galactosidase também pode ser utilizada para eliminar a lactose de concentrados lácteos, em que este dissacarídeo pode causar a agregação da caseína durante o processo de congelamento. O processo de maturação de queijos é acelerado por meio da  $\beta$ -galactosidase, e ao adicionar xarope de soro hidrolisado em iogurtes, a etapa de pré-evaporação necessária para concentrar o leite é dispensada. Maior biodegradabilidade do soro quando a lactose é hidrolisada, devido à alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose (MAHONEY; NICKERSON; WHITAKER, 1974; ROBINSON, 1991; YANG; SILVA, 1995; SANTOS; LADERO, GARCIA-OCHOA, 1998; MAHONEY, 1998).

## 2.5 Cultivo submerso

As técnicas de cultivo submerso, industrialmente predominantes, têm se beneficiado dos avanços na instrumentação e controle de processos e são adequadas para cultivo de micro-organismos recombinantes, que vêm sendo crescentemente empregados para a produção de enzimas (Jr. SANT'ANNA, 2001).

Os cultivos requerem em primeiro lugar um substrato ou nutriente, este é geralmente um açúcar, como sacarose, glicose ou lactose, mas também pode ser um produto residual, como efluentes. O uso de produtos de descarte proporciona um nutriente potencialmente mais econômico que o uso de substratos puros. Em

segundo lugar, necessita-se de uma fonte de nitrogênio e finalmente nutrientes em menor quantidade e vitaminas (WAINWRIGHT, 1995).

Em cultura submersa, um grande número de fatores contribuem ao desenvolvimento de qualquer forma morfológica. Fatores que afetam a morfologia inclui o tipo e concentração da fonte de carbono, níveis de nitrogênio e fosfato, traços de minerais, oxigênio dissolvido e gás carbônico, pH e temperatura. Fatores físicos que afetam a morfologia incluem a geometria do fermentador, sistemas de agitação, e os métodos de cultivo, se em batelada, batelada alimentada ou contínuo (PAPAGIANNI, 2004).

## **2.6 Micro-organismos produtores de $\beta$ -galactosidase**

Segundo Reguly (2000), a seleção ou escolha do micro-organismo apropriado é o primeiro e mais importante passo para a produção de enzimas. A escolha do micro-organismo deve levar em consideração, entre outros fatores: facilidade de cultivo, em substratos simples e econômicos; estabilidade em suas características genéticas de produtor de determinada enzima; exigências nutritivas; facilidade de recuperação da enzima a partir do meio, pelos métodos de extração, concentração e purificação; isenção de formação de produtos tóxicos; aprovação pelas autoridades sanitárias (quando se trata de enzima para indústria de alimentos) e altas taxas de crescimento.

A taxa de crescimento é freqüentemente a principal característica a ser considerada quando uma cepa é selecionada para uso comercial ou em pesquisa (BITZILEKIS; BARNETT, 1997).

Uma grande variedade de micro-organismos tem a habilidade de produzir  $\beta$ -galactosidase, sendo função de alguns parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, peso molecular, sensibilidade à temperatura e pH.

A Tabela 2 apresenta alguns micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase relatados na literatura.

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase

Micro-organismo	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	DOMINGUES <i>et al.</i> (2005);
<i>Candida pseudotropicalis</i>	INCHAURRONDO <i>et al.</i> (1994)
<i>Erwinia aroideae</i>	FLORES; ALEGRE (1996)
<i>Guehomyces pullulans</i>	NAKAGAWA <i>et al.</i> (2006)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	GENEVA <i>et al.</i> (2001); LADERO <i>et al.</i> (2002)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DICKSON; MARKIN (1980); CAVAILLE; COMBES (1995); NUMANOGLU; SUNGUR (2004); BECERRA <i>et al.</i> (2001); KIM <i>et al.</i> (2004); ALEJANDRA; RAMÍREZ; NILO RIVAS (2003)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	BRAGA <i>et al.</i> (2011); MANERA <i>et al.</i> (2008); RECH <i>et al.</i> (1999); MARTINS <i>et al.</i> (2002); PINHEIRO; BELO; MOTA (2003); RAJOKA <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	VASILJEVIC; JELEN (2001)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	NAGY <i>et al.</i> (2001)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	CRUZ <i>et al.</i> (1999)
<i>Penicillium canescens</i>	BUDRIENE <i>et al.</i> (2005)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	RAO; DUTTA (1977)
<i>Thermus</i> s.p. strains T2	LADERO <i>et al.</i> (2002)

Fonte: Manera (2006)

Ainda que a  $\beta$ -galactosidase possa ser obtida por diversos micro-organismos (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994; CRUZ *et al.*, 1999; DOMINGUES; LIMA; TEIXEIRA, 2005), as leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam potencial aplicação industrial, como capacidade de crescimento em elevadas temperaturas resultando numa maior conversão ou menor tempo para

determinada taxa de conversão; altos níveis de crescimento; alta produtividade enzimática quando comparada com leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida*, quando a lactose é usada como substrato; e pela categoria de micro-organismo de consumo humano seguro (BELEM; LEE, 1998; INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET *et al.*, 1994; RECH, 1998; RUBIO-TEXEIRA, 2006).

O aumento da demanda industrial de  $\beta$ -galactosidase necessita de métodos de produção que assegurem a viabilidade econômica da hidrólise de lactose em escala comercial (NOR *et al.*, 2001). A seleção de um substrato econômico e facilmente disponível, juntamente com um micro-organismo de produção satisfatória, a otimização das condições de cultura, e um eficiente processo de downstream são essenciais para reduzir os custos de obtenção de enzimas (MUNISWARAN; SELVAKUMAR; CHARYULU, 1994).

### **2.6.1 Leveduras do gênero *Kluyveromyces***

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são de potencial uso industrial por fermentarem inulina e lactose, para produzir várias proteínas extracelulares e como fontes de enzimas como, a  $\beta$ -galactosidase. A fisiologia, a genética e a biologia molecular destas leveduras estão sendo cada vez mais estudadas (RUBIO-TEXEIRA, 2006).

A utilização de *Kluyveromyces* para produção de lactase oferece algumas vantagens, como: bom rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; aceitabilidade como um micro-organismo seguro, aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias; podem crescer a uma ampla faixa de temperatura; atividade de  $\beta$ -galactosidase mais alta em algumas cepas de *K. marxianus* comparada com a produzida por algumas leveduras do gênero *Candida*; alta velocidade de crescimento, permitindo-lhe sobrepujar micro-organismos contaminantes; predomínio de um metabolismo oxidativo fornecendo para esta levedura uma vantagem quando comparada a outros micro-organismos desde que permita a geração de altos rendimentos em biomassa podendo ser usada como fonte de nutrientes para dietas humanas e animais (BELEM; LEE, 1998;

INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994; RECH, 1998, RUBIO-TEXEIRA, 2006).

Em 1990, Castillo *apud* Becerra *et al.* (2001) identificou a levedura *Kluyveromyces lactis* como a principal fonte de lactase para a hidrólise enzimática da lactose presente no soro de queijo.

As  $\beta$ -galactosidases provenientes de leveduras, *K. fragilis*, *K. lactis* e *K. marxianus*, são intracelulares, induzidas por lactose e galactose e produzidas na sua maioria por cultivo submerso. Com o pH ótimo na região neutra, elas são bem adaptadas para hidrólise da lactose do leite. Entretanto, ambas as enzimas são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio no leite e pequenas concentrações de sódio. São também inibidas pela galactose (competitivamente) e glicose (não-competitiva) (REED; NAGODAWITHANA, 1993; NUNES *et al.*, 1993; LADERO *et al.*, 2000).

As enzimas de leveduras podem ser obtidas em grandes quantidades através do cultivo utilizando soro de queijo, são relativamente de baixo custo e apresentam temperatura ótima de atividade na faixa de 30 a 40°C, sendo uma desvantagem, pois facilita a contaminação microbiana, sendo aconselhável um período curto de hidrólise, de 2 a 3 horas (MAHONEY, 1997).

Segundo Ward (1991), micro-organismos das espécies *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*, podem fermentar a lactose, porque têm um sistema lactose-permease para transportar a lactose dentro da célula, onde se hidrolisa a glicose e galactose, que entram na glicólise, isso difere essas espécies da *S. cerevisiae*.

## 2.7 Produção de $\beta$ -galactosidase

A literatura apresenta diversos trabalhos sobre produção de  $\beta$ -galactosidase por vários micro-organismos.

Em 1996, Schneider e colaboradores estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase por *K. marxianus* CDB 002, utilizando o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. A atividade enzimática foi desprezível em meio de cultivo

contendo apenas melaço, porém altos valores para atividade enzimática foram encontrados quando o melaço foi enriquecido com extrato de levedura e peptona.

Rech e colaboradores, em 1999, determinaram as condições ideais de crescimento para as leveduras *K. marxianus* CBS 712 e *K. marxianus* CBS 6556, empregando soro de queijo como substrato, objetivando a produção de lactase. O pH e a temperatura ideais de crescimento foram 5,5 e 35-37°C, para ambos micro-organismos. O meio de cultura ideal foi soro de queijo *in natura* (7% m/v) para a cepa CBS 6556 e soro de queijo suplementado com extrato de levedura (1% m/v) para a cepa CBS 712. Por utilizar um meio de cultura mais simples e barato, a levedura *K. marxianus* CBS 6556 foi submetida para testes de otimização do processo em soro de queijo concentrado (21% m/v), resultando numa maior produção de  $\beta$ -galactosidase (800 U.mg<sup>-1</sup> de célula ou 10 U/mL).

Em 2002, Martins e colaboradores empregaram a mesma cepa de *K. marxianus* CBS 6556 para avaliar o efeito de diferentes concentrações de lactose e galactose na produção de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição na atividade específica da enzima durante o cultivo em altas concentrações de lactose ou galactose, provavelmente ocorreu uma inibição pelo substrato.

Vasiljevic e Jelen (2001) estudaram as condições ótimas para obter a máxima produção de  $\beta$ -galactosidase usando um meio de cultivo industrial. O micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 foi cultivado em leite desnatado, soro e soro permeado, suplementados com proteínas do soro, extrato de levedura ou caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), o pH foi ajustado para 5,6 e a fermentação ocorreu a 43°C. Foi observado que o emprego de leite desnatado proporcionou uma maior produção de  $\beta$ -galactosidase (5,5 U/mL) quando comparado aos demais meios de cultivo.

A produção da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* empregando soro lácteo desproteinizado foi otimizada através do emprego da metodologia de superfície de resposta (ALEJANDRA; RAMÍREZ; NILO RIVAS, 2003) realizando um planejamento experimental, com quatro fatores: temperatura, pH, velocidade de agitação e tempo de fermentação, tendo como resposta a atividade enzimática. As melhores condições operacionais foram: temperatura de 30,3°C, pH

4,68, velocidade de agitação de 191 rpm e tempo de fermentação de 18,5h, tendo uma produção da enzima de 8,3 U/mL.

Rajoka e colaboradores (2003) produziram  $\beta$ -galactosidase na presença de lactose, galactose, celobiose, xilose, arabinose, sacarose e glicose em frascos agitados utilizando a levedura *K. marxianus*. O tipo de substrato e a temperatura foram as variáveis que diretamente influenciaram no crescimento específico e na taxa de produção da enzima. Lactose (2% m/v) apresentou maior rendimento na produtividade específica, seguida por galactose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e glicose. As temperaturas testadas foram entre 22 e 45°C, os valores máximos para a produtividade foram encontrados na temperatura de 35°C.

## 2.8 Recuperação de enzimas intracelulares

Uma grande proporção de produtos microbianos potencialmente úteis são retidos dentro das células de seus produtores. A extração do material intracelular requer que a célula seja modificada geneticamente (de forma que o conteúdo intracelular possa ser excretado no meio de cultivo) ou as células devem ser desintegradas liberando o conteúdo citoplasmático (CHISTI; MOO-YOUNG (1996), *apud* GECIOVA; DEAN; JELEN, 2002). Dentre esses compostos intracelulares, encontra-se a  $\beta$ -galactosidase.

Os métodos para obtenção do produto intracelular devem ser capazes de romper a parede celular, e ao mesmo tempo não causar inativação das substâncias biológicas (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000). Várias técnicas podem ser empregadas para obtenção de produtos microbianos intracelulares sem inativá-los, tais como: moagem com esferas de vidro, homogeneização em alta pressão, sonificação, congelamento, tratamentos químicos e enzimáticos (BORZANI *et al.*, 2005b).

Puri *et al.* (2010) testaram três métodos químicos (permeabilização pela mistura de clorofórmio e etanol (4:1), lise com SDS e clorofórmio, lise com nitrogênio líquido) e três métodos físicos (homogeneização, sonicação e moagem com areia de rio) no rompimento de células de *K. marxianus* YW-1 para extração da  $\beta$ -galactosidase. Dos métodos químicos avaliados, a permeabilização com clorofórmio

e etanol (4:1) apresentou uma maior atividade enzimática, enquanto que o método de moagem com areia de rio foi o melhor método físico.

Em 2004, Santiago e colaboradores, estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, utilizando o soro de queijo como fonte de carbono, e extraiu a enzima  $\beta$ -galactosidase pelo método de permeabilização com o solvente clorofórmio (PA) a 37°C com agitação constante por 17 horas.

O método mais comum de autólise celular para  $\beta$ -galactosidase de leveduras é o tratamento de uma suspensão de células com agentes químicos capazes de desorganizar a membrana plasmática, como solventes orgânicos, surfactantes, policátions, proteínas básicas, ou soluções com alto poder iônico. O uso de solventes orgânicos como etanol, clorofórmio e tolueno, leva em consideração a eficácia e o custo do processo. Entretanto, até agora, poucas pesquisas foram feitas referentes aos fatores afetados por estes solventes na levedura (FLORES; ALEGRE, 1994).

No estudo de Inchaurrondo, Yantorno e Voget (1994) as células de várias estirpes de *Kluyveromyces* foram permeabilizadas por 20 minutos a 37°C na presença de 10% de etanol e 2% de tolueno (v/v) com agitação constante, para extração da  $\beta$ -galactosidase.

Flores e Alegre (1994) estudaram a permeabilização de células de *Kluyveromyces lactis* CBS 683 em relação à atividade de  $\beta$ -galactosidase usando clorofórmio, tolueno e etanol. O desempenho destes solventes dependeu do tempo de incubação, da temperatura e das concentrações de células e solventes. A máxima atividade enzimática encontrada foi com clorofórmio ou uma mistura de clorofórmio com 10% de etanol, utilizando uma concentração celular de  $10^9$  células/g. Nesse estudo o processo foi mais rápido na temperatura de 37°C.

Nunes, Massauger e Monte Alegre (1993), estudaram a extração da  $\beta$ -galactosidase das células de levedura por autólise das mesmas, utilizando clorofórmio e tolueno. A extração por clorofórmio foi mais rápida comparado com o tolueno, quando se utiliza tempo inferior a 20 horas de autólise. Com clorofórmio foram necessárias cerca de 12 a 14 horas para obter atividade de 2,14  $\mu\text{mol}$  ONPG/mL de autolisado.min, que corresponde a 82,6% da atividade obtida em 32 horas de autólise (2,59  $\mu\text{mol}$  ONPG/mL de autolisado.min). Enquanto que quando

utilizou-se o tolueno, em 13 horas de autólise, obteve-se atividade de 1,69  $\mu\text{mol}$  ONPG/mL de autolisado.min, 66,5% da atividade obtida em 32 horas (2,54  $\mu\text{mol}$  ONPG/mL de autolisado.min).

A escolha e adequação do método de ruptura dependem do micro-organismo (estrutura da sua parede celular; se Gram-positivos ou Gram-negativos, sendo os últimos geralmente menos resistentes) ou do meio (pH, concentração de sólidos, concentração iônica) (REGULY, 2000).

## 2.9 Imobilização de enzimas

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma solúvel. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (SOARES *et al.*, 2002).

De acordo com Chibata (1970) citado por Neri (2008), a enzima imobilizada é definida como “a enzima fisicamente confinada ou localizada em uma determinada região do espaço definido com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser usada repetidamente e continuamente, tornando as moléculas de enzimas insolúveis no meio aquoso”.

A  $\beta$ -galactosidase é uma das enzimas mais estudadas na medida em que a imobilização está em questão. Embora muitos estudos tenham descrito a imobilização eficaz de  $\beta$ -galactosidase isolada de *E. coli* recombinante, a sua aplicação na indústria de alimentos é limitada, pois este micro-organismo não é geralmente reconhecido como seguro (GRAS – “Generally Recognized As Safe”) (LADERO *et al.*, 2000; DI SERIO *et al.*, 2003). Atualmente o status de “GRAS” é válido para *A. niger*, *A. oryzae*, *K. lactis* e *K. fragilis*, que são os principais produtores de  $\beta$ -galactosidase utilizados na indústria de alimentos.

O uso de enzimas imobilizadas minimiza os inconvenientes encontrados nos processos onde se utiliza a enzima solúvel, por exemplo, instabilidade e sensibilidade para outras condições de processo que as ideais. Finalmente, uma enzima imobilizada pode ser fixada em posição próxima a outras enzimas,

participando de uma seqüência catalítica, aumentando, assim, a conversão em processos multietapas. Essas características de imobilização são atrativas se uma grande quantidade de substrato é requerida e se as enzimas envolvidas são muito onerosas (RIBEIRO, 1989; TREVISAN *et al.*, 1996; REED; NAGODAWITHANA, 1993).

De acordo com Whitaker (1994), o pH e a temperatura influenciam na velocidade da reação catalisada pela enzima. Os sítios ativos na enzima são freqüentemente compostos de grupos ionizáveis, que devem estar na forma iônica adequada a fim de manter a conformação do sítio ativo. Quando a temperatura aumenta, o aumento esperado na atividade das enzimas resultantes do aumento das colisões enzima substrato é compensado pelo aumento da taxa de desnaturação.

Para uso industrial, a utilização de enzimas como matéria-prima não reciclável tem inviabilizado seu uso, pois enzimas têm custo alto. Conseqüência dessas dificuldades, somente algumas se convertem em catalisadores de um processo industrial. Por esta razão, a imobilização da enzima é utilizada objetivando-se a insolubilidade da enzima em água, sua reutilização e a possibilidade de sua utilização em reatores contínuos por conta da sua fácil separação de catalisador-produto.

Para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado assim como o método de imobilização. Entre os métodos de imobilização de enzimas, disponíveis na literatura, destacam-se adsorção em materiais insolúveis, copolimerização empregando um monômero reativo, encapsulação em gel ou ligação covalentemente em suporte insolúvel, via reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos na superfície do suporte (STARK; HOLMBERG, 1989).

### **2.9.1 Tipos de suporte para imobilização**

Diferentes suportes têm sido empregados como matrizes para imobilização de várias enzimas, entre eles destacam-se os suportes orgânicos como dextrana, quitina e quitosana, os inorgânicos fosfato de zircônio, óxido de nióbio e materiais silícios, matrizes poliméricas Amberlite, poli (ácido carboxílico)

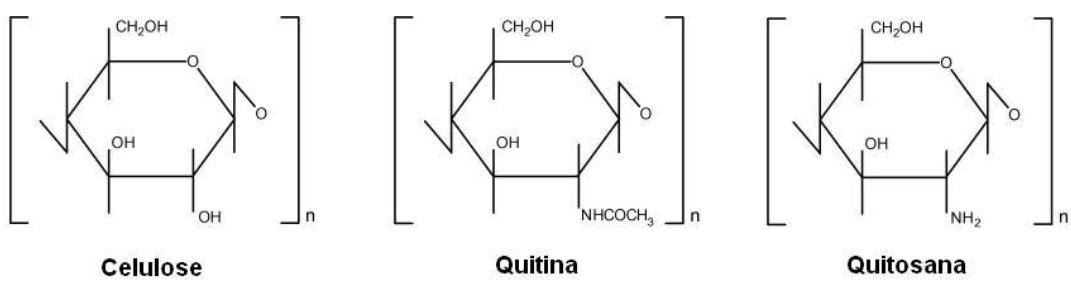
poliacrilonitrila e resinas constituídas de estireno e divinilbenzeno (PORTO *et al*, 2002). Vale ressaltar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo mudar sua estabilidade frente a pH e temperatura (MATEO *et al*, 2007).

O elevado custo de suportes à base de sílica e polímeros sintéticos incentiva pesquisas na busca de substâncias de baixo custo, como por exemplo, carbonato de cálcio, quitina e quitosana (PEREIRA *et al*, 2003).

#### 2.9.1.1 Quitosana

A quitosana (poli-N-acetilglicosamina) é um oligosacarídeo derivado da quitina, polímero mais abundante na natureza depois da celulose, o qual pode ser facilmente obtido de fontes naturais como o rejeito de indústrias pesqueiras, principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos (KUMAR; BRISTOW; SMITH, 2000). É constituído por uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004), como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose



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

Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino ( $\text{NH}^2$ ) para a quitosana. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino ( $\text{NH}^{3+}$ ), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais. A quitosana é obtida por uma drástica desacetilação com

tratamento alcalino de quitina, que é o principal componente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, e também nas paredes celulares de alguns fungos. A quitina é separada de outros componentes do exoesqueleto por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO<sub>4</sub> e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCOCH<sub>3</sub>), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana (BERGER *et al.*, 2004).

A presença de grupos amino e hidroxila, na superfície deste polímero natural, permitem o uso de agentes ativantes para obtenção de derivados imobilizados através de ligação covalente (PEREIRA *et al.*, 2003; CHIOU; WU, 2004).

A quitosana e a quitina, como suportes para imobilização, são utilizadas nas formas em pó, floculada e gel de diferentes configurações geométricas, o que permite a aplicação do suporte para diferentes procedimentos de imobilização.

A preparação da quitosana na forma de hidrogel é possível pelo fato da quitosana ser facilmente dissolvida em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético e tartárico, para formar soluções viscosas que precipitam mediante um aumento de pH (KRAJEWSKA, 2004). Desta maneira, diversas formas de quitosana podem ser fabricadas: géis em forma de esfera, membranas, cápsulas, fibras, fibras oca e esponjas.

Os diferentes tratamentos e modificações nos hidrogéis de quitosana são empregados para melhorar a estabilidade e durabilidade do suporte. Os métodos mais comuns na preparação do gel são: evaporação do solvente, neutralização, reticulação e gelificação.

O interesse em quitosana como um suporte promissor na imobilização de enzimas se deve a uma multiplicidade de aplicações, e vem crescendo nos últimos anos, pois este biopolímero renovável é de grande potencial para o mercado de biomateriais. O baixo custo e a abundância o tornam interessante para o setor industrial.

### 2.9.1.2 Modificações químicas na estrutura da quitosana

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. Além disso, o glutaraldeído também tem sido muito utilizado para reticulações intermoleculares nas proteínas ou para modificar a adsorção de proteínas em suportes aminados. Entretanto, o glutaraldeído deve ser manuseado com cuidado, pois é um composto neurotóxico (BETANCOR *et al.*, 2006).

Os hidrogéis formados por reticulação devem ser lavados e purificados a fim de eliminar os agentes não reagidos, pois muitos deles são prejudiciais à saúde devido à sua alta toxicidade (BERGER *et al.*, 2004).

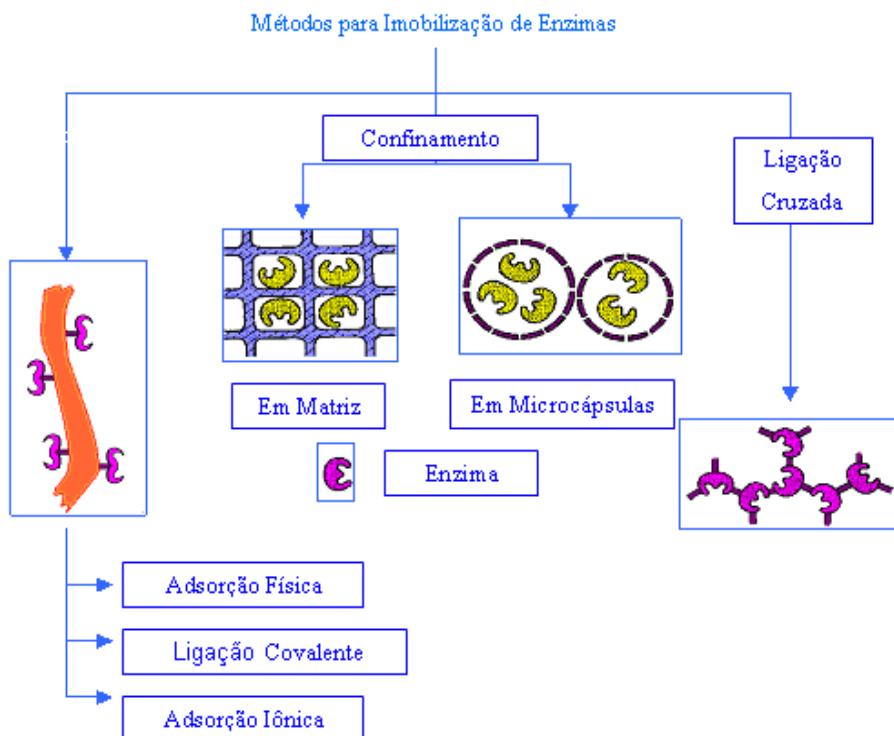
Apesar de apresentar algumas desvantagens, a utilização de hidrogéis reticulados com glutaraldeído como suporte para imobilização, e como consequência para a insolubilidade de enzimas, vem sendo muito estudada, pois o custo reduzido e a grande quantidade de grupos funcionais fazem da quitosana um suporte de grande potencial a ser desvendado.

### 2.9.2 Métodos de imobilização de enzimas

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Porém, não deverão ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo (VIEIRA, 2009).

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para contornar os possíveis problemas de instabilidade, como mostrado na Figura 4. A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (HAIDEN; HUSAIN, 2009).

Figura 4 - Métodos para Imobilização de Enzimas



Fonte: Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi (2004).

Para Vitolo (2001) a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá, essencialmente, de dois fatores: a) das características peculiares da enzima; b) das condições de uso da enzima imobilizada. Dado a variabilidade desses fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal. Em geral, as condições de imobilização para uma dada enzima só poderão ser estabelecidas empiricamente. O procedimento consiste em se imobilizar a enzima em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se, a seguir, a atividade do sistema imobilizado.

De acordo com Tanaka e Kawamoto (1999) *apud* Neri (2008), as  $\beta$ -galactosidases de diferentes fontes foram imobilizadas por vários métodos para uma variedade de matrizes (Tabela 3), incluindo aprisionamento, ligação cruzada, adsorção, ligação covalente ou combinação destes métodos. Uma vez que cada método tem suas vantagens e desvantagens, a escolha do método de imobilização adequada depende da enzima (propriedades diferentes de várias  $\beta$ -galactosidase, tais como peso molecular, comprimento da cadeia de proteínas, e a posição do sítio ativo), matriz, as condições de reação, reator e outros fatores.

Tabela 3 -  $\beta$ -galactosidases de origens diferentes imobilizadas por vários métodos para uma variedade de matrizes

Métodos de imobilização	Matrizes	Fonte de enzima
Ligaçāo covalente	mPOS-PVA	<i>K. lactis</i>
	Suportes óxidos	<i>K. marxianus</i>
	Quitosana	<i>A. oryzae</i>
Aprisionamento	Alginato-carragenan	<i>K. fragilis</i>
	Lipossomas	<i>E. coli</i>
	Álcool polivinil	<i>A. orizae</i>
Adsorção física	Monolth cerâmica	<i>A. niger</i>
	IMAC	<i>Tremus s.p</i>
	Policloreto de vinilo	<i>B. circulans</i>
Ligaçāo cruzada	Gelatina com glutaraldeído	<i>E. coli</i>
	Gel de poliacrilamida	Feijão Chichen
	Gelatina-celulose	<i>K. lactis</i>

Fonte: Neri (2008).

### 2.9.3 Efeitos causados pela imobilização da enzima

Segundo Vitolo (2001) ao se agregar uma enzima a um material inerte, por mais suave que seja o procedimento, é razoável se esperar algum tipo de efeito sobre a sua atividade catalítica, a qual está intimamente relacionada com a estrutura da macromolécula. Dentre os vários efeitos que a imobilização pode causar destacam-se:

a) Efeitos estéricos e conformacionais: Quando a enzima ligada ao suporte, pode sofrer alguma mudança na conformação, o que poderá abalar sua eficiência catalítica. Além disso, como o processo de interação enzima suporte é quase aleatório, poderá suceder que a região do sítio ativo se torne menos acessível ao substrato (impedimento estérico), o que acarreta, também uma queda na

atividade. Esses efeitos são de difícil quantificação, e para minimizá-los o único modo é o de padronizar o melhor possível os procedimentos de imobilização.

b) Efeitos de microambiente: Quando a molécula enzimática é ligada a um suporte sólido inerte, ela vai ficar sujeita a uma circunvizinhança, algo diferente do que quando se acha livre. Esse fato poderá se refletir sobre os valores dos parâmetros cinéticos.

c) Efeitos difusionais: Quando a enzima é imobilizada sobre ou dentro de um suporte sólido, o substrato deve se difundir do seio da solução até o sítio ativo da enzima.

#### **2.9.4 Imobilização de $\beta$ -galactosidase em diferentes suportes**

Neri *et al.* (2008) estudaram a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* por ligação covalente em compósito de polisiloxano-álcool polivinílico magnetizado (mPOS–PVA) ativado em glutaraldeído. As condições ótimas de pH e temperatura obtidas para o derivado e a enzima solúvel foram iguais, pH 5,0 e temperatura 50°C. Os valores obtidos de  $K_m$  e  $K^{app}_m$  para as enzimas solúvel e imobilizada foram de  $2.525 \pm 0,184$  mM e  $2.296 \pm 0,208$  mM, respectivamente. Houve um aumento na energia de ativação da enzima solúvel para imobilizada, de  $25,5 \pm 8,7$  para  $32,6 \pm 5,8$   $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com os autores, essa diferença não foi estatisticamente diferente segundo o teste estatístico t-Student ( $F = 1.200$ ;  $p > 0.05$ ). O derivado mPOS–PVA apresentou elevada estabilidade térmica e operacional em relação a enzima solúvel, pois manteve metade de sua atividade inicial após 20 ciclos a 25°C. Além de ser eficiente na hidrólise da lactose do leite.

Nos estudos de Jochems *et al.* (2011), a enzima  $\beta$ -galactosidase foi imobilizada por adsorção em uma matriz de membrana constituída de dióxido de zircônio. De acordo com os autores, a máxima concentração de enzima adsorvida foi de  $1,6$  g/m $^2$ , embora a máxima atividade fosse alcançada após a adsorção de  $0,5$  g/m $^2$  de enzima ( $3.500$   $\mu\text{mol}_{\text{o-nitrofenol}}/\text{min} \cdot \text{m}^2$ ). Esse resultados indicaram que elevados parâmetros de imobilização são obtidos em condições extremas de pH (8,0-9,0) e temperatura (40 e 60°C), entretanto, elevada atividade não foi obtida nessas condições operacionais. Após a imobilização, não foi observada variação na

temperatura de máxima atividade, mantendo-se em 25°C para as enzimas solúvel e imobilizada. No caso do pH, os autores obtiveram valores de pH ótimo de 6,5 para enzima solúvel, e pH 7,0 para a enzima imobilizada. Em relação aos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx}$  durante a hidrólise da lactose, foi observado aumento de  $26,2 \pm 4,9$  mM para  $195,4 \pm 78,2$  mM para as enzimas solúvel e imobilizada, respectivamente. Os valores de  $V_{máx}$  obtidos foram próximos,  $18.909 \pm 1.983$  mol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> para a enzima solúvel e  $17.928 \pm 4.741$  mol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> para a enzima imobilizada.

Dwevedi e Kayastha (2009) avaliaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Pisum sativum* (PsBGAL) em duas matrizes distintas: Sephadex G-75 e Quitosana. Segundo os autores, foram obtidos valores de eficiência de imobilização próximos para ambas as matrizes de 75,66% e 75,19% nos suportes de sephadex G-75 e quitosana, respectivamente. Entretanto, foi observado que houve diferenças nas propriedades físico-químicas dos derivados Sephadex-PsBGAL e Quitosana-PsBGAL. O derivado Quitosana-PsBGAL é o derivado mais indicado para aplicações industriais baseado nos seu valores de pH (4-4,4) ótimo para hidrólise da lactose em relação ao derivado Sephadex-PsBGAL (pH 4,0). Em relação a temperatura ótima, o derivado Quitosana-PsBGAL apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 60-65°C, enquanto que o derivado Sephadex-PsBGAL apresentou temperatura ótima em 55°C. Em relação aos parâmetros cinéticos, os autores não observaram mudança significativa nos valores de  $K_m$  para o derivado Quitosana-PsBGAL, por outro lado, para o derivado Sephadex-PsBGAL, os valores de  $K_m$  dobraram em relação à enzima solúvel para os substratos ONPG e lactose. Houve uma queda de 79 e 86% nos valores de  $V_{máx}$  (em relação a enzima livre) para o derivado Quitosana-PsBGAL após a hidrólise dos substratos ONPG e lactose, respectivamente. No caso do derivado Sephadex-PsBGAL, a queda nos valores de  $V_{máx}$  foram de 45% and 57%, para os substratos ONPG e lactose, respectivamente. Os autores destacaram que se observou perda de atividade do derivado Quitosana-PsBGAL após 40 dias de estocagem a 4°C, enquanto que para o derivado Sephadex-PsBGAL isso foi observado após 10 dias de estocagem na mesma temperatura. Houve perda de atividade de 50% dos derivados após estocagem de 12 e 46 dias a 4°C, para Sephadex-PsBGAL e Quitosana-PsBGAL, respectivamente. O derivado Quitosana-PsBGAL apresentou elevada taxa de hidrólise da lactose

presente no leite e soro do leite a 4 e 27°C em relação ao derivado Sephadex-PsBGAL. Para ambos os derivados, a taxa de hidrólise de lactose no soro do leite foi superior à hidrólise da lactose do leite.

A hidrólise do ONPG por  $\beta$ -galactosidase imobilizada em Sepharose CL-4B® foi investigada por Singh *et al.* (2010) em cinco líquidos iônicos (LI's) diferentes:  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$  e  $\text{N}(\text{CN})_2^-$ . O estudo foi realizado para determinar os fatores que afetam a taxa de hidrólise de ONPG assim como a variação de meio e ambiente em torno do complexo enzima-imobilizada e substrato. Os estudos envolvendo o comportamento cinético de Michaelis–Menten foram conduzidos em tampão fosfato na presença dos cinco líquidos iônicos. Para a enzima imobilizada na presença dos LI's, os valores de  $K_m$  obtidos foram baixos (0,36–1,2 mmol ONPG), enquanto que os valores de  $V_{\text{max}}$  (0,04–0,008  $\text{min}^{-1}$ ) foram maiores quando comparado aos valores obtidos em somente tampão fosfato. Segundo os autores, os resultados indicaram um aumento na eficiência da imobilização de  $\beta$ -galactosidase ao se utilizar os LI's. Na caso da enzima solúvel, os valores de  $K_m$  tornam-se superiores (0,45–4,96 mmol ONPG) em relação aos dados de  $K_m$  para a enzima imobilizada.

Marrioti *et al.* (2008) estudaram a hidrólise de lactose do soro de queijo em reator de leito fixo com  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em sílica. Os melhores resultados de atividade após a imobilização foram obtidos com a utilização de glutaraldeído na ativação do suporte. Maiores atividades (530-540 U/g) foram obtidas após a imobilização de enzima na faixa de concentração de 15-20  $\text{mg.g}^{-1}$  de suporte. Para melhorar a eficiência da hidrólise no reator de leito fixo, os autores realizaram diferentes tratamentos no soro para a eliminação de particulados (microfiltração, tratamento térmico e ultrafiltração). A ultrafiltração se destacou na remoção dos particulados e no melhor desempenho da enzima. A operação do reator por 51 dias alimentado por soro após ultrafiltração manteve a atividade de  $\beta$ -galactosidase em 197U/g, o que corresponde a 32% da atividade inicial.

### **3 MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

Os reagentes utilizados (lactose, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, sulfato de amônio, sulfato de manganês, dextrose, ácido acético e hidróxido de sódio) foram todos de padrão analítico. A quitosana em pó utilizada, com grau de desacetilação de 85,9%, foi adquirida junto a Polymar Ind. Ltda (Fortaleza, Ceará, Brasil). Glutaraldeído 25% (v/v), o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG), orto-nitrofenol (ONP) e a Alcalase foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### **3.2 Micro-organismos**

Neste trabalho, foram utilizadas cinco linhagens de *Kluyveromyces* para a seleção da melhor produtora de β-galactosidase, sendo três espécies de *Kluyveromyces marxianus* e duas de *Kluyveromyces lactis*. As espécies de *K. marxianus* utilizadas foram: *K. marxianus* LAMI CE 025 (isolada de um efluente da Refinaria de Petróleo LubNor - Petrobrás, Ceará, Brasil e depositada na coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ecologia e Biotecnologia (LEMBiotech) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará); *K. marxianus* CCA 510 (leveduras killer do banco de culturas do LAMAM - Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular, UFSCAR, Araras-SP); *K. marxianus* ATCC 36907 (adquirida da Coleção de Culturas Tropicais - CCT na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” Campinas - SP). E as cepas de *Kluyveromyces lactis* foram *K. lactis* NRRL Y-1564 e *K. lactis* NRRL Y-4087, ambas doadas pelo USDA (United States Department of Agriculture) pertencentes à coleção de cultura da ARS (Agricultural Research Service). As culturas estoques foram mantidas em meio ágar YEPD (ágar 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 20 g/L) a 4°C.

### **3.3 Soro de leite**

O soro de leite em pó foi cedido gentilmente pela Indústria Alibra Ingredientes Ltda (Campinas-SP) e utilizado para o cultivo das cepas consumidoras de lactose. Segundo as especificações técnicas do fabricante, o soro continha a seguinte composição (100 g): carboidratos 74 g; proteínas 11 g; gorduras totais 1g; gorduras saturadas 0,5 g; colesterol 6,0 mg; cálcio 796 mg, ferro 0,90 mg e sódio 1080 mg, pH variando de 6,0 a 7,0 e acidez titulável (% ácido lático) máxima de 2,5%, se tratando de soro doce. O soro de leite em pó foi então pesado e diluído em água destilada na concentração de 50 g/L em balão volumétrico, concentração essa que se aproxima da concentração do soro de leite normalmente obtido nas indústrias de laticínios.

### **3.4 Seleção de leveduras consumidoras de lactose em meio sintético**

Inicialmente avaliou-se as leveduras que consumiam lactose utilizando o meio de cultivo segundo Manera *et al.* (2008). Posteriormente, avaliou-se a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase utilizando o soro de leite como fonte de carbono. Composição do meio: lactose PA 10 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 g/L e extrato de levedura 1 g/L diluídos em solução tampão fosfato de potássio 0,2 M a pH 5,5 e esterilizado a 115°C por 15 min. Para obtenção do inoculo utilizou-se o mesmo meio, sendo o cultivo realizado em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio e incubados a 30°C, 180 rpm por 24 h. A concentração de inóculo utilizada foi 10% (v/v), com a densidade ótica igual a  $1,0 \pm 0,1$  lida a 620 nm. A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio a 30°C, 180 rpm por 48 h. Após esse período, analisou-se o crescimento celular, pH e concentração de açúcares redutores.

### **3.5 Estudo da influência do pré-tratamento do soro de leite na produção da enzima $\beta$ -galactosidase por *K. marxianus* ATCC 36907**

Ao se iniciar os cultivos, verificou-se que o soro de leite deveria passar por um pré-tratamento para a remoção das proteínas, uma vez que elas

precipitavam durante a esterilização do meio de cultivo. Essa precipitação dificultava a realização dos métodos analíticos que precisavam ser realizados para o acompanhamento do ensaio. Diante disso foi necessário estudar a influência do tipo de tratamento no crescimento celular e produção de enzima e, para tal fim, utilizou-se a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 como micro-organismo modelo.

Dois pré-tratamentos foram avaliados, o primeiro tratamento foi realizado de acordo com Santiago *et al.* (2004) e o segundo de acordo com Rech e Ayub (2007). No primeiro ensaio, utilizou-se para precipitação das proteínas do soro de leite, o ácido láctico comercial adquirido do fabricante Ipê Ingredientes. No segundo, utilizou-se uma protease comercial, Alcalase 2.4L da Sigma-Aldrich, para hidrólise das proteínas do soro de leite antes do processo de esterilização.

Após cada tratamento, o soro de leite foi suplementado com o intuito de aumentar a produção da enzima em estudo. Duas formas de suplementação foram estudadas: a primeira com 1 g/L de extrato de levedura e a segunda com 5 g/L de extrato de levedura e sais minerais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/L) adicionados ao soro de leite.

### **3.5.1 Pré-tratamento ácido do soro de leite**

O primeiro pré-tratamento ácido do soro de leite foi realizado de acordo com Santiago *et al.* (2004), precipitando as proteínas por aquecimento e acidificação até pH 4,8 com ácido láctico comercial, sob suave agitação. Inicialmente diluiu-se o soro numa concentração de 50 g/L de lactose em água destilada e colocou-se essa solução em Becker para aquecer em chapa aquecedora sob agitação até a temperatura de 85°C. Ao atingir-se essa temperatura, adicionou-se ácido láctico comercial até pH 4,8 e continuou-se aquecendo até 90°C, controlando a temperatura com auxílio de um termômetro. Ao atingir 90°C, o aquecimento e a agitação foram interrompidos e a solução foi mantida em repouso por 15 minutos, para que fosse cuidadosamente sedimentada as proteínas precipitadas. Então, o soro de leite pré-tratado foi filtrado em papel de filtro qualitativo, para evitar que as proteínas dissolvessem novamente a solução, pois os flocos formados eram bastante instáveis. Para a produção da enzima, duas suplementações foram testadas: na primeira ao soro de leite pré-tratado e filtrado, adicionou-se 1 g/L de extrato de

levedura para servir como fonte de nitrogênio e corrigiu-se o pH para 6,0 com KOH 4M. Na segunda suplementação, adicionou-se extrato de levedura 5 g/L e sais minerais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/L) e o pH foi corrigido para 6,0 com KOH 4M. Em seguida, o volume de 50 mL desse soro foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL e esterilizado a 115°C por 10 min.

### **3.5.2 Pré-tratamento enzimático do soro de leite**

O segundo pré-tratamento foi realizado segundo Rech e Ayub (2007), o soro também foi diluído em água destilada numa concentração de 50 g/L de lactose. Hidrolisou-se as proteínas do soro de leite utilizando uma protease comercial (Alcalase 2.4L) na concentração de 1 mL/L. Nessa hidrólise não há precipitação das proteínas como o método anterior. O soro de leite com a protease foi aquecido em banho-maria a uma temperatura de 50°C por 30 minutos para a hidrólise. Também foram estudadas duas suplementações do soro de leite, seguindo a mesma metodologia citada no item 3.5.1.

## **3.6 Produção da enzima $\beta$ -galactosidase**

### **3.6.1 Preparo do inóculo**

Para a obtenção do inóculo as cepas de *Kluyveromyces* utilizadas nesse estudo foram repicadas em meio ágar YEPD (contendo: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) e incubadas a 30°C em estufa bacteriológica por 24 h. Em seguida, transferiu-se três alçadas das colônias isoladas para 50 mL de soro de leite pré-tratado e suplementado com 1 g/L de extrato de levedura previamente esterilizados a 115°C por 10 min. O cultivo do inóculo foi conduzido em um agitador orbital a 30°C e 180 rpm por 24 h.

### **3.6.2 Condições de cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase**

Ao soro de leite pré-tratado e suplementado, adicionou-se 10% (v/v) do inóculo com a densidade ótica (DO) ajustada na faixa de  $1,0 \pm 0,1$  lida a 620 nm em

espectrofotômetro. A produção da enzima  $\beta$ -galactosidase foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de soro de leite e incubados em agitador orbital a 30°C e 180 rpm por 30 h. Em tempos pré-definidos, amostras foram retiradas para análise de biomassa, determinação da atividade enzimática, pH e concentração de açúcares redutores. Os ensaios foram realizados em duplicita para cada micro-organismo testado.

### **3.7 Extração da enzima $\beta$ -galactosidase**

A enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por leveduras do gênero *Kluyveromyces* é intracelular, sendo necessário a permeabilização ou rompimento das células das leveduras para a liberação da enzima.

A extração da enzima foi realizada segundo Inchaurrondo; Yantorno e Voget (1994) com modificações. Inicialmente, retirava-se uma alíquota de 20 mL do reator e transferia-se este volume para um tubo de falcon para a separação das células por centrifugação a 10.000g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para as análises de pH e concentração de lactose e as células lavadas com 20 mL de água destilada gelada, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após a lavagem das células, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspêndido em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> pH 6,6, para obter uma concentração de 2,9 mg de células por mL de tampão. Em seguida, a suspensão de células foi agitada em vortex e transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se ao volume ressuspêndido, 10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de tolueno. Posteriormente, os frascos foram colocados em mesa agitadora orbital a 37°C, 180 rpm por 20 minutos. Após esse tempo, a suspensão foi novamente centrifugada a 10.000g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore 0,45  $\mu$ m para solventes orgânicos, e o extrato enzimático filtrado foi submetido a determinação da atividade enzimática.

### **3.8 Estudo da metodologia da determinação da atividade enzimática**

Para a determinação da atividade hidrolítica da enzima, utilizou-se o substrato sintético *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) adquirido da Sigma-

Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Inicialmente, duas metodologias foram avaliadas: a metodologia 1 descrita por Vieira (2009) e a metodologia 2 descrita por Inchaurrendo; Yantorno e Voget (1994).

Na metodologia 1, segundo Vieira (2009), a atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada através da hidrólise de *o*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 25°C e pH 7,0. Uma amostra de 50  $\mu$ L da enzima obtida na extração, foi adicionada a uma cubeta com 2 mL de solução de ONPG 13 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 contendo 2 mM de  $MgCl_2$ . A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm durante 5 minutos. O cálculo da atividade enzimática para a metodologia 1 foi conduzido de acordo com a Equação 1.

$$At \text{ (U/mL)} = \frac{tg \times V_{\text{reator}}}{V_{\text{enzima}}} \quad (1)$$

Sendo:  $At$  = atividade enzimática;  $tg$  = tangente de curva de hidrólise;  $V_{\text{reator}}$  = volume total do reator em mL;  $V_{\text{enzima}}$  = volume de enzima em mL.

Na metodologia 2, segundo Inchaurrendo, Yantorno e Voget (1994) a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase frente a *o*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) foi determinada a 37°C e pH 6,6. Para tanto, 2 mL de ONPG 1,25 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM com  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0,1 mM a pH 6,6, foram adicionados em tubos de ensaios. Em seguida os tubos foram colocados no banho-maria a 37°C para equilibrar a temperatura e adicionou-se uma amostra de 50  $\mu$ L do extrato enzimático. Após 5 minutos, parou-se a reação pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M e a atividade foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm e calculada de acordo com Equação 2.

$$At \text{ (U/mL)} = \frac{A \times V_{\text{reator}}}{\varepsilon \times 0,05 \text{ mL} \times 5 \text{ min}} \quad (2)$$

Sendo:  $At$  = atividade enzimática;  $A$  = absorbância lida;  $V_{\text{reator}}$  = 2,55 mL ( $V_{\text{reator}} =$ volume de ONPG (2 mL) + volume de amostra (0,05 mL) + volume de carbonato de sódio (0,5 mL));  $\varepsilon$  = coeficiente de extinção = 4,3 mol/cm;  $t$  = tempo de reação 5 min.

O coeficiente de extinção molar do produto o-nitrofenol (ONP) foi determinado experimentalmente segundo metodologia do FOOD CHEMICALS CODEX (1981), obtendo 4,3 mol/cm.

Uma unidade (U) de  $\beta$ -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto sob as condições do ensaio.

*Conforme apresentado no tópico de Resultados e Discussões, a metodologia mais adequada para a determinação da atividade enzimática foi a metodologia 2 (Inchaurreondo, Yantorno; Voget 1994), sendo a metodologia 1 foi utilizada somente na etapa de seleção de leveduras produtoras de  $\beta$ -galactosidase e todas as outras etapas realizadas neste estudo a atividade enzimática foi determinada utilizando a metodologia 2.*

### **3.9 Preparação e ativação do suporte para imobilização da enzima**

#### **3.9.1 Preparação das partículas de quitosana e ativação com glutaraldeído**

A preparação das partículas de quitosana seguida de ativação com glutaraldeído foram realizadas segundo a metodologia descrita por Budriene *et al.* (2005) e Vieira (2009).

O 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 a temperatura de 28°C. Posteriormente, 30 mL desta solução foi colocada em um reator a 50°C sob agitação mecânica por 5 minutos para estabilizar a temperatura da solução. Em seguida, adicionou-se 45 mL de KOH 0,5 M, como agente coagulante, mantendo a agitação por mais 30 minutos.

Para ativação da solução de quitosana coagulada com KOH, utilizou-se glutaraldeído (0,8% v/v). Após 30 minutos de ativação sob 50°C as partículas foram lavadas com de água destilada a 25°C no intuito de remover o excesso de glutaraldeído e posteriormente secas a vácuo.

### **3.10 Imobilização da $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y1564 em gel de quitosana ativado com glutaraldeído**

A  $\beta$ -galactosidase foi imobilizada em gel de quitosana ativado com glutaraldeído, utilizando uma carga enzimática de 10 mg de proteína por grama de suporte. A imobilização foi realizada em tampão fosfato de potássio 50 mM e 0,1 mM de  $MnCl_2$ , pH 7,0, a 25°C e diferentes tempos de incubação (5, 10 e 24h), sob agitação suave em agitador rotatório. Em paralelo ao processo de imobilização fez-se um ensaio controle (enzima solúvel e tampão de imobilização), para acompanhar a estabilidade da enzima durante todo o processo de imobilização. Antes e após a imobilização, determinou-se a atividade enzimática no sobrenadante. Após a imobilização, o derivado (gel de quitosana mais enzima) foi lavado exaustivamente com água destilada e secou-se a vácuo.

### **3.11 Determinação dos parâmetros de imobilização**

#### **3.11.1 Determinação do rendimento de imobilização**

Após a medida da atividade enzimática inicial ( $At_i$ ) e final ( $At_f$ ) no sobrenadante e no branco, determinou-se a atividade enzimática remanescente no sobrenadante ( $At_i - At_f$ ). Com esse dados calculou-se o rendimento de imobilização (RI) de acordo com a Equação 3.

$$RI (\%) = \frac{At_i - At_f}{At_f} \times 100 \quad (3)$$

#### **3.11.2 Determinação da Atividade recuperada**

A atividade teórica ( $At_t$ ) de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana foi calculada como o produto da atividade enzimática da carga oferecida por unidade de massa do suporte ( $At_{ofe}$ ) e o rendimento de imobilização, conforme a Equação 4. Após a medida da atividade da enzima imobilizada por unidade de massa de suporte

ou atividade enzimática do derivado ( $At_d$ ), a atividade recuperada foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$At_t = RI \times At_{ofe} \quad (4)$$

$$At_r(\%) = \frac{At_d}{At_t} \times 100 \quad (5)$$

### 3.12 Determinação do pH ótimo da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

Para se determinar o pH ótimo da enzima  $\beta$ -galactosidase (solúvel e imobilizada) determinou-se a atividade de hidrólise de ONPG a 37°C em reator, variando-se o pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) do tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1mM de  $MnCl_2$  no qual o substrato sintético ONPG foi dissolvido.

### 3.13 Determinação da temperatura ótima da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

Para se determinar a temperatura ótima da enzima  $\beta$ -galactosidase (solúvel e imobilizada) determinou-se a atividade de hidrólise do substrato ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio contendo 0,1mM de  $MnCl_2$  a pH 6,6 pela enzima  $\beta$ -galactosidase em diferentes temperaturas (25, 30, 37, 45, 50, 52, 55 e 60°C). Para a enzima imobilizada, pesava-se 0,2 g do derivado e adicionava-se ao reator contendo 10 mL de ONPG em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1 mM de  $MnCl_2$ , a reação foi realizada através da agitação mecânica de uma haste e após o tempo de 5 minutos de reação, retirava-se uma alíquota de 2 mL com filtro na ponteira e colocava-se na cubeta, acrescentando-se 0,5 mL de carbonato de sódio 1M para paralisar a reação e então era lida a absorbância a 420 nm. Para a enzima solúvel, adicionava-se 2 mL de ONPG em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1 mM de  $MnCl_2$  em tudo de ensaio de 15 mL e colocava-os em banho-maria nas temperaturas estudadas, após esse tempo adicionava-se 50  $\mu$ L de extrato enzimático e marcava-se o tempo por 5 minutos para a hidrólise do ONPG pela

enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel. Após os 5 minutos de hidrólise interrompia-se a reação pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M e a absorbância foi lida a 420 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata para a  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada.

### 3.14 Estudo da estabilidade térmica $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

Para se avaliar a estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada, amostras foram incubadas a 40, 50 e 60°C em banho-maria. Periodicamente, as amostras foram retiradas e suas atividades residuais foram determinadas. Após o cálculo de todas as atividades iniciais e residuais, calculou-se a atividade relativa ( $At_{rel}$ ), conforme a Equação 6, que é definida como a razão entre a atividade enzimática do estado final ( $At_f$ ) e a atividade enzimática do estado inicial ( $At_i$ ), sendo que a atividade relativa no estado inicial é igual a 1,0.

$$At_{rel} = \frac{At_f}{At_i} \quad (6)$$

Para estimar a constante de desativação térmica ( $k_d$ ), o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) e o fator de estabilização (FE), utilizou-se os modelos de desativação térmica da atividade enzimática proposto por Sadana e Henley (1987) (Equação 7) e o modelo de 1<sup>a</sup> ordem (Equação 8), avaliando-se qual dos modelos melhor se ajustava aos dados experimentais.

$$At_r = (1 - \alpha) \times e^{-kd \times t} + \alpha \quad (7)$$

$$At_r = e^{-kd \times t} \quad (8)$$

Sendo:  $At_{rel}$  = Atividade relativa;  $\alpha$  = fração da enzima que perde atividade,  $k_d$  = constante de inativação térmica de primeira ordem e  $t$  = é o tempo em que a amostra permaneceu sob condição de temperatura.

Calculou-se também o tempo de meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) que é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial, expresso em unidade de tempo, foi calculado a partir da Equação 9, utilizando o parâmetro  $k_d$  estimado a partir das Equações 7 e 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{k_d} \quad (9)$$

Calculou-se também o Fator de estabilização (FE), que é definido como a razão entre os tempos de meia vida do derivado (enzima imobilizada) e da enzima solúvel, conforme apresentado na Equação 10.

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ derivado}}{t_{1/2} \text{ enzima solúvel}} \quad (10)$$

### 3.15 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos

Para determinar os parâmetros termodinâmicos, a entalpia de inativação ( $\Delta H^*$ ) e energia livre de Gibb's de inativação ( $\Delta G^*$ ) da enzima foram calculados para cada temperatura estudada de acordo com as Equações 11 e 12, respectivamente.

$$\Delta H^* = E_d - RT \quad (11)$$

$$\Delta G^* = RT \ln\left(\frac{k_d h}{kT}\right) \quad (12)$$

Na qual  $E_d$  é a energia de inativação térmica,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura em Kelvin,  $k_d$  é a constante de inativação térmica,  $h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$  J.s é a constante de Plank, e  $k = 1,3806 \cdot 10^{-23}$  é a constante de Boltzman. Além disso, a entropia de inativação ( $\Delta S^*$ ) da  $\beta$ -galactosidase foi calculada de acordo com a Equação 13.

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (13)$$

### 3.16 Hidrólise de lactose catalisada por $\beta$ -galactosidase solúvel

A conversão da lactose em glicose e galactose foi determinada utilizando 0,5 e 2,0 U de  $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. lactis* NRRL Y-1564. As reações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução de lactose (50 g/L) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> a 37°C, 180 rpm por 35 h em mesa agitadora orbital. A cada tempo pré-definido, retirou-se uma alíquota de 150  $\mu$ L de cada frasco e interrompeu-se a reação por aquecimento a 100°C em banho-maria por 1 minuto. Em seguida, determinou-se a concentração de glicose proveniente da hidrólise da lactose utilizando o kit enzimático de Glicose PAP Liquiform (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais).

### 3.17 Estabilidade operacional da enzima $\beta$ -galactosidase imobilizada

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi realizada usando 1 g do biocatalisador em ciclos sucessivos (10 ciclos) de hidrólise do substrato ONPG. As condições de ensaio foram as mesmas descritas no ensaio de atividade hidrolítica no item 3.19.6. No final de cada ciclo, a  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi removida do meio de reação, então lavou-se com tampão fosfato para remover qualquer substrato restante ou produto e secou-se sob vácuo. Em seguida, novamente a enzima foi submetida a um novo ciclo de hidrólise do ONPG. A atividade residual foi calculada como a atividade da enzima imobilizada medida após cada ciclo em relação a atividade da enzima imobilizada durante o primeiro ciclo.

### 3.18 Estabilidade de armazenamento da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

As amostras do biocatalisador (solúvel e imobilizada) foram armazenadas a uma temperatura de 4°C em tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7,0 e as suas

atividades hidrolíticas residuais foram determinadas após 93 dias para avaliar a estabilidade de armazenamento da enzima solúvel e imobilizada.

### **3.19 Métodos analíticos**

#### ***3.19.1 Determinação da concentração celular***

A concentração celular foi determinada através da densidade ótica (DO) medida a 620 nm, em espectrofotômetro (Spectronic Modelo Genesys, Série 20) e convertida em gramas por litro conforme curva padrão do micro-organismo avaliado.

#### ***3.19.2 Determinação do pH***

O pH foi determinado em aparelho medidor de pH da TECNAL.

#### ***3.19.3 Determinação da concentração de açúcares redutores***

As análises de açúcares redutores, expressos como lactose, foram determinadas segundo o método DNS (MILLER, 1959) e os resultados foram calculados através da curva padrão de lactose em g/L.

#### ***3.19.4 Determinação da concentração de lactose***

A concentração de lactose foi determinada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters (Modelo 2414) e uma coluna Aminex HPX-87H a 65°C, sendo o eluente  $H_2SO_4$  a 5 mmol/L e vazão de 0,5 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20  $\mu$ L e o tempo de análise foi de 30 minutos em duplicata. Para o cálculo da concentração de lactose utilizou-se uma curva de calibração da lactose PA.

### 3.19.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando como padrão albumina de soro bovino (ABS), construindo-se uma curva de calibração na faixa de concentração de 0 a 0,6 mg/mL e os resultados foram expressos em mg/mL de proteína.

### 3.19.6. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica da enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi determinada utilizando orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosideo como substrato a 37°C e pH 6,6, de acordo com a metodologia descrita por Inchaurondo; Yantorno e Voget (1994), com algumas modificações.

Para a enzima solúvel a metodologia seguida encontra-se detalhada no item 3.8. No entanto, para a enzima imobilizada, pesava-se 0,2 g do derivado e adicionava-se ao reator contendo 10 mL de ONPG em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1 mM de  $MnCl_2$ , a reação foi realizada através da agitação mecânica de uma haste e após o tempo de 5 minutos de reação, acrescentou-se 0,5 mL de carbonato de sódio 1M para paralisar a reação. Em seguida, retirava-se uma alíquota de 2 mL com filtro na ponteira e colocava-se na cubeta para ler a absorbância a 420 nm e determinava-se a atividade enzimática segundo a Equação 14.

$$At (U/g) = \frac{A \times V_{reator}}{\epsilon \times m_{DERIVADO} \times 5\text{min}} \quad (14)$$

Sendo: At= atividade enzimática; A = absorbância lida;  $V_{reator} = 10,5 \text{ mL}$  ( $V_{reator} = \text{volume de ONPG (10 mL) + volume de carbonato de sódio (0,5 mL)}$ );  $m_{DERIVADO} = \text{massa do derivado em g}$ ;  $\epsilon = \text{coeficiente de extinção} = 4,3 \text{ mol/cm}$ ; t= tempo de reação 5 min.

**3.19.7 Determinação dos parâmetros cinéticos durante o cultivo de *K. lactis* NRRL Y-1564 para a produção de  $\beta$ -galactosidase**

Os cálculos das velocidades específicas foram realizados de acordo com as Equações 15 a 17.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (15)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (16)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (17)$$

Sendo  $\mu_x$ ,  $\mu_s$  e  $\mu_p$  as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produto, respectivamente. O cálculo das derivadas das velocidades específicas foi realizado utilizando o software Origin versão 8.0.

Foram realizados os cálculos da produtividade de biomassa ( $P_x$ ) e da produtividade da enzima ( $P_p$ ) de acordo com as Equações 18 e 19, respectivamente.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (18)$$

Sendo:  $P_x$  = produtividade de biomassa num determinado tempo  $t$ ,  $X$  é a concentração de biomassa no tempo  $t$  e  $X_0$  é a concentração inicial de biomassa.

$$P_p = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (19)$$

Sendo:  $P_p$  = produtividade da enzima  $\beta$ -galactosidase num determinado tempo  $t$ ,  $P$  é a atividade enzimática no tempo  $t$  e  $P_0$  é a atividade enzimática inicial.

**3.19.8 Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) de hidrólise de ONPG catalisada por  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

Avaliou-se a influência da concentração de substrato na velocidade de hidrólise de ONPG (0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,25; 2,5; 3,5; 5,0 e 7,5) em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> a 37°C. Os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten (ver Equação 20) foram calculados por ajuste não linear do modelo aos pontos experimentais usando o software Origin 8.0.

$$v = \frac{V_{máx} \times S}{K_m + S} \quad (20)$$

Sendo:  $v$  = velocidade de hidrólise (mmol ONP/min),  $K_m$  = constante de Michaelis-Menten (mM),  $S$  = concentração de substrato e  $V_{máx}$  = velocidade máxima de reação (mmol ONP/min).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Seleção de leveduras consumidoras de lactose em meio sintético

A primeira etapa desse estudo consistiu em avaliar as cepas de *Kluyveromyces* que consumiram lactose presente no meio de cultivo segundo Manera *et al.* (2008) para posteriormente serem avaliadas como potenciais produtoras da enzima  $\beta$ -galactosidase em soro de leite. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos através da indicação de crescimento celular e consumo de lactose para as cepas avaliadas. Das cinco cepas de *Kluyveromyces* estudadas, as que apresentaram crescimento e consumo de lactose foram *K. marxianus* ATCC 36907, *K. lactis* NRRL Y-1564 e *K. lactis* NRRL Y-4087, as quais foram selecionadas para avaliar a produção da enzima de interesse em soro de leite. As cepas de *K. marxianus* CE 025 e CCA 510, apesar de apresentar crescimento, devido provavelmente à presença de extrato de levedura, não consumiram lactose durante o período avaliado e foram, portanto, excluídas do estudo.

Tabela 4 - Indicação de crescimento celular e consumo de lactose para diferentes espécies de *Kluyveromyces* cultivadas a 30°C e 180 rpm. O sinal positivo (+) indica que houve crescimento celular ou consumo de lactose e o sinal (-), que não houve crescimento celular ou consumo de lactose.

Micro-organismo	Produção de Biomassa	Consumo de Lactose
<i>K. marxianus</i> CE 025	+	-
<i>K. marxianus</i> CCA 510	+	-
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	+	+
<i>K. lactis</i> NRRL Y-1564	+	+
<i>K. lactis</i> NRRL Y-4087	+	+

#### **4.2 Estudo da influência do pré-tratamento do soro de leite na produção da enzima $\beta$ -galactosidase por *K. marxianus* ATCC 36907**

O pré-tratamento do soro de leite é uma etapa necessária para remoção de parte de sua fração protéica, podendo ser realizado através da precipitação das proteínas do soro por aquecimento e acidificação (SANTIAGO, 2004), ou utilizando a enzima comercial alcalase para evitar a precipitação das proteínas (RECH; AYUB, 2007). Nesta etapa utilizou-se a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 para se escolher o método de pré-tratamento a ser adotado, conforme descrito no item 3.5.

Na Tabela 5 observam-se os parâmetros avaliados durante o cultivo: crescimento celular, consumo de lactose e atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907 em soro de leite submetido a diferentes tratamentos. Ressalta-se ainda que avaliou-se a suplementação do soro pré-tratado com sais minerais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/L) e extrato de levedura (1 e 5 g/L).

Tabela 5 - Influência do tratamento do soro de leite no crescimento celular e produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por *K. marxianus* ATCC 36907 a 30°C e 180 rpm por 24h, pH 6,0. **Tratamento 1:** Acidificação e aquecimento do soro de leite suplementado com extrato de levedura 1 g/L. **Tratamento 2:** Acidificação e aquecimento do soro de leite suplementado com extrato de levedura 5 g/L e sais minerais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/L). **Tratamento 3:** Hidrólise das proteínas do soro de leite com Alcalase e suplementação com extrato de levedura 1 g/L. **Tratamento 4:** Hidrólise das proteínas do soro de leite com Alcalase e suplementação com extrato de levedura 5 g/L e sais minerais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/L).

Tratamento do Soro	Produção de Biomassa (g/L)	Consumo de Lactose (g/L)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Enzimática Específica (U/g <sub>cél.</sub> )
1	<b>5,53 ± 0,03</b>	<b>11,20 ± 0,03</b>	<b>0,51 ± 0,03</b>	<b>174,60 ± 0,03</b>
2	0,43 ± 0,02	3,97 ± 0,02	0,11 ± 0,02	38,88 ± 0,02
3	2,34 ± 0,03	9,93 ± 0,03	0,39 ± 0,03	134,08 ± 0,03
4	0,17 ± 0,02	5,72 ± 0,02	0,36 ± 0,02	125,48 ± 0,02

O tratamento com alcalase apresentou bons resultados, mas o custo do tratamento é mais elevado. Vale ressaltar que a suplementação com vários sais prejudicou o crescimento do micro-organismo e a produção da enzima provavelmente por alguma inibição.

Dos quatro métodos utilizados para o tratamento do soro de leite, o que mostrou melhor resultado foi o tratamento 1, quando se observou maior atividade enzimática, crescimento celular e consumo de lactose com 24h de cultivo.

Braga *et al.* (2008) estudaram a influência de diferentes técnicas de desproteinização do soro de leite como meio de cultura para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082. A produção da enzima foi realizada a 30°C e 180 rpm por 72 h. No tratamento termoácido a atividade específica foi de 480

U/g, no entanto, para o soro de leite tratado com alcalase, obtiveram uma atividade específica de 820 U/g, sendo os dois resultados superiores aos obtidos nesse estudo, que obteve-se uma atividade enzimática específica de 174,60 e 134,08 U/g<sub>cél.</sub> nos tratamentos termoácido e com alcalase, respectivamente.

Com base nestes resultados, as etapas seguintes deste estudo utilizou-se o soro de leite pré-tratado por acidificação e aquecimento, suplementado com extrato de levedura (1 g/L).

#### **4.3 Produção de $\beta$ -galactosidase utilizando soro de leite como fonte de carbono pelas cepas *K. lactis* NRRL Y-1564, *K. lactis* NRRL Y-4087 e *K. marxianus* ATCC 36907**

A Tabela 6 apresenta produção de biomassa, consumo de lactose e produção da enzima  $\beta$ -galactosidase após 24 h de cultivo, utilizando as cepas *K. lactis* NRRL Y-1564, *K. lactis* NRRL Y-4087 e *K. marxianus* ATCC 36907 em soro de leite pré-tratado (acidificação e aquecimento) e suplementado com 1 g/L de extrato de levedura, conforme selecionado no item 4.2.

Tabela 6 - Crescimento celular, consumo de lactose e atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida pelas leveduras *K. lactis* NRRL Y1564, *K. lactis* NRRL Y4087 e *K. marxianus* ATCC 36907 cultivadas em soro de leite a 30°C e 180 rpm por 24 horas.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Produção de Biomassa (g/L)</b>	<b>Consumo de Lactose (g/L)</b>	<b>Atividade Enzimática (U/mL)<sup>i</sup></b>	<b>Atividade Enzimática Específica (U/g<sub>cél.</sub>)</b>
<i>K. lactis</i> NRRL Y-1564	<b>2,70 ± 0,05</b>	<b>38,50 ± 0,05</b>	<b>0,73 ± 0,05</b>	<b>251,72 ± 1,5</b>
<i>K. lactis</i> NRRL Y-4087	1,08 ± 0,05	29,95 ± 0,05	0,20 ± 0,05	68,96 ± 1,5
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	0,43 ± 0,05	0,00 ± 0,05	0,05 ± 0,05	0,12 ± 0,05

(i) Metodologia de determinação da atividade enzimática segundo Vieira (2009)

Nessa etapa, observou-se que a levedura *K. lactis* NRRL Y-1564 apresentou uma maior produção de enzima  $\beta$ -galactosidase, medida através da atividade enzimática, obtendo aproximadamente 72,6% maior atividade comparada com a quantidade produzida por *K. lactis* NRRL Y-4087, e 93,15% comparada à quantidade produzida por *K. marxianus* ATCC 36907.

Inchaurrondo, Yantorno e Voget (1994) cultivaram várias espécies de *K. lactis* e *K. marxianus* em meio contendo lactose como fonte de carbono (20 g/L). Os valores que eles obtiveram para a atividade enzimática foram entre 0,7 e 1,3 U/mL para espécies de *K. lactis* e entre 0,7 e 1,0 U/mL para espécies de *K. marxianus*. Os valores da atividade enzimática para *K. lactis* foram inferiores aos obtidos neste estudo.

Braga *et al.* (2011) estudaram sete espécies de *Kluyveromyces* e selecionaram a *K. marxianus* ATCC 16045 como a melhor produtora da enzima  $\beta$ -galactosidase, utilizando meio de cultura contendo resíduos agroindustriais como água de parboilização de arroz e soro de leite, tendo como resultado máximo para atividade enzimática 10,4 U/mL, nas melhores condições do ensaio (concentração de lactose presente no soro de 120 g/L, 5 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de peptona, 15 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 30 g/L de resíduo de água da parboilização de arroz a pH 4,0). A atividade máxima obtida no estudo de Braga *et al.* (2011) foi superior a obtida neste trabalho, porém o meio de cultivo utilizado apresentava alta concentração de lactose e dos outros nutrientes, quando comparado ao meio utilizado neste trabalho.

Com base nos resultados deste estudo a levedura *K. lactis* NRRL Y-1564 foi a espécie selecionada para a realização dos ensaios posteriores.

#### **4.4 Estudo da metodologia de determinação da atividade enzimática**

Nos ensaios preliminares, a atividade enzimática foi quantificada a temperatura de 25°C de acordo com Vieira (2009), no entanto à medida que a revisão de literatura foi continuada, observou-se que outros estudos realizavam a quantificação de atividade enzimática a 37°C, diante disso foi realizado um teste para a escolha da metodologia de quantificação da atividade enzimática a 37°C. A

Tabela 7 apresenta os resultados da quantificação da atividade enzimática determinada por duas metodologias: (1) Vieira (2009) e (2) Inchaurrendo, Yantorno e Voget (1994), nos diferentes tempos de cultivo.

Tabela 7- Comparaçao da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida por *K. lactis* NRRL Y-1564 a 30°C e 180 rpm cultivada em soro de leite, determinada pelas metodologias: Metodologia 1 (VIEIRA, 2009) e Metodologia 2 (INCHAURRONDO, YANTORNO E VOGET, 1994).

Tempo de cultivo (h)	Metodologia 1		Metodologia 2	
	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Enzimática Específica (U/g <sub>cél.</sub> )	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Enzimática Específica (U/g <sub>cél.</sub> )
0	0,03 $\pm$ 0,005	10,34 $\pm$ 1,5	0,09 $\pm$ 0,035	31,03 $\pm$ 0,25
9	0,22 $\pm$ 0,05	75,86 $\pm$ 1,5	1,52 $\pm$ 0,25	524,14 $\pm$ 0,25
<b>12</b>	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>93,10 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>2,68 <math>\pm</math> 0,25</b>	<b>924,14 <math>\pm</math> 0,25</b>
24	0,73 $\pm$ 0,05	251,72 $\pm$ 1,5	2,14 $\pm$ 0,25	736,17 $\pm$ 0,25

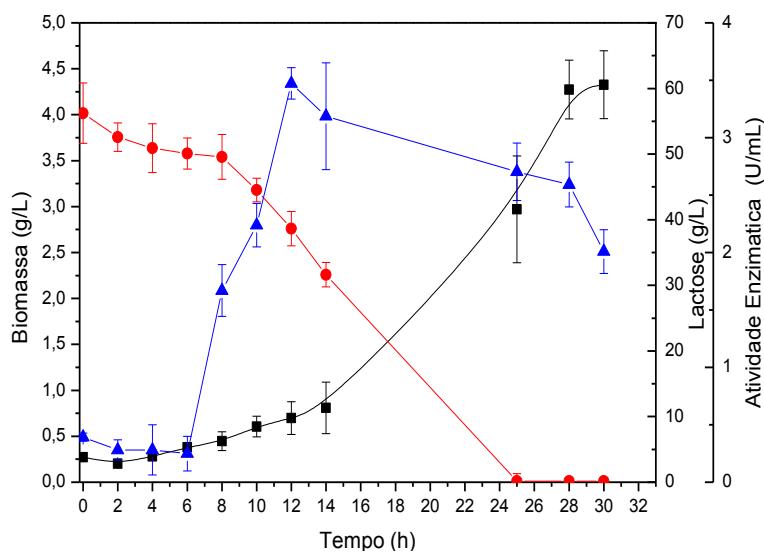
Observou-se na Tabela 7, que ocorreu um aumento na atividade enzimática até 12 horas de cultivo, quando se obteve 2,68 U/mL (924,14 U/g<sub>cél.</sub> de atividade enzimática específica) utilizando a metodologia 2 e 0,27 U/mL (93,10 U/g<sub>cél.</sub> de atividade enzimática específica), utilizando a metodologia 1. Em todos os tempos estudados, a atividade enzimática foi superior quando quantificada utilizando a metodologia 2, provavelmente devido a temperatura em que ela foi conduzida, ser mais próxima da temperatura ótima da enzima (ver item 4.8.1). Desta forma, a metodologia 2 foi escolhida para a determinação da atividade enzimática neste trabalho.

#### 4.5 Estudo cinético da produção de $\beta$ -galactosidase por *K. lactis* NRRL Y-1564

A Figura 5 apresenta o perfil do crescimento celular, consumo de lactose e atividade enzimática do cultivo do micro-organismo *K. lactis* NRRL Y-1564 em soro

de leite suplementado com extrato de levedura. A maior concentração de biomassa foi obtida com 30 horas (4,3 g/L), no qual houve o consumo total de lactose. Durante o cultivo acompanhou-se o pH e o mesmo permaneceu constante ( $5,23 \pm 0,17$ ). A máxima atividade ( $3,7 \pm 0,14$  U/mL) foi obtida com 12 horas de cultivo, porém nesse mesmo período ainda restavam aproximadamente 38 g/L de lactose no meio. Pode ser observado através de uma comparação do crescimento celular e da produção da enzima, como mostrado na Figura 5, que a produção do produto de interesse começou no início da fase exponencial e ocorreu paralela à cinética de crescimento da levedura, indicando que a produção é associada ao crescimento celular.

Figura 5 - Perfil do crescimento celular, consumo de lactose e atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida por *K. lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm. (▲) Atividade enzimática (U/mL); (■) Biomassa (g/L) e (●) Lactose (g/L).



Ornelas *et al.* (2008) estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase por *K. lactis*, no qual observaram o aumento da atividade da enzima também na fase exponencial de crescimento.

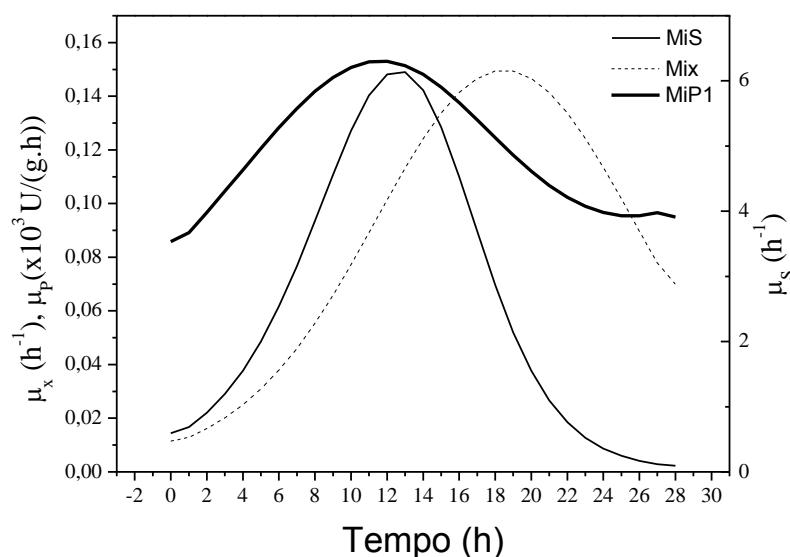
A atividade enzimática obtida neste estudo foi superior ao resultado obtido por Manera *et al.* (2008) com *K. lactis* NRRL Y-1564, em que a atividade máxima foi

de 0,70 U/mL com 24 h de cultivo e houve um pequeno decréscimo com o tempo. O meio de cultivo utilizado pelos autores continha uma concentração inicial de lactose de 10 g/L, tendo um consumo de lactose semelhante ao deste estudo.

Alejandra, Ramírez e Nilo Rivas (2003) otimizaram a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por *K. lactis* em bioreator, usando como meio de cultivo soro de leite desproteinizado contendo 48,5 g/L de lactose, suplementado com 1,5 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e obtiveram como condições ótimas: temperatura 30,3°C; pH 4,68; velocidade de agitação 191 rpm e um tempo de fermentação de 18,5 h. As atividades enzimáticas obtidas foram de 1,27 a 7,5 U/mL, resultado superior ao obtido nesse estudo quando se utilizou a *K. lactis* NRRL Y-1564. Cabe ressaltar que os autores realizaram o cultivo em biorretor com maior agitação 191 rpm e por um maior tempo 18,5h, sendo o cultivo neste estudo realizado em mesa agitadora (frascos agitados) a 180 rpm por 12h.

A Figura 6 apresenta as velocidades específicas de crescimento, consumo de lactose e produção de  $\beta$ -galactosidase.

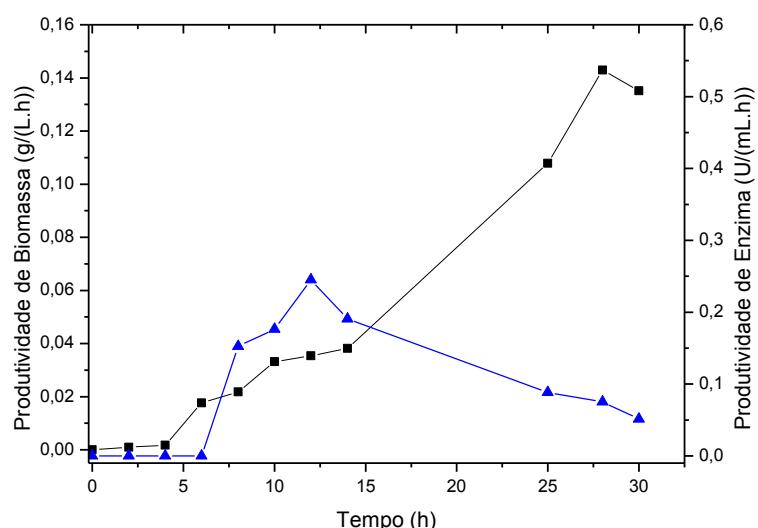
Figura 6 - Velocidades específicas para o crescimento de biomassa ( $\mu_x$ ), consumo de lactose ( $\mu_s$ ) e produção de  $\beta$ -galactosidase ( $\mu_p$ ) por *K. lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm. (---)  $\mu_x$  ( $\text{h}^{-1}$ ); (—)  $\mu_s$  ( $\text{h}^{-1}$ ) e (—)  $\mu_p$  ( $\text{U}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ).



A semelhança entre as curvas  $\mu_X$  e  $\mu_P$ , sugere que essa enzima é um metabólito primário produzido por esta levedura quando a lactose é fermentada (NEVES *et al.*, 2007). De acordo com Gaden (1959), os processos que mostram apenas um máximo para as curvas das taxas específicas, sendo as curvas praticamente coincidentes, são geralmente conhecidos como fatores de crescimento associados ao processo. Por conseguinte, é possível dizer que a síntese de  $\beta$ -galactosidase pela levedura *K. lactis* NRRL Y1564, neste estudo está associado ao crescimento, quando cultivada num meio contendo lactose como única fonte de carbono. Vários estudos (INCHAURRONDO, YANTORNO e VOGET, 1994; MAHONEY *et al.*, 1974; DICKSON; MARKIN, 1980) observaram o mesmo comportamento para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, obtendo uma atividade enzimática máxima no início da fase estacionária e diminuindo após essa fase, embora a lactose ainda esteja presente no meio de cultivo.

Na Figura 7, encontram-se os resultados de produtividade para biomassa e para a enzima  $\beta$ -galactosidase. A maior produtividade em biomassa (0,14 g/(L.h)) foi obtida após 28h de cultivo, enquanto que a maior produtividade de  $\beta$ -galactosidase foi alcançada em 12h (0,25 U/(mL.h)) de ensaio.

Figura 7 - Produtividades de biomassa e da enzima  $\beta$ -galactosidase por *K. lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite a 30°C e 180 rpm. (■) Biomassa e (▲)  $\beta$ -galactosidase.



## 4.6 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase em gel de quitosana

### 4.6.1 Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático contendo a enzima $\beta$ -galactosidase produzida por *K. lactis* NRRL Y-1564

A caracterização do extrato enzimático, inicialmente, deu-se pela determinação da atividade enzimática obtendo-se  $0,49 \pm 0,01$  U/mL e da concentração de proteína resultando em  $1,23 \pm 0,04$  mg/mL através de metodologias padrões de atividade enzimática (3.2.11) e pelo método de Bradford (1976).

### 4.6.2 Estudo do tempo de imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y-1564

A imobilização de  $\beta$ -galactosidase em gel de quitosana foi realizada com o objetivo de se obter um derivado com uma maior atividade, boa estabilidade térmica entre outras propriedades. A quitosana tem sido muito utilizada na imobilização de enzimas e a sua utilização proporciona resultados satisfatórios na estabilização de enzimas de várias fontes como lipases, tripsina, quimiotripsina e celulase (VIEIRA, 2009). No presente trabalho, para o ensaio de imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y-1564, foi empregado o gel de quitosana ativado com glutaraldeído.

A Tabela 8 mostra a influência do tempo de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase, que variou entre 5, 10 e 24h. Em paralelo, um ensaio controle foi conduzido, uma solução de enzima em tampão de imobilização foi mantida nas mesmas condições do processo da imobilização. Este ensaio teve como objetivo avaliar a existência de desnaturação e observou-se que a enzima  $\beta$ -galactosidase preservou 100% de sua atividade inicial durante todo o decorrer deste trabalho.

Tabela 8 - Parâmetros de imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y-1564, em quitosana ativada por glutaraldeído: Atividade do derivado ( $At_d$ ) e Atividade recuperada ( $At_r$ ), Rendimento de Imobilização (RI), Atividade enzimática no sobrenadante antes ( $At_i$ ) e após ( $At_f$ ) a imobilização. Condições de imobilização: 9 mL solução enzimática, em tampão fosfato de potássio 50 mM, contendo 0,1 mM de  $MnCl_2$ , pH 7,0, em contato com 1g de suporte a 25°C. Carga da enzima: 10 mg proteína/g suporte.

Tempo de contato (h)	$At_i$ (U/g)	$At_f$ (U/g)	$At_d$ (U/g)	$At_r$ (%)	RI (%)
5	6,40	2,26	0,32	7,73	64,71
<b>10</b>	<b>6,15</b>	<b>1,13</b>	<b>0,62</b>	<b>12,35</b>	<b>81,63</b>
24	5,39	0,03	0,53	9,87	99,54

Observa-se na Tabela 8, que a atividade remanescente no sobrenadante após a imobilização ( $At_f$ ) diminuiu ao longo do tempo, com o consequente aumento do rendimento de imobilização. No entanto, observa-se uma maior atividade catalítica para a enzima imobilizada ( $At_d$ ) após 10h. Este fato se reflete na atividade recuperada ( $At_r$ ). Baseado nestes resultados, os ensaios seguintes de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em quitosana, foram realizados durante 10h.

Uma das vantagens de imobilizar enzima em quitosana é o baixo custo do suporte, viabilizando o uso industrial do processo de imobilização. A imobilização torna-se uma importante estratégia para estabilizar a enzima e outra vantagem pertinente é a fácil purificação do produto formado, pois a enzima não está solubilizada no meio reacional permitindo fácil separação e reutilização.

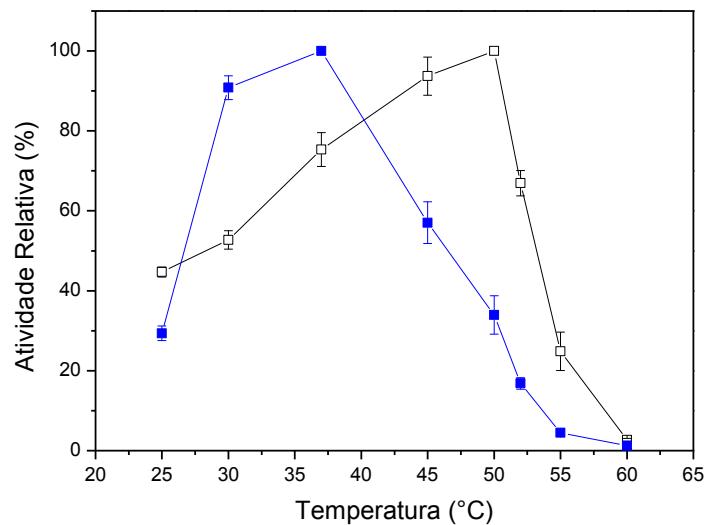
## 4.7 Caracterização da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

### 4.7.1 Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

A caracterização enzimática envolve o conhecimento das propriedades como, pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica da enzima facilitando sua aplicação. O estudo da atividade e estabilidade de enzimas é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, pois promove um maior conhecimento das propriedades da enzima obtida, além da possibilidade de contribuir com a viabilidade econômica de processos e de facilitar a utilização industrial (YU; LI, 2006).

O efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel pode ser observado na Figura 8. Sabe-se que com o aumento da temperatura, a velocidade da reação também aumenta. Contudo, devido à frágil estrutura das enzimas, ela pode sofrer alteração conformacional, perdendo a sua atividade catalítica. Para verificar a influência da temperatura sobre a atividade catalítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada, a hidrólise do ONPG foi realizada no intervalo de 25 a 60°C, durante 5 minutos. Para a enzima solúvel, observa-se que a máxima atividade foi obtida a 50°C, resultado bem próximo ao reportado por Vieira (2009) quando imobilizou a  $\beta$ -galactosidase comercial de *K. fragilis* (Lactozym 3000 L), que foi de 45°C para as enzimas solúvel e imobilizada. Observa-se ainda na Figura 8, que após 50°C, a enzima solúvel começou a apresentar desnaturação chegando à total inativação a 60°C.

Figura 8 - Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 adicionado de 0,1 mM  $MnCl_2$ . (□) enzima solúvel; (■) enzima imobilizada em gel de quitosana.



No caso da enzima imobilizada, a máxima atividade relativa foi obtida à temperatura de 37°C. Isso pode ser atribuído à possibilidade de que algumas enzimas não estariam ligadas covalentemente ao suporte, estando somente adsorvidas ou ligadas fracamente. Nesse caso, o aumento da temperatura pode ter favorecido a dessorção dessa enzima diminuindo a atividade enzimática.

Numanoglu e Sungur (2004) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* ATCC 8538 em gelatina e obtiveram atividade máxima a temperatura de 40°C para enzima imobilizada e 50°C para enzima solúvel, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

Ansari e Husain (2011) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozim 5000) em concanavalina A em camadas de nanopartículas de óxido de alumínio, e obtiveram atividade máxima na temperatura de 40°C tanto para a enzima solúvel quanto para a imobilizada, resultados diferenciados deste estudo para a enzima imobilizada, porém semelhante ao obtido para a enzima solúvel.

Nos estudos de Campelo *et al.* (2011) a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* (Lactozym 3000L) solúvel e imobilizada em Eupergit C foi caracterizada quanto ao

perfil da temperatura. Os autores observaram atividade máxima em 45°C para ambas as enzimas, resultados diferentes aos perfis cinéticos deste estudo.

Manera (2010) caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase obtida da permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e obtiveram a atividade máxima em pH 6,6 e temperatura de 50°C, sendo esses resultados condizentes com os resultados obtido neste estudo para a enzima solúvel.

Nos estudos de Pinhos e Passos (2011) foram avaliadas as propriedades cinéticas da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, onde obtiveram a atividade máxima na faixa de temperatura de 40 a 45°C, sendo os resultados bem próximos aos obtidos neste estudo.

Song *et al.* (2010) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em sílica gel ativada com glutaraldeído e na caracterização da enzima determinaram a atividade máxima a 37°C, resultado semelhante ao obtido deste estudo.

Braga *et al.* (2009) realizaram a caracterização parcial da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. marxianus* ATCC 16045 e mostraram que os melhores resultados obtidos para temperatura ótima encontravam-se na faixa entre 45 e 50°C para a enzima solúvel, resultados aproximados aos deste estudo.

Neri *et al.* (2008) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* (Novozymes) em um composto magnético polissiloxane-polivinil álcool (mPOS-PVA) e determinaram a atividade máxima em pH 6,5 e temperatura de 50°C para enzima solúvel, resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo.

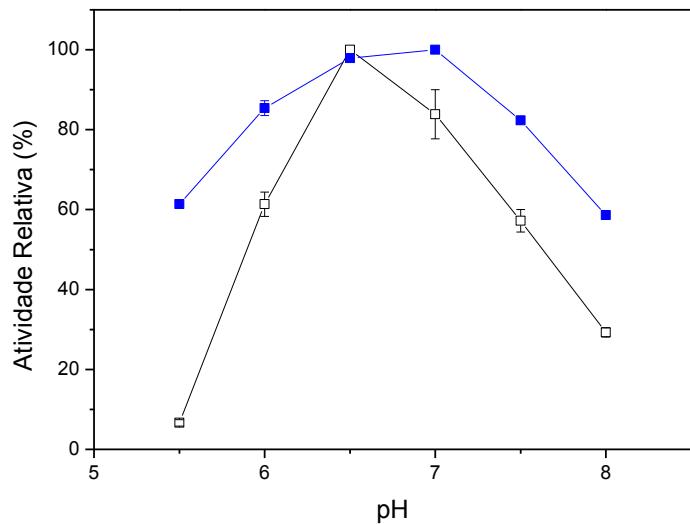
O'Connell e Walsh (2007), determinaram as propriedades da  $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. marxianus* DSM 5418 e obtiveram temperatura ótima de 37°C.

Alejandra, Ramírez e Nilo Rivas (2003) caracterizaram parcialmente a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e obtiveram uma atividade enzimática máxima a uma temperatura de 60°C para enzima solúvel, resultado diferente ao deste estudo.

#### 4.7.2 Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

A Figura 9 apresenta a influência do pH sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM adicionado de 0,1 mM de  $MnCl_2$  a 37°C.

Figura 9 - Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada na hidrólise de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM adicionado de 0,1 mM de  $MnCl_2$  à 37°C. (□) enzima solúvel; (■) enzima imobilizada em gel de quitosana.



Pode-se verificar que em pH 5,5 a enzima solúvel apresenta baixa atividade (6,6%), em relação a enzima imobilizada (61%). Tal como foi relatado em outro estudo (ZHOU e CHEN, 2001), a enzima solúvel exibiu uma atividade baixa no pH de 5,5 porque possui um ponto isoelectrônico (PI) de 5,42. Com o aumento do valor do pH, ocorreu um aumento na atividade relativa da enzima solúvel, alcançando um máximo em pH 6,5, enquanto que para a enzima imobilizada, a maior atividade relativa foi obtida na faixa de 6,0-7,0.

Observa-se na Figura 9 que com a imobilização da enzima houve um aumento na faixa de pH da enzima imobilizada comparando-se com a faixa da enzima solúvel que apresentou um pico num único valor de pH. Essa ampliação na

faixa do pH de atuação da enzima favorece uma melhor aplicação comercial, reduzindo custos com correções durante o processo.

Ansari e Husain (2011) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozim 5000) em concanavalina A em camadas de nanopartículas de óxido de alumínio, e obtiveram atividade máxima em pH 7,0 para as enzimas solúvel e imobilizada.

Campelo *et al.* (2011) caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* (Lactozym 3000L) livre e imobilizada em Eupergit C e determinaram a atividade máxima em pH 6,6 para ambas as enzimas, resultados semelhantes a esse estudo para a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel.

Nos estudos de Pinho e Passos (2011) a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* apresentou atividade máxima numa faixa de pH de 6,2 a 6,6 para a  $\beta$ -galactosidase solúvel.

Vieira (2009) relatou em seus estudos que a enzima comercial  $\beta$ -galactosidase de *K. fragilis* (Lactozym 3000 L) obteve a faixa de pH de máxima atividade da enzima solúvel e imobilizada entre 6,5 e 7,0, com o máximo valor obtido em pH 7,0 para ambas as enzimas, e ainda destacou que a enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, não teve suas propriedades catalíticas alteradas na faixa de pH entre 5,5 e 7,5.

Braga *et al.* (2009), realizaram estudos com  $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. marxianus* ATCC 16045, e obtiveram uma atividade enzimática máxima em pH 7,3.

O'Connell e Walsh (2007) obtiveram para  $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. marxianus* DSM 5418 um pH ótimo de 6,8 com 50% de atividade residual entre pH de 5,6 a 7,8, resultado semelhante ao obtido neste estudo para a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel que foi pH 6,5.

Alejandra, Ramírez e Nilo Rivas (2003) caracterizaram parcialmente a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e determinaram uma atividade enzimática máxima em pH 6,2 para enzima solúvel.

Nos estudos de Samoshina e Samoshin (2005) foram comparados dados publicados para o pH e temperatura de ótima de  $\beta$ -galactosidase de 43 leveduras diferentes. Os autores relatam que o pH ótimo variou entre 3,9 e 7,5 e a temperatura entre 30 e 55°C. Para as enzimas produzidas por espécies de *Kluyveromyces*, o

ótimo pH variou de 6,2 a 7,5 e temperatura de 30 a 52°C, estando os resultados obtidos neste trabalho que utilizou a levedura *K. lactis* NRRL Y-1564 para produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase na faixa citada.

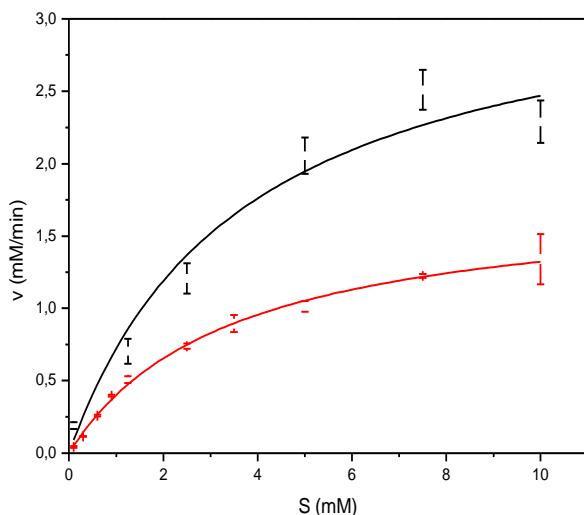
#### **4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{máx}$ para a $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

Sabe-se que  $V_{máx}$  não é uma característica fundamental da enzima, pois depende da sua pureza e concentração, já a constante de Michaelis-Menten, representa a afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor for o valor de  $K_m$  maior será esta afinidade. A estimativa de  $K_m$  pode ser afetada por vários fatores incluindo a origem microbiana da enzima; as condições experimentais, tais, como, temperatura, pH, concentração de substrato e produto, e o tipo de substrato empregado; e os diferentes métodos para cálculo de  $K_m$ , se for linearização ou regressão não linear (SAMOSHINA; SAMOSHIN, 2005).

Neste estudo avaliou-se a cinética de hidrólise de ONPG catalisada por  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada. As constantes do modelo de Michaelis-Menten foram calculadas por ajuste não linear da equação de Michaelis-Menten aos dados experimentais. Os resultados obtidos para  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada estão apresentados na Figura 10.

Foram obtidos para a enzima solúvel os valores de  $K_m = 3,34 \pm 0,3$  mM e  $V_{máx} = 1,78 \pm 0,07$  mM/min com um ajuste de  $R^2 = 0,997$ . Para a enzima imobilizada, os valores obtidos foram  $K_m = 3,68 \pm 1,84$  mM e  $V_{máx} = 3,38 \pm 0,77$  mM/min com um ajuste de  $R^2 = 0,95$ . Observa-se que os valores da constante  $K_m$  obtidos são próximos, indicando que a imobilização não dificultou o acesso da enzima ao substrato, aparentemente não existindo efeitos difusionais. A constante cinética que representa a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) da  $\beta$ -galactosidase aumentou duas vezes em relação à enzima solúvel. Porém, a carga enzimática usada neste trabalho foi diferente (0,03 U para a enzima solúvel e 0,04 U para a enzima imobilizada), não permitindo uma comparação direta entre estas constantes.

Figura 10 - Velocidade de reação da  $\beta$ -galactosidase solúvel e immobilizada de *K. lactis* NRRL Y-1564 em função da concentração de ONPG a 37°C. (■) Enzima immobilizada, (●) Enzima solúvel.



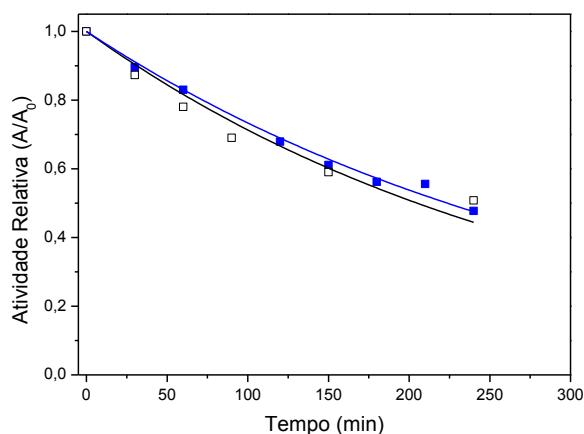
Os parâmetros cinéticos estimados neste trabalho são semelhantes aos que foram descritos por outros autores. Zhou e Chen (2001), determinaram os parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $V_{max}$ , para  $\beta$ -galactosidase produzido pela levedura *K. lactis* Maxilact 5000 LX na forma solúvel e immobilizada em grafite. Para a  $\beta$ -galactosidase solúvel, obtiveram  $K_m$  e  $V_{max}$  iguais a 1,74 mM e 77,45 ONP mmol/min.mg, respectivamente, porém para a enzima immobilizada obtiveram  $K_m$  igual a 9,34 mM e  $V_{max}$  igual a  $8,75 \times 10^{-3}$  mmol ONP/min.mg. Os autores observaram que o aumento no valor de  $K_m$  está relacionado com a dificuldade do acesso da enzima ao substrato, o que não foi observado no presente trabalho.

Nos estudos de Manera (2006) determinou-se os parâmetros cinéticos da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082, e obtiveram 10,0 mM e 7,1 mmol ONP/min.mL, para  $K_m$  e  $V_{max}$ , respectivamente, usando a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel, resultados superiores aos obtidos neste trabalho.

#### 4.7.4 Determinação da estabilidade térmica da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

A estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase foi estudada nas diferentes temperaturas de 40, 50 e 60°C, conforme Figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

Figura 11 - Estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada a 40°C. As curvas representam a aproximação do modelo de primeira ordem. (□) Enzima solúvel; (■) Enzima imobilizada em quitosana.



Na Figura 11, observa-se que as atividades relativas à 40°C para a enzima solúvel e imobilizada apresentaram perfis semelhantes, enquanto que na Figura 12, observa-se um decaimento mais acentuado para a enzima solúvel do que na enzima imobilizada, indicando que a imobilização favoreceu a estabilização da enzima, tornando a quitosana uma alternativa para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase. Na Figura 13, o decaimento da atividade relativa para ambas às enzimas solúvel e imobilizada é similar, sendo mais acentuado para a  $\beta$ -galactosidase solúvel.

Figura 12 - Estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase solúvel e immobilizada a 50°C. As curvas representam a aproximação do modelo de primeira ordem. (□) Enzima solúvel; (■) Enzima immobilizada em quitosana.

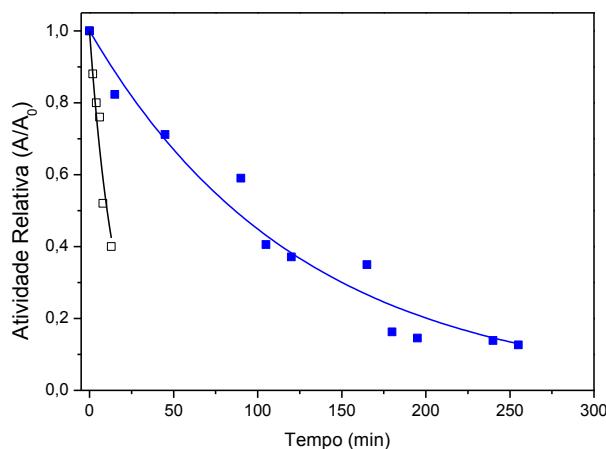
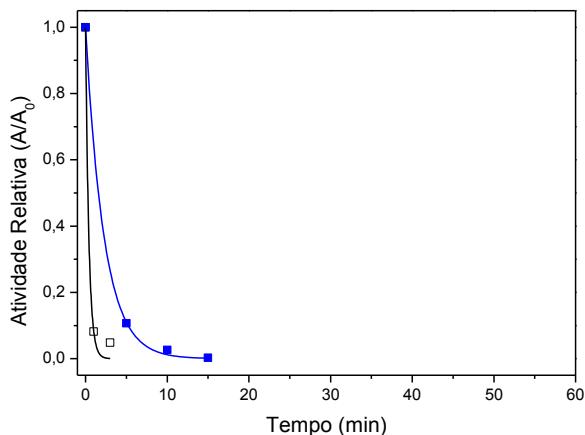


Figura 13 - Estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase solúvel e immobilizada a 60°C. As curvas representam a aproximação do modelo de primeira ordem. (□) Enzima solúvel; (■) Enzima immobilizada em quitosana.



Como se esperava, a enzima immobilizada apresentou maior estabilidade térmica. Na temperatura de 40°C (Figura 11) ainda possuía 50% de atividade com cerca de 250 minutos. Com esse mesmo período, aumentando a temperatura para 50°C (Figura 12), a mesma apresentou apenas 10% da sua atividade relativa e a 60°C (Figura 13) foi observado uma perda total da atividade em apenas 15 minutos.

Com objetivo de obter o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e o fator de estabilização da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi avaliado o modelo de Sadana e Hanley (1987), o qual apresentou um bom ajuste, porém, os desvios foram maiores que os próprios valores dos parâmetros (ver anexo). Com isso, o modelo de Primeira Ordem citado por Belver *et al.* (2008) foi avaliado e utilizou-se esse modelo para determinar a constante de desnaturação térmica ( $k_d$ ), que é necessária para o cálculo do tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), cujos valores constam na Tabela 9

Tabela 9 - Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( $k_d$ ), meia-vida e fator de estabilização em função da temperatura, para a enzima solúvel e imobilizada, aplicando modelo de primeira ordem.

T (°C)	$\beta$ -galactosidase	$k_d$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)	FE
40	Solúvel	0,0034 $\pm 0,0002$	0,9474	203,87	1,10
	Imobilizada	0,0031 $\pm 0,0001$	0,9921	223,60	
50	Solúvel	0,0661 $\pm 0,0059$	0,9447	10,49	8,26
	Imobilizada	0,0080 $\pm 0,0005$	0,9650	86,64	
60	Solúvel	2,4906 $\pm 0,4119$	0,9961	0,28	5,61
	Imobilizada	0,4414 $\pm 0,0154$	0,9997	1,57	

Pode-se observar que em todas as temperaturas avaliadas, o tempo de meia vida para a enzima imobilizada foi superior à enzima livre. O maior fator de estabilização foi observado a 50°C, momento no qual a enzima imobilizada apresentou um ganho maior na estabilidade em relação à enzima solúvel.

Nos estudos de Manera (2010), após a caracterização de  $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. marxianus* CCT 7082 a autora determinou a constante de desativação térmica ( $k_d$ ) seguindo o modelo de primeira ordem. A autora obteve resultado superior a este estudo ( $29,5\text{ h}^{-1}$ ) para a constante de desativação térmica ( $k_d$ ) a  $50^\circ\text{C}$  e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima foi de 1,38 minutos, resultado inferior ao obtido neste trabalho que foi de 10,49 minutos para a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel.

#### 4.8 Estudo dos parâmetros termodinâmicos da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada

A estimativa dos parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica de  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada é essencial para se determinar a influência e o potencial industrial do processo de imobilização estudado. Os parâmetros termodinâmicos contribuem para a compreensão do mecanismo de desnaturação das enzimas. Nesse contexto, a Tabela 10 apresenta os resultados da estimativa dos parâmetros termodinâmicos da desativação de  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada em diferentes temperaturas ( $40\text{-}60^\circ\text{C}$ ).

Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos da desativação térmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 solúvel e imobilizada em quitosana nas temperaturas de  $40$ ,  $50$  e  $60^\circ\text{C}$ .

T (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)		$\Delta G^*$ (kJ/mol)		$\Delta S^*$ (kJ/(mol.K))	
	Solúvel	Imobilizada	Solúvel	Imobilizada	Solúvel	Imobilizada
40	283.09	211.00	91.62	91.86	0.61	0.38
50	283.01	210.92	86.66	92.33	0.61	0.37
60	282.92	210.84	79.37	84.16	0.61	0.38

Como pode ser observada na Tabela 10, os valores de  $\Delta H$  diminuíram sensivelmente com a temperatura para ambas as enzimas solúvel e imobilizada.

Esse resultado não alterou de forma expressiva os valores de entropia ( $\Delta S^*$ ) para a enzima imobilizada, embora se observe uma queda no valor da energia de Gibb's ( $\Delta G^*$ ) a 60°C.

Nesse trabalho, a energia de desativação calculada pela equação de Arrhenius entre as temperaturas de 40 - 60 °C para a enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi de 285,7 kJ/mol e 213,6 kJ/mol, respectivamente. Esses valores estão dentro da faixa (167-293 kJ/mol) que foi estimada para muitas enzimas microbianas (SHULER; KARGI, 2002).

Segundo a literatura (NAIDU; PANDA, 2003; USTOK; TARI; HARSA, 2010), a conformação espacial da enzima pode ser afetada pelo aumento da entropia da molécula. Um alto valor de  $\Delta S^*$  indica que a desativação da enzima é fortemente influenciada pela alteração da estrutura da cadeia do polipeptídio, passando para uma conformação mais randômica, o que resulta em baixos valores de  $\Delta G^*$ . Os valores de  $\Delta S^*$  são importantes, pois fornecem informações sobre o grau de solvatação e de compactação da molécula de proteína. Além disso, os valores de  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$  são altamente influenciados por vários fatores, incluindo a presença de solvente e efeitos estruturais.

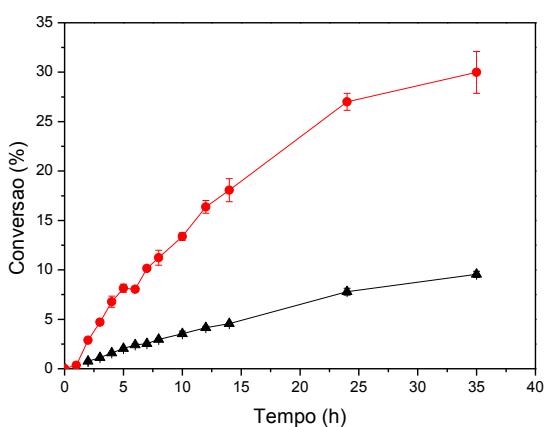
Na Tabela 10, os valores de  $\Delta S^*$  para a enzima imobilizada estão mais próximos de zero comparando com a  $\beta$ -galactosidase solúvel. Isso mostra que a enzima solúvel está mais suscetível a desativação térmica do que a enzima imobilizada. Segundo Ustok, Tari e Harsa (2010), os valores obtidos de  $\Delta S^*$  próximos de zero, não implicam em qualquer alteração relevante na estrutura terciária da enzima, pois a maioria das ligações de hidrogênio, responsáveis pela estrutura do sítio ativo catalítico da enzima permanecem preservadas.

#### **4.9 Hidrólise da lactose pela $\beta$ -galactosidase solúvel de *K. lactis* NRRL Y-1564**

A Figura 14 apresenta os resultados para a hidrólise da lactose a 37°C, pH 7,0 por 35 h pela enzima solúvel  $\beta$ -galactosidase. Observa-se na Figura 14 que o acréscimo na carga enzimática aumentou em 3,14 vezes a concentração de glicose, assim como a conversão de lactose em glicose após 35 h de hidrólise. Isso corresponde a uma conversão de 30,77% da lactose inicial quando se utilizou uma carga de 2,0 U de  $\beta$ -galactosidase. Obteve-se uma conversão de lactose de 9,80%

quando se utilizou uma carga de 0,5 U de enzima, no mesmo tempo de hidrólise. Segundo Miezeliene *et al.* (2000), uma conversão de 20-30% da lactose é suficiente para as pessoas que sofrem com intolerância a este carboidrato, sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados positivos.

Figura 14 - Conversão da lactose (50 g/L) em glicose pela  $\beta$ -galactosidase solúvel.  
(▲) 0,5 U  $\beta$ -galactosidase; (●) 2,0 U  $\beta$ -galactosidase



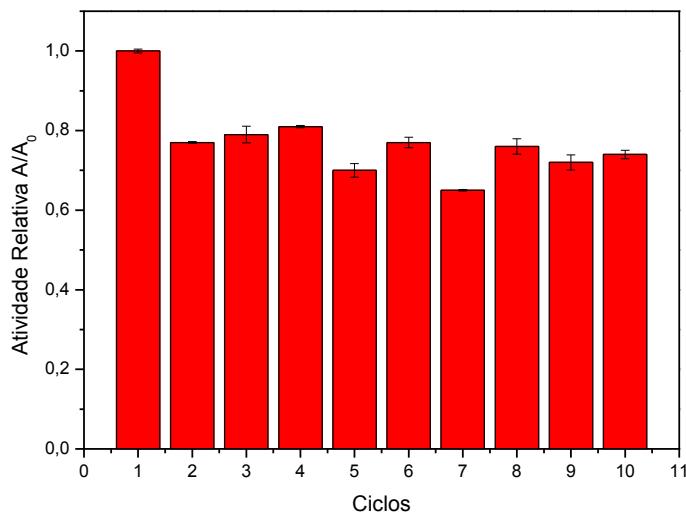
Vieira (2009) utilizou uma preparação comercial líquida da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. fragilis* (Lactozym 3000L) e realizou a hidrólise da lactose utilizando 2,0 U de enzima  $\beta$ -galactosidase (solúvel e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído) durante 7 h a temperatura de 40°C e os resultados de conversão da lactose em glicose foram aproximadamente de 30% para a enzima solúvel, resultado inferior ao obtido neste estudo. Ressalta-se que o tempo e a temperatura de hidrólise foram diferentes ao deste estudo.

#### 4.10 Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana

A estabilidade operacional é um dos índices significativos para avaliar a propriedade da enzima imobilizada em larga escala. A Figura 15 mostra a atividade relativa da enzima imobilizada sobre ciclos subseqüentes da  $\beta$ -galactosidase imobilizada retendo 74% da atividade inicial após o 10º ciclo com o uso repetido da enzima. A diminuição na atividade logo após o primeiro ciclo, pode ser explicado pela remoção das enzimas fracamente adsorvidas a quitosana, devido a agitação

que foi conduzida a hidrólise do ONPG ou na etapa de lavagem da enzima antes da sua aplicação a próxima hidrólise. Este resultado evidencia que o processo de imobilização acarretou uma boa estabilidade operacional à enzima.

Figura 15 - Estabilidade operacional da enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise do ONPG a 37°C.



Verma *et al.* (2012) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase a partir de *Kluyveromyces lactis* em nanopartículas de dióxido de silício funcionalizados e usaram o mesmo modelo de reação para avaliar a enzima imobilizada a 40°C ao longo de 11 ciclos, em que o biocatalisador reteve aproximadamente metade da sua atividade inicial ao fim do último ciclo.

Tardioli *et al.* (2009) observaram que a enzima imobilizada apresentou uma maior estabilidade operacional do que a enzima solúvel. Depois de quatro ciclos de hidrólise da lactose com duração de 20 minutos cada, a uma temperatura de 40°C e um pH de 7, a enzima imobilizada reteve 83% da sua atividade inicial.

Vieira (2009) estudou a estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase imobilizada de *K. fragilis* comercial durante quatro ciclos e observou que houve uma perda da atividade hidrolítica inicial ao final do quarto ciclo, sendo esse resultado inferior ao obtido neste trabalho.

Outros autores (ZHANG *et al.* 2006) utilizaram como suporte um composto de microesferas de goma de tamarindo e quitosana, mas reteve apenas

53% da sua atividade inicial após 9 ciclos de hidrólise do ONPG a uma temperatura de 37°C e pH 7,3.

Nos estudos de Logoglu, Sungur e Yildiz (2006) citado por Ansari e Husain (2011) relataram que elevados custos de enzimas utilizadas para fins industriais e do tempo necessário para a sua imobilização para uso subsequente, levaram a aumentar a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada.

#### **4.11 Estabilidade de estocagem a 4°C da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

A  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada em quitosana, foram estocadas em tampão fosfato de potássio a pH 7,0 a temperatura de 4°C durante mais de 3 meses. A enzima imobilizada manteve 100% de sua atividade enzimática inicial durante um período de 93 dias. Em contrapartida, a  $\beta$ -galactosidase solúvel teve a sua atividade enzimática reduzida em 9,4% em relação à atividade inicial quando armazenada sob as mesmas condições e o mesmo período de tempo. Isto está de acordo com os resultados que foram publicados na literatura (JOCHEMS *et al*, 2008; DWEVEDI; KAYASTHA, 2009; ANSARI; HUSAIN, 2011; BAYRAMOGLU; TUNALI, ARICA, 2007).

Dwevedi e Kayastha (2009) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase em pellets de quitosana e observaram nenhuma perda de atividade da enzima imobilizada até um período de 40 dias.

Ansari e Husain (2011) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase obtido a partir de *Aspergillus oryzae* sobre um suporte construído a partir de concanavalina A-Celite 545 e observaram que a enzima manteve 78% da sua atividade inicial ao fim de 2 meses de armazenamento, enquanto a enzima solúvel reteve apenas 40% de sua atividade inicial.

Bayramoglu, Tunali e Arica (2007) relataram que  $\beta$ -galactosidase imobilizada em esferas magnéticas (poli-metacrilato de glicidilo de etileno e metacrilato de dimetil) reteve 59% de sua atividade após 2 meses de armazenamento, enquanto que a enzima livre experimentou uma perda completa de atividade após 5 semanas de armazenamento.

Outros autores (JOCHEMS *et al.*, 2011) armazenaram a  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada obtida a partir de *Kluyveromyces lactis* a 5°C num tampão tris-HCl. Eles observaram que a enzima solúvel reteve 46% da sua atividade, após sete dias, enquanto que a enzima imobilizada reteve 60% após o mesmo período de tempo de armazenamento. Após 14 dias, a enzima solúvel havia perdido mais de 80% da sua atividade inicial, enquanto que a enzima imobilizada perdeu apenas 59% da sua atividade inicial.

Em seus estudos, Vieira (2009) imobilizou a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. fragilis* (Lactozym 3000L) comercial em quitosana ativada com glutaraldeído e armazenou por um período de 60 dias, a enzima teve sua atividade reduzida em 10%, quando estocada em tampão, e 20% após 90 dias de armazenamento, resultado inferior ao obtido neste trabalho.

De acordo com Zanin e Moraes (2004), a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução, geralmente é superior àquela da enzima solúvel, porém, isto depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada.

## 5 CONCLUSÕES

Na seleção entre as cinco linhagens de *Kluyveromyces* estudadas neste trabalho verificou-se que o micro-organismo *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 apresentou maior produção de  $\beta$ -galactosidase, 3,7 U/mL em 12 h de ensaio. Além disso, os resultados cinéticos sugerem que a síntese de  $\beta$ -galactosidase por *K. lactis* NRRL Y1564 está associado com o crescimento celular. O soro de leite desproteinizado e suplementado com extrato de levedura mostrou-se uma fonte de carbono alternativa viável para produção de  $\beta$ -galactosidase.

A máxima atividade enzimática foi obtida a pH 6,5 para enzima solúvel e para a enzima imobilizada a máxima atividade foi a pH 7,0. Uma faixa mais ampla de pH ótimo de aplicação da enzima imobilizada foi observada em comparação com a enzima solúvel. A temperatura ótima para a enzima solúvel e imobilizada foi 50 e 37°C, respectivamente.

O estudo da estabilidade da enzima mostrou que o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima imobilizada foi de 223,6 minutos na temperatura de 40°C, 86,64 minutos na temperatura de 50°C e 1,57 minutos a temperatura de 60°C. O processo de imobilização conferiu a enzima um aumento da estabilidade térmica em relação à enzima na forma solúvel. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima solúvel foi menor em todas as temperaturas do que o da imobilizada. O fator de estabilização de 8,26 foi maior na temperatura de 50°C. Isso mostra que o processo de imobilização foi satisfatório, visto que houve aumento na estabilidade térmica da enzima. A maior estabilidade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi provavelmente uma consequência do novo microambiente fornecido pela matriz de quitosana.

Os valores estimados para as constantes cinéticas de hidrólise de ONPG, a pH 7,0 e temperatura de 37°C, foram  $K_m$  igual a 3,34 e 3,68 mM para a enzima solúvel e imobilizada, respectivamente, e  $V_{máx}$  igual a 1,78 e 3,38 mM/min para a enzima solúvel e imobilizada, respectivamente. Isto sugere que não há alteração conformacional experimentada pela enzima durante a imobilização.

A enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada reteve 74% da atividade inicial após o 10º ciclo com o uso repetido da enzima. Este resultado evidencia que o processo de imobilização acarretou uma boa estabilidade operacional à enzima.

A enzima imobilizada manteve 100% de sua atividade enzimática inicial durante um período de 93 dias. Em contrapartida, a  $\beta$ -galactosidase solúvel teve a sua atividade enzimática reduzida em 9,4% em relação à atividade inicial quando armazenada sob as mesmas condições e o mesmo período de tempo.

A quitosana ativada com glutaraldeído é um suporte alternativo adequado de baixo custo para imobilização da  $\beta$ -galactosidase, proporcionando a enzima imobilizada estabilidades térmicas, operacional e de armazenamento mais elevadas, em comparação com a enzima solúvel.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em soro de leite para obtenção de maior rendimento;
- Testar outras temperaturas durante o cultivo da *K. lactis* NRRL Y1564;
- Utilizar outros métodos de extração da enzima para rompimento das células da levedura;
- Estudar outros métodos de imobilização;
- Verificar as bandas da enzima através do ensaio de eletroforese;
- Estudar as aplicações para a enzima imobilizada utilizando leito fixo.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. de; PASTORE, G. M. Galactooligosacarídeos – Produção e efeitos benéficos, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SBCTA, v. 35, n. 1/2, p. 12 - 19. 2001.
- ALEJANDRA, O.; RAMÍREZ, MATHEUS; NILO RIVAS, R. Producción y caracterización parcial de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 53, n.2, p.194-201, 2003.
- ANSARI, A. S.; 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.
- BAYRAMOGLU, G.; TUNALI, Y.; ARICA, M. Y. Immobilization of  $\beta$  -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor, Catal. Commun. v. 8, p.1094–1101, 2007.
- BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ SISO, M. I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 506-512. 2001.
- BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998.
- BELVER, C.; TAMAYO, J.J.; MOLINERO, L.; LADERO, M.; PESSELA, B.C.C.; GUISAN, J.M.; GARCIA-OCHOA, F. Immobilization-stabilization of *Candida antarctica* Lipase B in agarose-glyoxyl and agarose-octyl: Deactivation kinetics. *Chemical Eng. Transactions*. v.14, 2008
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, M.J.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.57, p.35-52. 2004.
- BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, M.J. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877-882. 2006.
- BITZILEKIS, S.; BARNETT, J. A. Exponential growth rates of species of the yeast genus *Kluyveromyces*. FEMS Microbiology Letters, v. 145, p. 189-190, 1997.

BLANCH, H. W; CLARK, D. S Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker. 1997.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial. Fundamentos. Editora Edgard Blücher, 1<sup>a</sup> reimpressão, v. 1. São Paulo, 2005a.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blücher 1<sup>a</sup> reimpressão, v. 3. São Paulo, 2005b.

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

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; ROTHA, N. F.; KALIL, S. J. Desproteinização do soro de leite através de diferentes técnicas para uso na produção de  $\beta$ -galactosidase. In: 3º Congresso de Ciências Farmacêuticas e 3º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, Anais do 3º COSIMP 2008, Cascavel-Paraná, 2008.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Caracterização Parcial da Enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, Anais do Sinaferm 2009, Natal-RN, 2009.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial wast for  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food Bioprocess Technol*.p.1-6, 2011.

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.

CAMPBELL, M. K. Bioquímica. 3<sup>a</sup> Ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2000.

CAMPELLO, G. da S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, C. A. V. Caracterização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* livre e imobilizada. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Anais do Sinaferm 2011, Caxias do Sul-RS, 2011.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Appl. Biochemistry*, v.22, p.55-64, 1995.

CHIOU, S. H.; WU, W.T. Immobilization of *Candida rugosa* on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, p. 197-204, 2004.

- CRUZ, R.; CRUZ. V. A.; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M. O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. S. Properties of a new fungal  $\beta$ -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 265-271, 1999.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lítases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n.4, p.623-630. 2004.
- DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, v.100, p 2667-2675, 2009.
- DICKSON, R. C.; MARKIN, J. Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*. p. 777-785, 1980.
- DI SERIO, M.; MATURO, C. ; DE ALTERIIS, E.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. *Catalysis Today* 80 333–339, 2003.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA J. A. *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1151-1154, 2005.
- FARIAS, O. A. C. de. Soro de leite em pó: Brasil caminha para auto-suficiência. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mercado/espaco-aberto/soro-de-leite-em-po-brasil-caminha-para-autossuficiencia-71038n.aspx>. acesso em 03.12.2011.
- FLORES, S. H.; ALEGRE, R. M. Produção de  $\beta$ -galactosidase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 11., 1996, São Carlos. Anais do XI SINAVERM. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, p. 321-326, 1996.
- FOOD CHEMICAL CODEX. **General tests and apparatus.** 3 ed. Washington: Nat. Acad. Press, 1981, p. 491-492.
- FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – a retrospective. *Yeast Res.*, v.6 p. 323-324, 2006.
- GADEN, E.L.J. Fermentation Process Kinetics, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* v.1 p. 413-419, 1959.
- GECIOVA, J.; DEAN, B.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – a review. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 541-553, 2002.
- GENEVA, V.; GALUTZOV, B.; EYNARD, N.; TEISSIÉ, J. Electroinduced extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 56, p. 411-413, 2001.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. *Process Biochemistry*, v. 20, p. 2-12. 1985.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELLI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre-RS, 2001. Disponível em:<http://www.lieme.ufrgs.br>. Acesso em: 03.01.2012.

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

HAIDEN, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *International Dairy Journal* v.19, p.172–177. 2009.

HSU, C. A.; YU, R. C.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Cultural condition affecting the growth and production of  $\beta$ -galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. *International Journal of Food Microbiology*, v.116, p. 186-189, 2007.

INCHAURRONDON, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochemistry*, v. 29, p. 47-54, 1994.

Jr. SANT'ANNA, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: \_\_\_\_\_ Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 2001.v.3, p. 351 – 362.

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

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for  $\beta$ -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, January, v. 34, no. 1, p. 33-40, 2004.

KAUR, G.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KUMAR, H. Hydrolysis of whey lactose using ctab-permeabilized yeast cells. *Bioproc. and Biosystems Engineering*, v.32, n1, p. 63-67, 2009.

KIM, C. S.; JI, E.; OH, D. A new kinetic model of recombinante  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 316, p. 738-743, 2004.

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

KUMAR, G.; BRISTOW, J. F.; SMITH, P. J. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer* v. 41, n. 6, p. 2157-2168, 2000.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinectic modeling of lactose hydrolysis with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 27, p. 583 – 592. 2000.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, L. J.; CARRASCOSA, V. A.; PESSELA, C. C. B.; GARCIA-OCHOA, F. Studies on the activity and the stability of  $\beta$ -galactosidases from *Thermus* sp. strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology, v.30, p.392-405. 2002.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. Fungal biology reviews, v. 24, p. 17-26, 2010.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica: Componentes moleculares das células. 7<sup>a</sup> reimp. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.1, 1997.

LONGO, G. Influência da adição da lactase na produção de iogurte. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAHONEY, R. R.; NICKERSON, T. A.; WHITAKER, J. R. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Dairy Science, vol.58, p.1620-1629. 1974.

MAHONEY, R. R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, water, salts and vitamins. Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.77-125. London, 1997.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. Food Chemistry, v. 63, n. 2, p. 147-154. 1998.

MANERA, A. P. Otimização do meio de cultura para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*.CCT 7082 e caracterização parcial da enzima. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 90f, 2006.

MANERA, A. P.; ORES, J. da C.; RIBEIRO, V. A.; BURKET, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Food Technol. Biotechnol. v.46 (1), p. 66 - 72, 2008.

MANERA, A. P. Síntese de oligossacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus*. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 174f, Campinas-São Paulo, 2010.

MARRIOTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISON, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase. Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 51, n. 6, p.1233-1240, 2008.

- MARTINS, D. B. G.; SOUZA, C. G.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. The  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 decreases by high concentrations of galactose. *Current Microbiology*, v. 44, p. 379-382, 2002.
- MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- MIEZELIENE, A.; ZUBRIENE, A.; BUDRIENE, S.; DIENYS, G.; SEREIKAITÉ, J. Use of native and immobilized  $\beta$ -galactosidase in the food industry. *Food Biotechnol.*, p. 171-175, 2000.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MUNISWARAN, P. K. A.; SELVAKUMAR, P.; CHARYULU, N. C. L. N. Production of cellulases from coconut coir pith in solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 60, p. 147-151, 1994.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 57-67, 2003.
- NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S.  $\beta$ -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification*, v. 21, p. 24-29, 2001.
- NAKAGAWA, T.; IKEHATA, R.; UCHINO, M.; MIYAJI, T.; TAKANO, K.; TOMIZUKA, N. Cold-active acid  $\beta$ -galactosidase activity of isolated psychrophilic-basidiomycetous yeast *Guehomyces pullulans*. *Microbiological Research*, v. 161, p. 75-79, 2006.
- NERI, D. F. M. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto different water insoluble matrices. Tese de doutorado. Universidade do Minho, Portugal. 2008.
- NERI, D. F. M; BALCÃO, V. M.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; Jr. CARVALHO, L. B.; TEIXEIRA, J. A. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications* v.9 p 2334-2339, 2008.
- NEVES, L.C.M., OLIVEIRA, K.S.; KOBAYASHI, M.J.; PENNA, T.C.V.; CONVERTI, A. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atropheus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 136-140. p. 539-554, 2007.
- NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHÄRER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular  $\beta$ -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 845-849, 2001.

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

NUNES, M. F. A.; MASSAUGER, S.; MONTE ALEGRE, R. Produção e Propriedades de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v. 29, n. 1, p. 25-30, jan/jun. 1993.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2008–2017 Highlights. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development—Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/550/en/AgOut2017E.pdf>. Acessado em: 11/04/2011.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase with potential application as a digestive supplement, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n.07, v.141, p.1–14, 2007.

OLIVEIRA, J. S de. Queijo Fundamentos Tecnológicos. In: Série: Tecnologia Agroindustrial. São Paulo. 1982.

ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*, vol. 2. Porto Alegre, 2005.

ORNELAS, A. P.; SILVEIRA, W. B.; SAMPAIO, F. C, PASSOS, F. M. The activity of beta-galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. *Journal Applied Microbiology*. v. 104, n. 4, p. 1008-13, 2008.

ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. Ö. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*, v.35, p. 1037-1043, 2000.

PANESAR, P. Production of  $\beta$ -D-galactosidase from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Research Journal of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2008.

PAPAGIANNI M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes - review. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: **Química de Alimentos de FENNEMA**. 4 ed. Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 264 – 339, 2010.

PERES, C. Soro de leite em pó: uma alternativa auto-suficiente. Tendência brasileira que coíbe a poluição e gera alternativas para o mercado. Editora Rocha Ltda. *Revista Mais Leite*, v. 5. Abril de 2011.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

- PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and  $\beta$ -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 438-442, 2003.
- PINHO, J. M. R.; PASSOS, F. M. L. Solvente extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* yields a stable and highly active enzyme preparation. *Journal of Food Biochemistry*, v.35, p. 323-336, 2011.
- PORTO, L. M. Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção da Ricota. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG. 2001.
- PORTO, T. F.; SILVA, M. L. C. P.; SILVA, G. L. J. P.; CASTRO, H. F. Atividade catalítica e estabilidade operacional da lipase microbiana imobilizada em fosfato de zircônio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 24, Natal. Anais do XIV COBEQ. Natal-RN, 2002.
- PURI, M.; GUPTA, S.; PAHUJA, P.; KAUR, A.; KANWAR, J. R.; KENNEDY, J. F. Cell disruption optimization and covalent immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 160 p. 98-108. 2010.
- RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. *Food Technol. Biotechnol*, v. 41 (4), p. 315-320, 2003.
- RAO, M. V. R.; DUTTA, S. M. Production of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 185-188, 1977.
- RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 873-877. 2007.
- RECH, R. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1998.
- RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB M. Utilization of protein-hidrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p. 91-96, 1999.
- REED, G; NAGODAWITHANA, T. Enzymes in Food Processing. New York, Academic Press. 3<sup>a</sup> ed. 1993.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. Produção de enzimas, engenharia dos processos fermentativos. v. 3. Editora e Gráfica Universitária – UFPel. Pelotas, 2000.

- RIBEIRO, E. J. Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas - São Paulo. 1989.
- ROBINSON, D. S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.
- RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 212-225, 2006.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p.717-723. 1987.
- SAMOSHINA, N. M.; SAMOSHIN, V. V. the michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast)  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme and microbial technology*. v. 36, P. 239-251, 2005.
- SANTIAGO, P. A. Contribuição ao estudo da produção de  $\beta$ -galactosidas por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais. 2002.
- SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.
- SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 558-567, 1998.
- SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G. B.; JONAS, R.; FURLAN, S. A. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 a partir de melão de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 11., 1996, São Carlos. Anais do XI SINAERM. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1996. p. 96-101.
- SEGEL, I. H. *Enzyme Kinetics*. New York, John Wiley. 1993.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall, New York, 2002.
- SINGH, N.R.; NARINESINGH, D.; SINGH, G. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto Sepharose and stabilization in room temperature ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, v.152 p.19–27, 2010.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins from 'gutter-to-gold'. *Int. Dairy J*, v.18, p. 695–704, 2008.

SOARES, C. M. F; De Castro H. F.; SANTANA, M. H.; ZANIN, G. M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. *Applied Biochemistry Biotechnology*.v 98-100, p 863-874, 2002.

SONG, Y. S.; LEE, J. H; KANG, S. W.; KIM, S. W. Performance of  $\beta$ -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. *Food Chemistry*, v. 123, p. 1-5, 2010.

STARK, M. B.; HOLMBERG, K. Covalent immobilization of lipase in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 942-950, 1989.

TARDIOLI, P.W.; VIEIRA, D.C.; ADRIANO, W.S.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO; R.L.C. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *New Biotechnol.*v. 25, S164, 2009.

TREVISAN, H. C; BERGAMO, C. P; CONTIERO, J.; HOJO, O.; MONTI, R. Estudo da imobilização de  $\beta$ -galactosidase em sílica de porosidade controlada. In: SINAVERM. Anais da SINAVERM. Universidade Federal de São Carlos. 1996.

TREVISAN, A. P. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. *Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia os Alimentos*. Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2008.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artesanal yoghurt cultures, *Food Chem.* v. 119, p. 1114–1120, 2010.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.2, p. 75-85. 2001.

VERMA, M. L.; BARROW, C.J.; KENNEDY, J.F.; PURI, M. Immobilization of  $\beta$ -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis, *Int. J. Biol. Macromol.* v.50, 432– 7, 2012.

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. *Dissertação de mestrado em Engenharia Química*. Universidade Federal de São Carlos, SP – Brasil, 2009.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 2001.v.3, p. 391 – 404.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995.

WARD, OWEN P. Biotecnología de la fermentación. Principios, procesos y productos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza-España, 1991.

WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

YANG, S. T.; SILVA E. M. Novel products and new technologies for use of a familial carbohydrate, milk lactose. Journal Dairy Science, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.

YU, X. W.; LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 40, p. 44-50, 2006.

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

ZHANG , Z. J.; ZENG, J.; ZHANG, S.; WANG, Y. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on Tamarind Gum and Chitosan Composite Microspheres, J. Bioact. Compatible Polym. v.21, 415-432, 2006.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R. Eds; Legis Suma: Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-85. 2004.

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, p. 33-44, 2001.

## ANEXO

Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Temperatura		Sadana-Henley (1987)		
		$K_d$	$\alpha$	$R^2$
40°C	β-galactosidase Solúvel	0,0085 ± 0,0004	0,4334 ± 0,0127	0,9990
	β-galactosidase Imobilizada	0,0044 ± 0,0010	0,2163 ± 0,1147	0,9934
50°C	β-galactosidase Solúvel	0,0252 ± 0,0408	- 1,2008 ± 3,1312	0,9443
	β-galactosidase Imobilizada	0,0069 ± 0,0015	- 0,0845 ± 0,1262	0,9635
60 °C	β-galactosidase Solúvel	3,3503 ± 0,0000	0,0485 ± 0,0000	1,00
	β-galactosidase Imobilizada	0,4588 ± 0,0204	0,0083 ± 0,0062	0,9997