



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

**TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE A PARTIR DE SORO DE LEITE  
UTILIZANDO A ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis***

**FORTALEZA  
2018**

TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE A PARTIR DE SORO DE LEITE  
UTILIZANDO A ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis*

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

Orientadora: Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientadora: Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA  
2018

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

---

- A314p Albuquerque, Tiago Lima de.  
Produção enzimática de lactulose a partir de soro de leite utilizando a enzima betagalactosidase de Kluyveromyces lactis / Tiago Lima de Albuquerque. – 2018.  
155 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.  
Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Imobilização. 2. Reaproveitamento do soro de leite. 3. Lactulose. I. Título.
- CDD 660
-

TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE A PARTIR DE SORO DE LEITE  
UTILIZANDO A ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis*

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

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Profº. Dr. Roberto Fernández-Lafuente  
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – ICP (Madri-España)

---

Profº. Dr. Álvaro Silva Lima  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Profª Dra. Ariosvana Fernandes Lima  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

---

Profª. Dra. Ana Karine Pessoa Bastos  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A minha amada avó, Franscisca (*in memoriam*),  
que tanto sonhou com a conclusão dos meus  
estudos. E aos meus pais, Neide e Francisco, que  
dedicaram sua vida para que isso fosse possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por SEMPRE estar comigo me dando forças para seguir adiante, ultrapassando barreiras que, muitas vezes, parecem intransponíveis. Eu acredito que nos momentos mais difíceis da minha vida Ele esteve (e está comigo), me dando condições para vencer diante de todas as dificuldades que o destino proporciona na caminhada.

Aos meus pais, que me apoiaram até quando eu mesmo não acreditava em mim, fazendo tudo o que estava ao seu alcance para que eu aprendesse a lutar pelos meus sonhos por meio da educação.

As professoras Maria Valderez Ponte Rocha e Luciana Rocha Barros Gonçalves, que foram, desde o mestrado, tão dedicadas e me receberam de forma tão atenciosa no GPBio (Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos). Por essas duas mulheres de força e coragem eu nutro uma grande admiração e respeito, sendo eternos exemplos de luta, dedicação e caráter em sua jornada pessoal e acadêmica.

Ao meu supervisor durante o período de Doutorado Sanduíche na Espanha, Roberto Fernández Lafuente, que me acolheu com carinho e que muito contribuiu para a minha formação. Com ele aprendi muito além de questões científicas e acadêmicas: é um verdadeiro gênio!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento daa bolsa durante meu doutorado, inclusive no período de Doutorado Sanduíche.

Aos professores Álvaro Silva Lima, Ana Karine Pessoa Bastos, André Casimiro de Macedo e Ariosvana Fernandes Lima, que foram extremamente gentis ao aceitarem os convites para participarem como membros das bancas de avaliações a que este trabalho foi submetido.

Aos meus queridos amigos da UFC e da vida, Rosiene Arcanjo, Ítalo Lima, Micael Andrade e Sandy Danielle, que me apoiaram e susteram em diversos momentos e são para mim como irmãos. Obrigado pela paciência, pela companhia, pela amizade, vocês sempre farão parte da minha vida.

A Wilker Brito, que me apoiou desde minha graduação e sempre torceu por mim. Obrigado! Minha gratidão por seu incentivo, companheirismo, amizade de todos esses anos, que foram os mais desafiadores da minha vida, é eterna!

*"Quando o sol bater na janela do teu quarto, lembra e vê que o  
caminho é um só!"*  
*(Renato Russo)*

## RESUMO

Nas últimas décadas, devido a necessidade de alcançar maior sustentabilidade em processos industriais, mais atenção vem sendo conferida ao tratamento de resíduos provenientes da Indústria de Alimentos. Um importante setor dessa indústria é o de laticínios, que ocupa lugar de destaque devido ao grande volume de produtos processados. O soro de leite, principal subproduto da fabricação de queijos, possui nocividade ambiental considerável, especialmente pela lactose residual presente, tornando indispensável seu pré-tratamento antes de ser descartado como efluente. Dentre as alternativas promissoras para a utilização desse soro, destaca-se seu emprego como matéria-prima para a produção biotecnológica de produtos com maior valor agregado, o que poderia incluir a hidrólise enzimática da lactose presente para síntese de oligossacarídeos e substâncias com função prebiótica, como a lactulose. Essa última substância tem recebido muita atenção nas pesquisas científicas devido aos seus diversos usos na indústria de alimentos e farmacêutica, atuando, por exemplo, no tratamento de constipação e na prevenção e o tratamento de encefalopatia hepática. O objetivo do presente estudo, de acordo com as alegações citadas anteriormente, foi avaliar o aproveitamento de soro de leite para a produção de lactulose por via enzimática, utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Os resultados levaram a determinação das condições ótimas para a produção de lactulose utilizando, inicialmente, meio sintético a base de lactose e frutose, que foram: razão lactose/frutose de 15/30 % (m/v); concentração inicial dos substratos (lactose e frutose) de 200 g/L, temperatura de 50 °C, carga enzimática de 7 U/mL, pH 7 e adição de 0,01% m/v de Mg<sup>2+</sup>. A concentração máxima alcançada foi de 22,59 ± 0,11 g/L de lactulose. A partir de então, investigou-se a produção de lactulose por via enzimática (tanto com a enzima solúvel como imobilizada no suporte previamente selecionado – quitosana) utilizando-se o soro de leite como matéria-prima. Os experimentos apresentaram resultados promissores, uma vez que elevadas concentrações de lactulose foram obtidas a partir do soro. Concluiu-se que a maior produção foi alcançada no soro de leite tratado para precipitação e eliminação de proteína, atingindo-se uma concentração total de 17,32 ± 0,88 g/L de lactulose. Também se avaliaram os ciclos de reuso utilizando a enzima imobilizada, observando-se elevada estabilidade operacional, com síntese, em relação ao ciclo inicial, de 63% de lactulose no terceiro, e cerca 25% ao final do sexto ciclo de reuso. A partir da hidrólise da lactose, além da galactose liberada, geraram-se altas quantidades de glicose no meio reacional, assim, no intento de aproveitar essa glicose, avaliou-se a produção em uma única batelada de lactulose e etanol via enzimática (por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*) e fermentativa (por *Saccharomyces cerevisiae*), respectivamente. Os resultados encontrados foram potencialmente promissores, visto que foi possível produzir lactulose e etanol em uma mesma batelada nas concentrações máximas de 17,50 ± 0,76 g/L e 8,79 ± 0,65 g/L, respectivamente. Conclui-se, portanto, que é possível a utilização da lactose presente no soro de leite residual da Indústria de Alimentos para a produção de lactulose, o que proporcionaria um destino adequado a esse resíduo, com a redução dos danos ambientais e de custos que pode causar. Além da produção de uma substância com maior valor agregado devido a seu extenso uso em indústrias alimentícias e farmacêuticas.

**Palavras-chave:** Imobilização. Reaproveitamento de soro de leite. Lactulose.

## ABSTRACT

In the last decades, due to the need to assure higher sustainability in industrial processes, the treatment of the waste deriving from the food industry has received unprecedented attention. An important sector in the business is dairy, which holds a prominent ranking due to the large volume of products processed. Whey, the main by-product of cheese, imposes considerable environmental risks, especially due to its the residual lactose, deeming pretreatment operations indispensable before disposal as an effluent. Among the promising alternatives for whey utilization, it can be highlighted its use as a raw material for the biotechnological production of products with high-added value, which includes the enzymatic hydrolysis of the lactose present for synthesizing oligosaccharides and other molecules with prebiotic function, such as lactulose. The latter has received considerable attention in scientific research due to its numerous uses in the food and pharmaceutical industries, for example, in the treatment of constipation and in the prevention and treatment of hepatic encephalopathy. Given the aforementioned scenario, the objective of the present study was to evaluate the employment of whey in the production of lactulose by an enzymatic route, using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. The results led to the determination of optimal conditions for the production of lactulose using a lactose/fructose-based synthetic medium, which initially were: lactose/fructose ratio of 15/30% (w/v); initial substrate concentration (lactose and fructose) of 200 g/L, temperature of 50 °C, enzymatic load of 7 U/mL, pH 7.0 and with the addition of 0.01% w/v Mg<sup>2+</sup>. The maximum concentration achieved was 22.59 ± 0.11 g/L of lactulose. Thereafter, the enzymatic lactulose production was investigated (with enzymes soluble and immobilized onto the previouslyselected support chitosan) using whey as raw material. The experiments presented promising results, given the high concentrations of lactulose obtained in the whey. It was concluded that the highest production was achieved when the whey had been treated for protein precipitation and elimination, yielding a total concentration of 17.32 ± 0.88 g/L of lactulose. The reuse cycles were also evaluated using the immobilized enzyme, with a high operational stability, with a synthesis of 63% of lactulose in the third cycle and about 25% at the end of the sixth cycle of reuse. From the hydrolysis of lactose, in addition to the liberated galactose, high amounts of glucose were generated in the reaction medium. As such, in an attempt to take advantage of these, the production of lactulose and ethanol was also evaluated in a single batch using enzymatic (by  $\beta$  -galactosidase from *K. lactis*) and fermentative (by *Saccharomyces cerevisiae*) routes, respectively. The results were potentially promising, since it was possible to produce lactulose and ethanol in the same batch at the maximum concentrations of 17.50 ± 0.76 g/L and 8.79 ± 0.65 g/L, respectively. Therefore, it can be concluded that it is possible to use the lactose present in the residual whey from the food industry for the production of lactulose, providing an appropriate destination for this waste, and consequently, reducing the environmental impact it can exert. Furthermore, this practice would result in the production of a substance with higher added value due to its extensive use in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Immobilization. Reutilization of whey. Lactulose.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 2.1. | Hierarquia do gerenciamento de resíduos de alimentos.....   | 24 |
| Figura 2.2. | Principais compostos de valor derivados da indústria de produtos lácteos.....   | 28 |
| Figura 2.3. | Esquema da produção de soro de leite durante a produção de queijo.....  | 30 |
| Figura 2.4. | Aplicações de lactulose nos setores alimentício e farmacêutico.....   | 42 |
| Figura 2.5. | Representação esquemática das diferentes metodologias empregadas para produzir lactulose a partir da lactose: (A) processos gerais; (B) por síntese enzimática usando $\beta$ -galactosidase e (C) por celobiose-2-epimerase.....   | 44 |
| Figura 2.6. | Métodos básicos de imobilização de biocatalisadores.....  | 61 |
| Figura 3.1. | Resumo da metodologia para determinação das condições ótimas para produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> .....  | 71 |
| Figura 3.2. | Resumo da metodologia de avaliação da produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> a partir do soro de leite.....   | 72 |
| Figura 4.1. | Perfil de imobilização de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em suporte MANAE a 5 mM de tampão e pH 5 (A), 7 (B) e 9 (C). (■): atividade da suspensão de imobilização; (●): atividade do sobrenadante; (▲): enzima livre sob as mesmas condições.....                | 74 |
| Figura 4.2. | Perfil de imobilização de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em suporte MANAE a 25 mM de tampão e pH 5 (A), 7 (B) e 9 (C). (■): atividade da suspensão de imobilização; (●): atividade do sobrenadante; (▲): enzima livre sob as mesmas condições.....               | 75 |
| Figura 4.3. | Estabilidade térmica de diferentes derivados de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> a pH 4,5 usando acetato de sódio 5 (A), 25 (B) ou 50 mM (C). As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲): Enzima imobilizada a pH 5; (●): Enzima imobilizada a pH 7; (▼): enzima |    |

|   |    |
|---|----|
| imobilizada a pH 9; (■) Enzima livre.....   | 77 |
| Figura 4.4. Efeito do pH de imobilização na orientação da enzima $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em relação à superfície de suporte.....  | 79 |
| Figura 4.5. Estabilidade térmica de diferentes derivados de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> a pH 7 empregando 5 (A), 25 (B) ou 50 mM (C) de tampão fosfato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲): enzima imobilizada a pH 5; (●): enzima imobilizada a pH 7; (▼): enzima imobilizada a pH 9; (■) enzima livre..... | 80 |
| Figura 4.6. Estabilidade térmica de diferentes derivados de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> a pH 9 empregando 5 (A), 25 (B) ou 50 mM (C) de tampão fosfato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲): enzima imobilizada a pH 5; (●): enzima imobilizada a pH 7; (▼): enzima imobilizada a pH 9; (■) enzima livre..... | 82 |
| Figura 4.7. Estabilidade térmica de diferentes derivados de $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> a pH 9 empregando 5 (A), 25 (B) ou 50 mM (C) de tampão fosfato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲): enzima imobilizada a pH 5; (●): enzima imobilizada a pH 7; (▼): enzima imobilizada a pH 9; (■) enzima livre..... | 84 |
| Figura 4.8. Perfil de imobilização de $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em quitosana ativada com glutaraldeído. (■): atividade da suspensão de imobilização; (●): sobrenadante da suspensão de imobilização; (▲): enzima livre sob as mesmas condições.....   | 86 |
| Figura 4.9. Estabilidade térmica a 60 °C da $\beta$ -galactosidase livre (■) e imobilizada em quitosana reticulada com glutaraldeído (●).....   | 86 |
| Figura 4.10. Possíveis reações e produtos da transgalactosilação na presença de frutose catalisada por $\beta$ -galactosidase.....  | 90 |
| Figura 4.11. Efeito da concentração total de substrato (lactose + frutose) na produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> na razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) a 37 °C, pH 7, 5 U/mL e 100 rpm.....  | 92 |

- Figura 4.12. Hidrólise de lactose (A), produção de glicose (B) e lactulose (C) utilizando diferentes temperaturas reacionais: 37 °C (■), 45 °C (●), 50 °C (▲), 55 °C (▼) e 60 °C (◀). Condições: 100 rpm, 5 U/mL..... 95
- Figura 4.13. Influência da carga enzimática na hidrólise da lactose a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v) e concentração total de substratos 200g/L. Cargas enzimáticas: (■) 1 U/mL, (●) 2 U/mL, (▲) 3 U/mL, (▼) 4 U/mL, (◀) 5 U/mL, (►) 6 U/mL, (◆) 7 U/mL, (◆) 8 U/mL, (●) 9 U/mL, (★) 10 U/mL, (●) 12 U/mL..... 99
- Figura 4.14. Lactose hidrolisada (%) em relação a variação da carga enzimática empregada da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e produção de lactulose correspondente (linha com quadrados). Condições reacionais: 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) e concentração total de substratos 200g/L..... 99
- Figura 4.15. Influência da carga enzimática da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* na produção de glicose (A) e lactulose (B) a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v) e concentração total de substratos 200g/L. Cargas enzimáticas: (■) 1 U/mL, (●) 2 U/mL, (▲) 3 U/mL, (▼) 4 U/mL, (◀) 5 U/mL, (►) 6 U/mL, (◆) 7 U/mL, (◆) 8 U/mL, (●) 9 U/mL, (★) 10 U/mL, (●) 12 U/mL..... 101
- Figura 4.16. Influência do pH na hidrólise da lactose (A), produção de glicose (B) e lactulose (C) por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em meio reacional sintético a 50°C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L e 7 U/mL. pH: 4 (■), 5 (●), (▲), 7 (▼) e 8 (◀)..... 104
- Figura 4.17. Influência de cátions na concentração de lactose hidrolisada por  $\beta$ -galactosidase em meio sintético a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, 7 U/mL e pH 7. Cátions: (A):  $Mn^{2+}$ , (B)  $Mg^{2+}$ , (C)  $Ca^{2+}$  e (D)  $Zn^{2+}$ . Concentração do cátion: (■) 0,1%, (●) 0,01% e (▲) 0,001% (m/v)... 109
- Figura 4.18. Lactulose produzida em relação aos cátions adicionados. (A):  $Mn^{2+}$ , (B)  $Mg^{2+}$ , (C)  $Ca^{2+}$  e (D)  $Zn^{2+}$ . Condições: 50 °C, razão

|   |     |
|---|-----|
| lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, carga enzimática de 7 U/mL e pH 7. Concentração de cátion: (■) 0,1%, (●) 0,01% e (▲) 0,001% (m/v).....  | 110 |
| Figura 4.19. Produção máxima de lactulose (g/L) (A) e Rendimento (%) (B) em g de lactulose produzida por g de lactose consumida. Concentração do cátion utilizado (% m/v): (1) 0,1%, (2) 0,01% e (3) 0,001%. A linha tracejada representa a concentração da lactulose produzida sem a adição de íons.....   | 115 |
| Figura 4.20. Resumo das condições ótimas selecionadas para a produção de lactulose por via enzimática com $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> livre e em meio sintético.....  | 116 |
| Figura 4.21. Produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase livre de <i>Kluyveromyces lactis</i> a partir do soro de leite não tratado (A) e tratado para precipitação de proteínas (B), razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, a 50 °C, carga enzimática 7 U/mL e pH 7. (■) lactose; (●) lactulose e (▲) glicose...         | 118 |
| Figura 4.22. Hidrólise de lactose (A), produção de glicose (B) e produção de lactulose (C) por $\beta$ -galactosidase livre de <i>Kluyveromyces lactis</i> a partir do soro de leite não tratado (●) e tratado (■) a 50 °C, pH 7, 150 rpm e carga enzimática de 7 UmL de enzima.....  | 119 |
| Figura 4.23. Produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase imobilizada de <i>Kluyveromyces lactis</i> a partir do soro de leite não tratado (A) e tratado para precipitação de proteínas (B), razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, a 50 °C, carga enzimática 7 U/mL e pH 7. (■) lactose; (●) lactulose e (▲) glicose..... | 121 |
| Figura 4.24. Comparação da produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> : livre no soro de leite não tratado (1), livre no soro de leite tratado (2), imobilizada no soro de leite não tratado (3), imobilizada no soro de leite tratado (4).....  | 123 |
| Figura 4.25. Estabilidade operacional do derivado obtido a partir de $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em catálise do soro de leite  |     |

|   |     |
|---|-----|
| tratado para a síntese de lactulose utilizando as condições de 50 °C, pH 7 e 150 rpm. Barras pretas: lactose; barras vermelhas: lactulose; barras azuis: glicose.....   | 124 |
| Figura 4.26. Atividade relativa (%) da enzima $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em quitosana.....  | 125 |
| Figura 4.27. Produção enzimática de lactulose por $\beta$ -galacosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> solúvel e produção de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de soro de leite. (■): lactose; (▲) glicose; (●) lactulose e (◆) etanol.....     | 126 |
| Figura 4.28. Produção enzimática de lactulose por $\beta$ -galacosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> imobilizada e produção de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de soro de leite. (■): lactose; (▲) glicose; (●) lactulose e (◆) etanol..... | 127 |

## LISTA DE TABELAS

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Tabela 2.1. | Composição típica de soro de leite doce e ácido.....  | 29  |
| Tabela 2.2. | Produtos obtidos a partir de soro de leite como matéria-prima em processos biotecnológicos.....   | 32  |
| Tabela 2.3. | Produção enzimática de lactulose: condições utilizadas e produção máxima alcançada.....   | 48  |
| Tabela 2.4. | Comparação de alguns sistemas de imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase.....   | 63  |
| Tabela 4.1. | Efeito da razão entre as concentrações de lactose e frutose na produção de lactulose pela $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> com total de 45% (m/v) de açúcares. A 37 °C, pH 7, 5 U/mL e 100 rpm.....   | 87  |
| Tabela 4.2. | Produção de lactulose por via enzimática utilizando diferentes $\beta$ -galactosidases e diferentes concentrações de substrato.....   | 93  |
| Tabela 4.3. | Influência de diferentes temperaturas na produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase livre de <i>K. lactis</i> em meio sintético a pH 7, carga enzimática de 5 U/mL e 100 rpm em até 2h de reação.....   | 97  |
| Tabela 4.4. | Influência da carga enzimática nos parâmetros de produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase utilizando meio sintético com lactose e frutose a 50 °C, pH 7, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v) e concentração total de substratos 200 g/L.....  | 102 |
| Tabela 4.5. | Influência do pH nos parâmetros de produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase utilizando meio sintético com lactose e frutose a 50 °C, 7 U/mL e 100 rpm.....  | 106 |
| Tabela 4.6: | Estudos da produção enzimática de lactulose por $\beta$ -galactosidase em diferentes pH.....  | 107 |
| Tabela 4.7. | Influência da adição de cátions nos parâmetros de produção máxima de lactulose (g/L), produtividade (g/L.h) rendimento (g de lactulose/g de lactose) por $\beta$ -galactosidase em meio sintético a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, carga enzimática de 7 U/mL e pH 7, em 2 h de |     |

|   |     |
|---|-----|
| reação.....   | 112 |
| Tabela 4.8. Produção máxima (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (%) de lactulose usando a enzima $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada no soro de leite sem tratamento e no soro de leite pré-tratado.....   | 120 |
| Tabela 4.9. Produção máxima (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (%) de lactulose usando a enzima $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> , solúvel e imobilizada, e etanol, pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , a partir do soro de leite tratado..... | 128 |

## SUMÁRIO

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>1.1</b>     | <b>Objetivos.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>1.1.1</b>   | <b><i>Objetivo geral .....</i></b>   | <b>22</b> |
| <b>1.1.2</b>   | <b><i>Objetivos específicos.....</i></b>   | <b>22</b> |
| <b>2</b>       | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>A indústria de laticínios.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2.1.1</b>   | <b><i>Produção no setor de laticínios.....</i></b>   | <b>26</b> |
| <b>2.1.2</b>   | <b><i>Soro de leite e seu reaproveitamento.....</i></b>  | <b>28</b> |
| <b>2.2</b>     | <b>Lactulose.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.2.1</b>   | <b><i>Características, importância e aplicações.....</i></b>   | <b>37</b> |
| <b>2.2.2</b>   | <b><i>Aplicações médicas e farmacêuticas da lactulose.....</i></b>   | <b>38</b> |
| <b>2.2.2.1</b> | <b><i>Constipação.....</i></b>   | <b>38</b> |
| <b>2.2.2.2</b> | <b><i>Terapia de encefalopatia porto sistêmica.....</i></b>  | <b>39</b> |
| <b>2.2.2.3</b> | <b><i>Portadores de <i>Salmonella</i> e doença inflamatória intestinal.....</i></b>                                      | <b>39</b> |
| <b>2.2.2.4</b> | <b><i>Lactulose e endotoxinas.....</i></b>   | <b>39</b> |
| <b>2.2.2.5</b> | <b><i>Redução dos níveis de amônia no sangue.....</i></b>  | <b>40</b> |
| <b>2.2.2.6</b> | <b><i>Carcinogênese do cólon e prevenção tumoral.....</i></b>  | <b>40</b> |
| <b>2.2.2.7</b> | <b><i>Aumento da absorção mineral.....</i></b>   | <b>41</b> |
| <b>2.2.2.7</b> | <b><i>Utilização em alimentos.....</i></b>   | <b>41</b> |
| <b>2.3</b>     | <b>Produção de lactulose.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>2.3.1</b>   | <b><i>Síntese química.....</i></b>   | <b>45</b> |
| <b>2.3.2</b>   | <b><i>Síntese enzimática.....</i></b>  | <b>46</b> |
| <b>2.4</b>     | <b>Purificação da lactulose.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>2.4.1</b>   | <b><i>Separação de lactulose/lactose por adsorção seletiva em peneiras moleculares zeóliticas.....</i></b>               | <b>53</b> |
| <b>2.4.2</b>   | <b><i>Separação de lactulose, lactose e galactose por meio de colunas de resinas catiônicas de troca iônica.....</i></b> | <b>54</b> |

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| <b>2.4.3</b>   | <i>Purificação da lactulose de misturas com lactose usando extração por líquido pressurizado.....</i>   | 56 |
| <b>2.4.4</b>   | <i>Cristalização da lactulose a partir de xaropes comerciais.....</i>   | 56 |
| <b>2.4.5</b>   | <i>Outras considerações sobre purificação da lactulose.....</i>   | 57 |
| <b>2.5</b>     | <i>Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase.....</i>   | 58 |
| <b>3</b>       | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | 65 |
| <b>3.1</b>     | <b>Material.....</b>  | 65 |
| <b>3.1.1</b>   | <i>Reagentes.....</i>   | 65 |
| <b>3.1.2</b>   | <i>Enzimas utilizadas.....</i>  | 65 |
| <b>3.2</b>     | <b>Métodos.....</b>   | 65 |
| <b>3.2.1</b>   | <i>Avaliação da imobilização enzimática de <math>\beta</math>-galactosidase.....</i>  | 65 |
| <b>3.2.1.1</b> | <i>Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase em Agarose-MANAE.....</i>  | 65 |
| <b>3.2.1.2</b> | <i>Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase de <i>K. lactis</i> em partículas de quitosana.....</i>  | 66 |
| <b>3.2.1.3</b> | <i>Estabilidade térmica dos derivados enzimáticos.....</i>  | 66 |
| <b>3.2.1.4</b> | <i>Determinação da atividade da enzima <math>\beta</math>-galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG.....</i>   | 66 |
| <b>3.2.2</b>   | <i>Determinação das condições reacionais para a produção de lactulose utilizando <math>\beta</math>-galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> livre.....</i> | 67 |
| <b>3.2.2.1</b> | <i>Razão entre lactose e frutose e concentração inicial de substratos.....</i>  | 67 |
| <b>3.2.2.2</b> | <i>Efeito da temperatura e pH.....</i>  | 68 |
| <b>3.2.2.3</b> | <i>Efeito da variação da carga enzimática.....</i>  | 68 |
| <b>3.2.2.4</b> | <i>Influência da presença de íons metais na síntese de lactulose.....</i>   | 68 |
| <b>3.2.3</b>   | <i>Avaliação da produção de lactulose a partir de soro de leite.....</i>  | 68 |
| <b>3.2.3.1</b> | <i>Precipitação das proteínas do soro de leite.....</i>   | 69 |
| <b>3.2.3.2</b> | <i>Produção de lactulose a partir de soro de leite.....</i>   | 69 |
| <b>3.2.3.3</b> | <i>Estabilidade operacional.....</i>  | 69 |
| <b>3.2.3.4</b> | <i>Avaliação da produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro de leite.....</i>  | 69 |
| <b>3.2.4</b>   | <i>Métodos analíticos.....</i>  | 70 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.2.4.1 | <i>Medida do pH.....</i>   | 70  |
| 3.2.4.2 | <i>Determinação da concentração de proteínas.....</i>  | 70  |
| 3.2.4.3 | <i>Quantificação dos carboidratos.....</i>   | 70  |
| 4       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | 73  |
| 4.1     | <b>Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase.....</b>  | 73  |
| 4.1.1   | <i>Imobilização da enzima <math>\beta</math>-galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> sob diferentes condições.....</i>                | 73  |
| 4.1.2   | <i>Estabilidade térmica de diferentes preparações sob diferentes condições.....</i>  | 76  |
| 4.1.3   | <i>Estabilidade na presença de etanol.....</i>   | 83  |
| 4.2     | <b>Condições ótimas para a produção de lactulose utilizando uma <math>\beta</math>-galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>.....</b> | 87  |
| 4.2.1   | <i>Razão entre as concentrações de lactose e frutose.....</i>  | 87  |
| 4.2.2   | <i>Efeito da temperatura.....</i>  | 94  |
| 4.2.3   | <i>Efeito da carga enzimática.....</i>   | 98  |
| 4.2.4   | <i>Efeito do pH.....</i>   | 103 |
| 4.2.5   | <i>Influência da presença de íons metálicos.....</i>   | 108 |
| 4.3     | <b>Avaliação da produção de lactulose a partir de soro de leite.....</b>   | 117 |
| 4.4     | <b>Produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro de leite.....</b>  | 125 |
| 5       | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | 129 |
|         | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | 130 |
|         | <b>ANEXOS.....</b>   | 154 |

## 1. INTRODUÇÃO

Com o constante crescimento populacional no planeta, também ocorre o aumento da geração de resíduos despejados no ambiente, que são produzidos, em sua grande parte, devido à intensa atividade industrial necessária para manter a demanda desse crescimento global. Dentre os principais resíduos gerados pela Indústria de Alimentos, mais especificamente no setor láctico, está o soro de leite, um subproduto do processo de fabricação de queijos que, tipicamente, contém de 5 a 8% (m/m) de sólidos, dos quais cerca de 60-80% são lactose e de 10-20% são proteínas (VAMVAKAKI *et al.*, 2010). Na última década, o total de geração de soro de leite foi de aproximadamente 140 milhões de toneladas (SEO; PARK; HAN, 2015). Esse resíduo, quando descartado sem tratamento prévio, pode causar substanciais problemas ambientais devido a sua alta Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) (50000 mg/L) e Demanda Química de Oxigênio (80000 mg/L) (SHIPRAH *et al.*, 2013). Em alguns casos observa-se a aplicação do soro de leite residual como fertilizante, no entanto, é relatado que esse uso pode trazer mais danos do que benefícios ao solo, resultado na diminuição do rendimento dos cultivos (SEO; PARK; HAN, 2015). Assim, são necessárias maneiras benéficas de gerenciar o soro de leite, buscando-se aproveitar a lactose contida em sua composição. Exemplos representativos do uso industrial dessa lactose incluem o emprego em aditivos alimentares e como ingrediente funcional em formulações infantis. Também tem sido relatado a utilização da lactose presente no soro de leite para a produção de enzimas, como a  $\beta$ -galactosidase (FREITAS, 2013; LIMA *et al.*, 2013). Outra alternativa promissora é produzir derivados da lactose com valor agregado, como lactulose, lactitol, ácido lactobionico, lactose-uréia, galacto-oligossacarídeos (GOS) e lactosacarose (SPALATELU, 2012).

A lactulose (fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), um dissacarídeo composto de frutose e galactose, é um dos prebióticos mais importantes e amplamente utilizados (WANG, 2009). A lactulose e os GOS são prebióticos derivados da lactose, ambos representando uma excelente oportunidade para o reaproveitamento da lactose (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). As misturas de GOS-lactulose podem ser produzidas por biocatálise enzimática, de modo que a sua performance como uma mistura requer estudos mais consistentes (GUERRERO *et al.*, 2015). Esse dissacarídeo é um composto bastante versátil que possui aplicações significativas nos campos

alimentício e farmacêutico, sendo as aplicações médicas destacadas entre os compostos derivados da lactose, que prevê um futuro promissor em termos de crescimento do mercado, aceitação do consumidor e impacto social.

A produção industrial atual de lactulose ocorre em grande parte por via química, utilizando-se catalisadores químicos que conduzem o processo a diversos inconvenientes, como a necessidade de várias etapas posteriores (*downstream*) para obtenção de um produto em uma forma mais purificada para ser utilizado. Isso faz também com que mais resíduos tóxicos sejam gerados, formando um problema ambiental que, ao longo dos anos, se torna cada vez maior. Uma alternativa promissora para esse processo utilizado atualmente seria o emprego de bioprocessos via enzimática, por ser considerado um método de alta seletividade e uma tecnologia “verde”, uma vez que os procedimentos são mais brandos e geram menos resíduos, tornando os processos de purificação menos dispendiosos.

A formação de lactulose por catálise enzimática pode ocorrer por um rearranjo molecular da lactose ou pela formação de uma ponte  $\beta$ -glicosídica entre galactose e frutose (PANESAR *et al.* 2013; WANG *et al.*, 2013), sendo essa última forma catalisada por  $\beta$ -galactosidases (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHSH, 2010 PANESAR *et al.*, 2013). As  $\beta$ -galactosidases (EC 3.2.1.23) são os biocatalisadores mais adequados por serem enzimas robustas prontamente disponíveis e com um amplo registro de uso como catalisador na indústria de alimentos para hidrólise de lactose na produção de leite com baixo teor de lactose e outros produtos lácteos (PANESAR; KUMARI, 2011, PLOU; SEGURA; BALLESTEROS, 2007).

Dessa forma, a presente tese buscou, em um momento inicial, reunir informações a respeito do que está compilado na literatura sobre o tema citado acima. O texto foi divido em uma primeira parte, intitulada, Revisão Bibliográfica. Então, o estudo seguiu com a parte experimental, buscando avaliar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em diferentes suportes e, em seguida, otimizar a produção de lactulose por via enzimática, a partir de lactose e frutose. Como etapa final para o reaproveitamento do soro de leite residual da indústria de alimentos e, conhecendo as condições ótimas para a produção com a enzima avaliada, buscou-se desenvolver um processo que envolve o uso dessa enzima para o consumo do soro de leite como substrato na reação, sintetizando como produto final a lactulose. A seguir, são apresentados os objetivos, tanto o geral como específicos, do presente estudo.

## 1.1.OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o processo de produção enzimática de lactulose a partir de soro de leite pela enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a imobilização enzimática de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e *Aspergillus oryzae* em suportes adequados (quitosana e agarose-Manae, respectivamente) visando a produção de lactulose;
- ✓ Avaliar os efeitos da razão lactose/frutose, concentração inicial de substrato, temperatura, carga enzimática, pH e concentração de íons na produção de lactulose a partir de lactose e frutose utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*;
- ✓ Estudar a produção de lactulose diretamente no soro de leite por via enzimática a partir das condições ótimas descritas com a enzima livre e imobilizada;
- ✓ Avaliar a estabilidade operacional do derivado enzimático obtido na produção de lactulose a partir do soro de leite;
- ✓ Analisar a possibilidade da produção conjunta de lactulose e etanol em mesma batelada a partir de soro de leite por via enzimática e fermentativa, respectivamente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nas últimas décadas tem se observado uma intensa preocupação com os aspectos relacionados à proteção ambiental, especialmente no que diz respeito à geração de resíduos industriais e o tipo de tratamento que os mesmos devem receber antes de serem lançados ao ambiente.

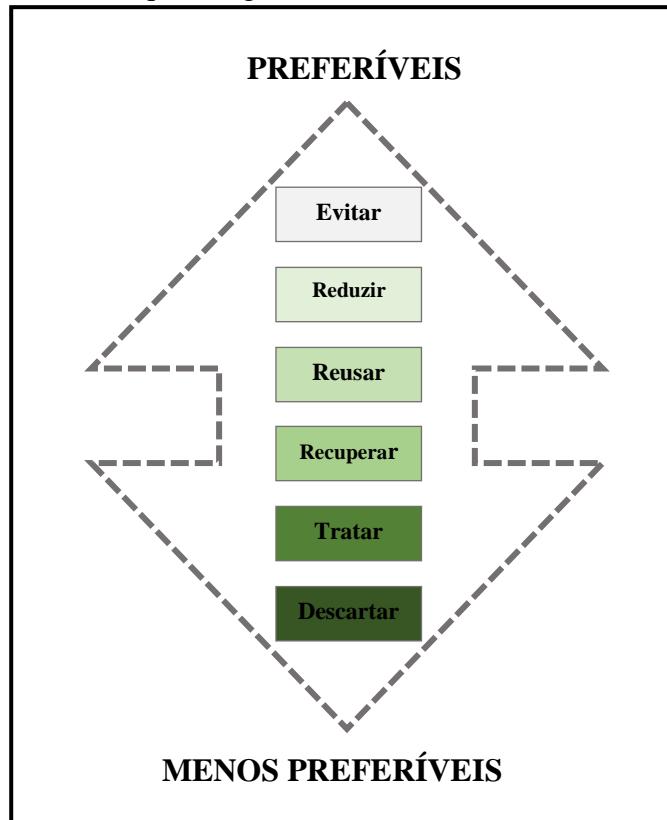
Com o passar dos anos, as características da economia mudaram, passando da agricultura para o setor industrial devido ao rápido crescimento econômico e desenvolvimento nesse campo. Tal nível de desenvolvimento industrial resultou na geração de elevadas quantidades de resíduos industriais complexo e danosos. O termo resíduo industrial refere-se a todos os subprodutos produzidos a partir de atividades e processos de fabricação industrial. Um dos rápidos desafios do rápido desenvolvimento industrial é como reduzir os impactos negativos desses despejos industriais (KOOLIVAND; MAZANDARANIZADEH; BINAVAPOOR, 2017).

No passado, os geradores de resíduos industriais despejavam seus resíduos no ambiente sem qualquer tratamento prévio, contudo, atualmente, indústrias e outros geradores são legalmente responsáveis pelo gerenciamento dos seus rejeitos, assim, as indústrias devem tratar seus resíduos ou buscar companhias qualificadas para esse procedimento. Com o intuito de preservar o ambiente, processos de minimização, separação e reciclagem de resíduos devem ser desenvolvidos e aplicados da forma mais eficaz possível. Em contrapartida, o interesse nos resíduos industriais como uma fonte de energia e material tem aumentado cada vez mais (NASRULLAH *et al.*, 2014).

A hierarquia do gerenciamento de resíduos é um dos principais guias das práticas de desperdício zero (Figura 2.1). Por analogia com esse princípio, o desenvolvimento de processos de produção verde pode ser alcançado seguindo curtos, médios ou longos prazos.

A minimização de resíduos, racionalização e recuperação de matérias recuperáveis e utilizáveis tem sido tradicionalmente tratadas como partes integrantes na fase de planejamentos dos desenhos de plantas industriais. Contudo, uma vez que o processo de produção é estabelecido, o gerenciamento dos resíduos formados e sua coordenação com o processo de produção exerce um papel crucial na alocação ótima dos recursos a partir de perspectivas econômicas e ambientais (BARBOSA-POVOA, 2007).

Figura 2.1: Hierarquia do gerenciamento de resíduos de alimentos



Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Kosseva, 2009)

A questão do gerenciamento de resíduos é usualmente tida como um problema de tratamento de redes de água residuais, o que é apenas uma pequena parte dos problemas relacionados ao tratamento de efluentes (JEZOWSKI, 2008). Efluentes líquidos, originados a partir de atividades industriais, contêm contaminantes e certas substâncias, como solventes orgânicos, com material e energia com potencialidade de recuperação. Além isso, a gestão de resíduos não é apenas um problema de fim de linha, mas também uma potencial origem de reservas, que pode resultar em benefícios significativos se a integração de material e energia são utilizadas (CAPÓN-GARCÍA; PAPADOKONSTANTAKIS; HUNGERBÜHLER, 2014).

Resíduo alimentício é um tipo de resíduo orgânico descartado a partir do processamento de alimentos em plantas industriais, cozinhas domésticas ou comerciais, lanchonetes e restaurantes que representam uma considerável proporção dos resíduos sólidos municipais ao redor do mundo. A quantidade desses resíduos é crescente devido ao rápido crescimento da população e economias globais, como Brasil (KIRAN; TRZCINSKI, LIU, 2014a). Sua produção abrange todo o ciclo de vida dos alimentos:

desde a fase agrícola, até o processamento e fabricação industrial, varejo e uso doméstico (MIRABELLA; CASTELLANI; SERENELLA, 2014).

Os resíduos na indústria de alimentos são caracterizados por uma alta proporção de produtos específicos, o que torna inevitável não somente a geração desse tipo de produto, mas também podem alterar a quantidade e tipo de produtos residuais, que consistem primariamente de resíduos orgânicos de matérias primas processadas. A utilização e remanejamento de resíduos específicos é complexa, devido a sua estabilidade biológica inadequada, potencial natureza patogênica, alto conteúdo de água, potencial para rápida oxidação e alto nível de atividade enzimática. Os diversos tipos de resíduos gerados por vários ramos da indústria de alimentos podem ser quantificados com base no seu respectivo nível de produção (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012). Esses resíduos são compostos principalmente por carboidratos (amido, celulose e hemicelulose), proteínas, lipídeos e ácidos orgânicos. O conteúdo de carboidratos e proteínas totais encontram-se na faixa de 35,5 – 69% e 3,9 – 21,9%, respectivamente (KIRAN; TRZCINSKI, LIU, 2014b).

O gerenciamento de resíduos e subprodutos na indústria de alimentos apresenta problemas nas áreas de proteção ambiental e sustentabilidade. Geralmente, as matérias primas e coadjuvantes, bem como os ácidos processados, entram no processo de produção e saem como os seguintes produtos: um produto desejado, um produto não específico ou um resíduo de produto específico. Esses últimos são acumulados como resultado do processamento de matérias-primas e são obtidos durante as várias etapas de produção, nas quais os compostos de interesse são extraídos a partir das matérias primas. Após a extração, frequentemente existem outros compostos usualmente potenciais presentes nos materiais renascentes (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012).

Sistemas fechados são a base da chamada simbiose industrial, em que o objetivo é utilizar resíduos de um setor como insumo para outros. A grande quantidade de resíduos produzidos pela indústria alimentícia, além de acarretar em uma grande perda de materiais de valor, também levam a sérios problemas de gerenciamento, ambos do ponto de vista econômico e ambiental. Muitos desses resíduos, no entanto, têm um potencial para serem reutilizados, em outros sistemas de produção, como em biorefinarias (MIRABELLA; CASTELLANI; SERENELLA, 2014).

No contexto do aproveitamento de resíduos, o surgimento da Engenharia de Bioprocessos é uma ferramenta útil para a pesquisa acadêmica e industrial, que possuem um desafio revolucionário para a produção de biomoléculas de alto valor (DORAN,

2012). Pré-tratamentos com agentes físicos e biológicos, seguidos por reações de purificação controladas, conferem valor agregado a antioxidantes naturais, agentes antimicrobianos, vitaminas e macromoléculas (enzimas, celulose, amido, lipídeos, proteínas e pigmentos), que têm imenso interesse para as indústrias química, petroquímica, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Além disso, muitos outros compostos, que são obtidos com a utilização de pré-tratamento por meio de hidrólise de subprodutos ou resíduos, podem ser convertidos em processos biotecnológicos (MURTHY; NAIDU, 2012).

Dentre as indústrias que mais geram resíduos no mundo, encontra-se a indústria de laticínios, uma das mais importantes globalmente dentro do setor agroindustrial, representando o maior e mais importante contribuinte para geração de resíduos líquidos da indústria de alimentos (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Atualmente, pesquisas inovadoras sobre a produção industrial de baixo custo não poluente e atividades de recuperação são necessárias para fornecer um ambiente industrial sustentável, aliviando efeitos ambientais desfavoráveis (AYDINER *et al.*, 2016). A indústria láctea é uma das fontes mais importantes de geração de águas residuais de processamento de alimentos (PRAZERES *et al.*, 2012). Soro de leite, considerado um subproduto valioso, é o principal componente das águas residuais de produtos lácteos que é avaliado como um material recuperável em relação à disponibilidade de alimentos (AYDINER *et al.*, 2013).

Estudos também têm mostrado a viabilidade para a recuperação da água presente no soro de leite. É possível, por exemplo, com o uso combinado de sistemas de ultrafiltração e osmose, recuperar cerca de 47% da água. No entanto, esses procedimentos para purificação desse efluente ainda se mostram muito custosos para a indústria (MENESES; FLORES, 2016).

Diante disso, na seção a seguir, contextualiza-se a importância da indústria de laticínios, bem como a produção de um dos seus principais resíduos, o soro de leite.

## **2.1. A indústria de laticínios**

### ***2.1.1. Produção no setor de laticínios***

O leite e os produtos lácteos são comumente utilizados na alimentação em diversas formas. Mesmo assim, os constituintes do leite também encontram numerosas

alternativas de aplicações além de alimentos, como fabricação de plásticos, fibras têxteis, colas ou produção de etanol e metanol (AUDIC; CHAUFER; DAUFIN, 2003). No entanto, a principal indústria que utiliza o leite como matéria-prima segue sendo a indústria de alimentos.

A indústria de produtos lácteos não somente possui um impacto econômico, mas cria centenas de empregos diretos e indiretos, representando benefícios econômicos local e regionalmente. No Brasil, observa-se uma grande importância do setor de laticínios na economia nacional. Em 2016, por exemplo, estima-se que a produção de leite de vaca foi 35 milhões de litros, sendo o consumo per capita nesse mesmo ano estimado em 174 litros por habitante (IBGE, 2016).

Essa indústria está subdividida em muitos setores que, juntos, são responsáveis por uma elevada produção de águas residuais. Esses efluentes possuem diferentes características, de acordo com o produto obtido (iogurte, queijo, manteiga, leite, sorvete, etc.). Além disso, o gerenciamento de resíduos, clima, condições operacionais e tipos de higienização, influenciam nas características dos efluentes de laticínios, contribuindo substancialmente para a poluição da superfície das águas e solo.

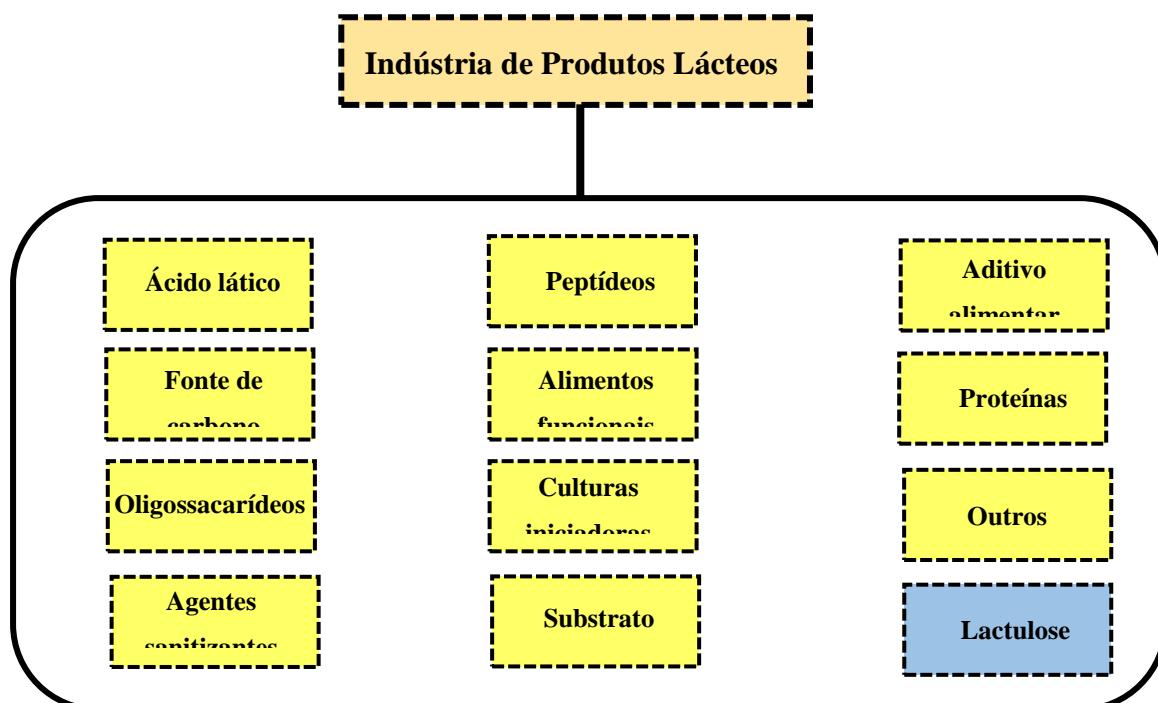
Dentre os parâmetros chave que caracterizam esses resíduos, os efluentes oriundos de laticínios se apresentam relativamente com altas cargas orgânicas monitorados por Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) na faixa entre 0,1 e 100 kg/m<sup>3</sup> com um índice de biodegradabilidade (DBO<sub>5</sub>/DQO) tipicamente na faixa de 0,4 e 0,8. Além disso, o conteúdo lipídico (0,1 a 10,6 Kg/m<sup>3</sup>), sólidos suspensos (0,1 e 22 Kg/m<sup>3</sup>) e nutrientes (N e P) também contribuem para os níveis de contaminação (KOSSEVA, 2009).

A natureza mutável dos efluentes de produtos lácteos tornam o seu tratamento uma tarefa difícil. Sem o tratamento apropriado, esses efluentes podem levar a graves perigos ambientais (RIVAS; PRAZERES; CARVALHO, 2011). Processos biológicos e físico-químicos são usualmente sugeridos para manejar os efluentes de produtos lácteos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Os efluentes da produção de sorvetes, manteigas e queijos são as fontes mais importantes de contaminação orgânica da indústria de produtos lácteos. A produção de queijos é responsável pelos três principais tipos de efluentes: soro de leite (resultante da produção de queijos), segundo soro de leite (resultante da produção de queijo tipo *cottage*) e terceiro águas residuais de soro de leite (água de lavagem que contem diferentes frações de soro de leite).

Segundo Mirabella, Castellani e Serenella (2014) existem diversos compostos que podem ser obtidos a partir do processamento de produtos lácteos (Figura 2.2), o que aumenta o potencial dessa indústria para a geração de resíduos. Efluentes da produção de queijos, por exemplo, representam um significativo impacto ambiental em indústrias de produtos lácteos devido as suas características físico-químicas, como a sua concentração de minerais (0,46 e 10%), sólidos totais suspensos (0,1 e 22 Kg/m<sup>3</sup>), pH (3,3 e 9,0), fósforo (0,006 e 0,5 Kg/m<sup>3</sup>), nitrogênio total Kjeldahl (0,01 e 1,7 Kg/m<sup>3</sup>), carga orgânica (0,6 e 102 Kg/m<sup>3</sup>), etc. O elevado valor de matéria orgânica é devido a lactose (0,18 e 60 Kg/m<sup>3</sup>), proteína (1,4 e 33,5 Kg/m<sup>3</sup>) e conteúdo de lipídeos (0,08 e 10,58 Kg/m<sup>3</sup>). Essa matéria orgânica é em torno de 99% biodegradável (PRAZERES, CARVALHO; RIVAS, 2012).

Figura 2.2. Principais compostos de valor derivados da indústria de produtos lácteos



Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Mirabella, Castellani e Serenella (2014)).

### **2.1.2. Soro de leite e seu reaproveitamento**

O soro de leite é o maior subproduto da indústria de fabricação de queijos e apresenta um importante problema ambiental uma vez que seu despejo é altamente

contaminante (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). O soro é uma mistura heterogênea de diferentes tipos de proteínas, como imunoglobulinas,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoalbuminas, albumina do soro bovino, lactoferrina e glicomacropéptideos (NATH *et al.*, 2015).

O soro tem diversas definições, uma vez que é a parte sérica ou aquosa do leite remanescente após a separação da coagulada resultante da coagulação do leite por enzimas proteolíticas ou ácido. O tipo e a composição do soro em indústrias lácteas dependem principalmente da técnica de processamento, resultando em remoção de caseína do leite fluido (Tabela 2.1).

O tipo de soro mais frequentemente encontrado origina-se da produção de queijo, onde o processamento baseia-se na coagulação da caseína por coalho, uma preparação industrial que contém quimiosina ou outras enzimas coagulantes de caseína. Uma vez que a coagulação induzida ocorre em pH 6,5, aproximadamente, este tipo de soro é referido como soro de leite doce. O segundo tipo de soro de leite, soro ácido ( $\text{pH} < 5$ ), resulta de processos que utilizam fermentação ou adição de ácidos orgânicos ou minerais para coagular a caseína, como na fabricação de queijos frescos (KOSSEVA, 2009).

Tabela 2.1. Composição típica de soro de leite doce e ácido

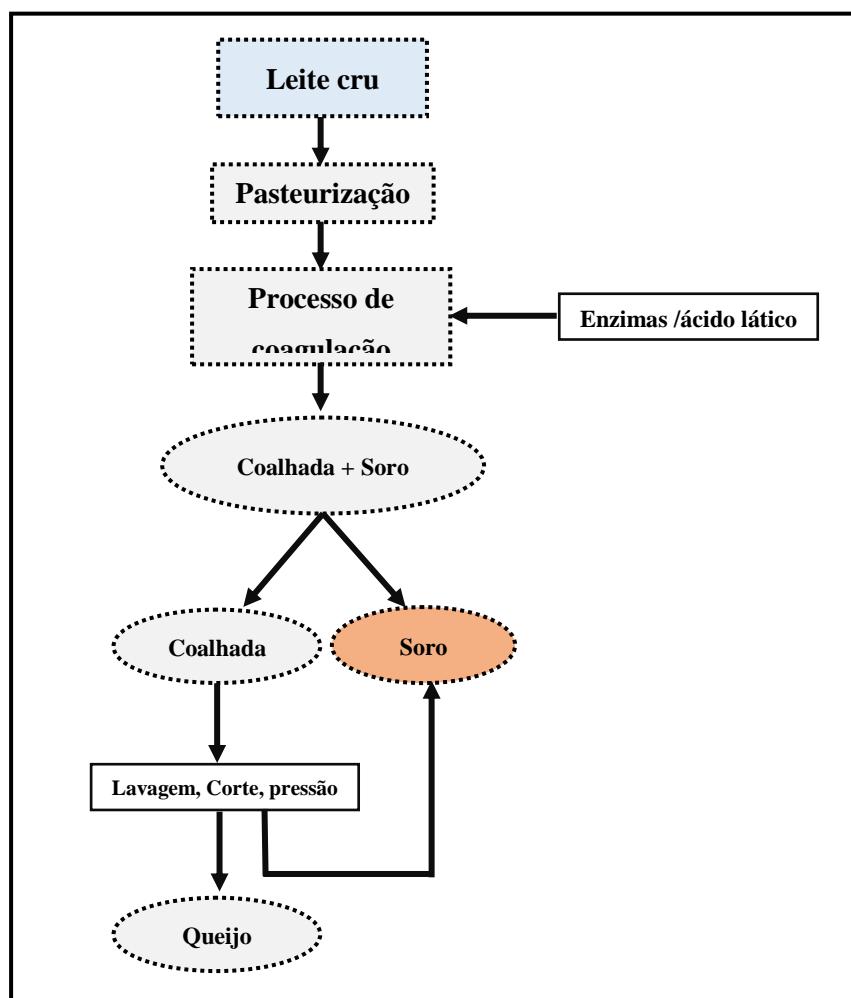
| Componentes    | Soro de leite doce (g/L) | Soro de leite ácido (g/L) |
|----------------|--------------------------|---------------------------|
| Sólidos totais | 63,0–70,0                | 63,0–70,0                 |
| Lactose        | 46,0–52,0                | 44,0–46,0                 |
| Proteínas      | 6,0–10,0                 | 6,0–8,0                   |
| Cálcio         | 0,4–0,6                  | 1,2–1,6                   |
| Fosfato        | 1,0–3,0                  | 2,0–4,5                   |
| Lactase        | 2,0                      | 6,4                       |
| Cloreto        | 1,1                      | 1,1                       |

Fonte: Kosseva, 2009.

O soro apresenta uma alta carga orgânica (DQO em torno de 68 g/L) e, dessa forma, deve ser tratado antes de ser liberado no ambiente como água residual (SADDOUD; HASSAÏRI; SAYADI, 2007). Esse resíduo pode ser valorizado na produção de produtos com alto valor agregado como compostos nutricionais (como por exemplo, aditivos para alimentos infantis) e usado na fabricação de medicamentos. A

Figura 2.3 apresenta uma representação esquemática geral da produção de queijo e soro de leite a partir da transformação do leite. O leite cru é submetido a um tratamento térmico de pasteurização (que objetiva reduzir a população de patogênicos). Após essa etapa, uma cultura de micro-organismos, como do gênero *Lactobacillus* ou *Streptococcus*, é inoculada no leite pasteurizado para converter a lactose em ácido lático. Então ocorre, finalmente, um processo de coagulação enzimática (com atuação de quimosinas e pepsinas) e, assim, é gerado o soro de leite, que deve ser separado da massa de proteínas precipitadas (coalhada), que forma o queijo (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2017).

Figura 2.3. Esquema da produção de soro de leite durante a produção de queijo



Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Fernández-Gutiérrez, 2017)

O soro de leite é composto principalmente por água, que representa de 93 – 95% (m/m) e contém cerca de 50% de nutrientes do leite (LIEVORE *et al.* 2015). Para

cada 1 L de soro, há entre 60 e 70 g de sólidos. A fração de matéria seca é composta aproximadamente de 66 – 77% (m/m) de lactose, 8 – 15% (m/m) de proteínas e 7 – 15% (m/m) de minerais, além de uma porção menor de nitrogênio não proteica (como aminoácidos), vitaminas (como, A, D e B5), elementos traços (como zinco) e enzimas (como lactoperoxidase) (PANESAR *et al.* 2007). As proteínas do soro de leite são albuminas (acima de 90% m/m), lactoferrina e imunoglobulinas, que representam aproximadamente 20% (m/m) das proteínas do leite. Essas proteínas possuem propriedades antiviral, antimicrobiana e antioxidante e, portanto, tornaram-se um produto de alto valor agregado para a indústria alimentícia (PATEL, 2015).

Uma vez que a lactose é o principal componente de soro de leite, além de vitaminas, minerais e proteínas solúveis em água, vários processos biotecnológicos, usando diferentes micro-organismos/enzimas, têm sido desenvolvidos para utilizar o soro para a produção de alguns produtos úteis da indústria (KOSSEVA, 2009). O soro de leite também pode ser usado como matéria-prima para obtenção de produtos com alto valor agregado. Assim, esses resíduos podem ser utilizados como substrato para obtenção de proteínas com alto valor biológico, por meio de tratamentos físico-químicos que envolvem separação por membranas ou ultrafiltração (SALTIKA *et al.*, 2017), ou tratados biologicamente, sendo convertidos em biogás ( $H_2$ ) (POWELL *et al.*, 2013), peptídeos bioativos (YADAV *et al.*, 2015), goma xantana (NIKNEZHAD *et al.*, 2015), ácido hialurônico (AMADO *et al.*, 2016) e álcoois, como etanol (PARASHAR *et al.*, 2016). A seguir, na Tabela 2.2, estão apresentados diversos produtos obtidos a partir da utilização do soro de leite como matéria-prima, visando, assim, a agregação de valor a esses materiais.

Tabela 2.2. Produtos obtidos a partir de soro de leite como matéria-prima em processos biotecnológicos

| Micro-organismos  | Bioproductos           | Condições utilizadas |                  |                |          | Concentração máxima do produto  | Referência                              |
|---|------------------------|----------------------|------------------|----------------|----------|---------------------------------|---|
|   |                        | pH                   | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | Tempo    |                                 |   |
| <i>K. marxianus</i> ITD00262                              | 2-fenil-etanol         | 4,8                  | 30               | 180            | 96h      | 0,96 g/L                        | Conde-Baéz <i>et al.</i> (2017)         |
| <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Candidate division TM7 e</i> | Poli-hidroxialcanoatos | 4 -7                 | 25               | 250            | 325 dias | 0,68 g DQO /gDQO                | Gouveia <i>et al.</i> (2017)            |
| <i>Lactococcus</i> .                                      |                        |                      |                  |                |          |                                 |   |
| <i>Bacillus</i> sp.<br>ZBP4                               | Bacteriocinas          | 8                    | 33               | 125            | 24 h     | Por tamanho de halo de inibição | Avci, Çağrı-mehmetoğlu e Arslan, (2017) |
| <i>C. curvatus</i><br>NRRL Y-1511                         | Lipídeos               | 5,5                  | 30               | 185            | 5 dias   | 6,83 g/L                        | Carota <i>et al.</i> (2017)             |

Tabela 2.2 (Continuação). Produtos obtidos a partir de soro de leite como matéria-prima em processos biotecnológicos

|                                |                    |      |    |     |        |            |                                 |
|--------------------------------|--------------------|------|----|-----|--------|------------|---------------------------------|
| <i>Pseudomonas taetrolens</i>  | Ácido lactobiônico | 6,5  | 30 | 250 | 50h    | 78 g/L     | Alonso, Rendueles e Díaz (2015) |
| <i>Aspergillus terreus</i>     | Lovastatina        | 6,5  | 28 | 180 | 3 dias | 183,54mg/L | Karthika <i>et al.</i> (2013)   |
| <i>Mortierella isabellina</i>  | Ácidos graxos      | 6,0  | 28 | 180 | 24h    | 3,65 g/L.  | Demir <i>et al.</i> (2013)      |
| <i>Lactobacillus casei</i>     | Ácido lático       | 4,6  | 37 | 150 | 36h    | 33,73 g/L  | Shiprahah <i>et al.</i> (2013)  |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Etanol             | 4,76 | 25 | -   | 48h    | 8,61 g/L   | Jędrzejewska; Kozak (2011)      |
| <i>Rhodotorula acheniorum</i>  | β-caroteno         | 5,88 | 23 | -   | -      | 10,69 mg/g | Nasrabadi e Razavi (2011)       |

Tabela 2.2 (Continuação). Produtos obtidos a partir de soro de leite como matéria-prima em processos biotecnológicos

|                                 |  |     |    |     |        |              |                                     |
|---------------------------------|--|-----|----|-----|--------|--------------|-------------------------------------|
| <i>Lactobacillus casei</i>      | Biomassa<br>( <i>Lactobacillus casei</i> ) | 5,5 | 37 | 300 | 23h    | 3,5 g/L      | Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010)   |
| <i>Lactobacillus casei</i>      | Diacetil e acetoína                        | 5,5 | 37 | 100 | 48h    | 1,4 g/L      | Nadal et al. (2009)                 |
| <i>Aspergillus succinogenes</i> | Ácido succínico                            | 6,8 | 38 | 200 | 48h    | 21,2 g/L     | WAN et al. (2008)                   |
| <i>Dietzia natronolimnaea</i>   | Cantaxantina                               | 7,6 | 30 | 200 | 8 dias | 2871±76 µg/L | Khodaiyan, Razavi, e Mousavi (2008) |
| <i>Xanthomonas campestris</i>   | Goma xantana                               | 6   | 28 | 250 | 72h    | 8,84 g/L     | Ashraf, Soudi e Sadeghizadeh (2008) |

Tabela 2.2 (Continuação). Produtos obtidos a partir de soro de leite como matéria-prima em processos biotecnológicos

|                                  |                   |     |    |     |     |             |                                     |
|----------------------------------|-------------------|-----|----|-----|-----|-------------|-------------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i>    | Biosurfactante    | 7   | 45 | 160 | 72h | 34–37 mN/m  | Joshi <i>et al.</i> (2008)          |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Dextrana          | 5,5 | 35 | 150 | 14h | 8,56 g/L    | Santos, Rodrigues e Teixeira (2005) |
| <i>Lactococcus lactis</i>        | Nisina            | 6,5 | 30 | 160 | 12h | 92,132 mg/L | Liu <i>et al.</i> (2003)            |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | Exopolisacarídeos | 5,0 | 38 | 200 | 28h | 325 mg/L    | Briczinski e Roberts (2002)         |

Alguns estudos, em quantidade relevante em relação ao emprego de micro-organismos, também demonstram a utilização de enzimas na conversão de soro de leite em produtos com maior valor agregado. Na literatura pode-se encontrar diversos processos que alcançaram êxito na utilização de enzimas para conversão de soro de leite em outros produtos. Corzo-Martinez *et al.* (2016), por exemplo, estudaram um novo método de bioconversão para a utilização de soro de leite, como um precursor de ingredientes de alto valor agregado, como fruto-oligossacarídeos e  $\alpha$ -galactosidases frutosiladas. Para tal, utilizaram o preparado enzimático industrial Pectinex Ultra SP-L (uma mistura de pectinases de *Aspergillus aculeatus*) e, dessa forma, foi possível converter a sacarose, rafinose e estaquiose em fruto-oligossacarídeos prebióticos, que possuem grande importância nutricional.

Nath *et al.* (2015) compilaram diversos estudos sobre a síntese e funcionalidade de proteináceos a partir de soro de leite como forma de buscar alternativas para redução dos impactos ambientais causados pela geração desse resíduo. Esses autores relatam que diferentes tipos de enzimas, como tripsinas, quimotripsinas, alcalases, pepsinas e quimosinas têm sido utilizadas para hidrólise enzimáticas das proteínas do soro de leite. Proteínas do soro, como  $\alpha$  e  $\beta$ -lactoalbumina, albumina de soro bovino, lactoperoxidase, lactoferrina e imunoglobulinas têm funções fisiológicas, medicinais, funcionais e nutricionais específicas. É esperado que mesmo sem um tratamento específico do soro (como com a coagulação ou a sedimentação de proteínas), a síntese de bioativos proteináceos por meio enzimático possa conduzir a uma potencial redução da descarga de efluentes.

Koutinas, Menelaou e Nicolaou (2014) exploraram o potencial para o desenvolvimento de um processo fermentativo e enzimático (processo híbrido) para a produção de lactato de etilo a partir de soro de leite. Utilizaram-se culturas de *Kluyveromyces marxianus* e *Lactobacillus bulgaricus* para produzir etanol e ácido láctico, respectivamente. Subsequentemente, os produtos de fermentação foram transferidos para uma fase orgânica através de extração líquido-líquido e formou-se lactato de etilo numa reação de esterificação catalisada por lipases.

Díez-Municipio *et al.* (2012) estudaram a síntese de trissacarídeos com potencial prebiótico a partir de soro de leite e sacarose pela enzima dextrana-sacarase (2- $\alpha$ -D-glicopiranósil-lactose) de *Leuconostoc mesenteroides*. Os resultados indicaram que o soro de leite é um material com potencial de utilização para a síntese das substâncias citadas, alcançando rendimento em torno de 50%, sob as condições ótimas

de reação. De acordo com sua estrutura, esse trissacarídeo é um excelente candidato a novo ingrediente prebiótico devido à alta resistência das ligações  $\alpha$ -(1→ 2) às enzimas digestivas em humanos e animais, bem como ao seu potencial de estimulação seletiva de bactérias benéficas no intestino grosso.

Ademais, alguns estudos também investigam a produção de enzimas a partir de soro de leite como substrato. Barbosa *et al.* (2014), por exemplo, analisaram o potencial de utilização de soro de leite e farinha de casca de maracujá para a produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, obtendo-se uma atividade enzimática máxima de 12,4 U/mL. Lima *et al.* (2013), por sua vez, selecionaram cepas para a produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de soro de leite residual da indústria de alimentos. Também há relatos da produção de lipases a partir de soro de leite, como no caso de Silva *et al.* (2014), que estudaram, por meio de planejamento experimental, a estabilidade de lipases produzidas por cultivo submerso de *Yarrowia lipolytica* em soro de leite, glicerol e azeite de oliva como indutores. Esses pesquisadores concluíram que foi necessário um tempo de 120 h para a produção da enzima sob as condições ótimas alcançadas.

Nos últimos anos, alguns trabalhos também têm citado a produção biotecnológica de lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-frutofuranose), que é um dissacarídeo composto de galactose e frutose unidas por uma ponte  $\beta$ -1,4-glicosídica (PANESAR; KUMARI, 2011). Recentemente, a lactulose tem recebido uma atenção particular devido ao seu amplo uso nos campos da indústria alimentícia, farmacêutica e de alimentação animal (WU *et al.*, 2017). Devido a grande relevância dessa substância e ao seu grande leque de utilizações, considerou-se necessário um maior levantamento de dados a seu respeito. Portanto, na seção a seguir, apresenta-se um estudo mais detalhado sobre a literatura de pesquisas científicas desenvolvidas nos últimos anos visando a produção de lactulose, bem como diversos processos de produção dessa substância.

## **2.2. Lactulose**

### **2.2.1. Características, importância e aplicações**

Lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-frutose) é um dissacarídeo sintético (formado por uma molécula de frutose e uma de galactose) não digerível no qual ambos monômeros estão ligados por uma ponte  $\beta$ -glicosídica (SCHUMANN, 2002). A ligação  $\beta$  1–4 entre ambos os carboidratos permite a existência de cinco formas anoméricas de

lactulose (KIM; PARK; OH, 2006). Essa substância é 50% mais doce que a lactose e 60% a mais que a sacarose (PANESAR; KUMARI, 2011). Lactulose é 15 vezes mais solúvel que a lactose em propanol, isopropanol, etanol e metanol a 30 °C, o que permite sua purificação a partir de soluções alcoólicas nas etapas finais do seu processamento (MONTAÑÉS; OLANO; IBÁÑEZ, 2007).

Desde os anos de 1950, a lactulose tem sido usada como um medicamento para o tratamento de encefalopatia e constipação tanto em humanos como em animais (SILVÉRIO *et al.*, 2016). Nas últimas décadas, tem-se conferido maior atenção ainda, devido as suas propriedades terapêuticas e promovedoras de saúde, sendo considerada um dos compostos derivados da lactose com maior valor comercial (WANG *et al.*, 2013). Como um carboidrato prebiótico, pode promover o crescimento de algumas bactérias benéficas no intestino, como as do gênero bifidobactérias e lactobacilos (AIDER; HALLEUX, 2007) e inibir o crescimento de bactérias patogênicas como a *Salmonella* (PANESAR; KUMARI, 2011). No setor alimentício, devido ao seu baixo teor calórico, é utilizada como um açúcar substituto e como um promotor de saúde (PANESAR; KUMARI, 2011; SONG *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Aplicações médicas e farmacêuticas da lactulose**

Diversos estudos demonstram a aplicabilidade da lactulose no campo médico e farmacêutico. A seguir são apresentadas diversas utilizações que fazem da lactulose uma substância de grande interesse científico atualmente.

#### *2.2.2.1. Constipação*

Em alguns casos de constipação é necessário o uso de laxantes em quantidade variável. Atualmente existe uma enorme variedade de laxantes disponíveis no mercado, sendo que os modos de ação geralmente consistem no aumento da massa fecal (formação de massa), no estímulo dos nervos colônicos ou na lubrificação com substâncias osmoticamente ativas, como a lactulose (AÍT-AISSA; AÍDER, 2014a). Desde a década de 1960, lactulose vem sendo administrada para tratar a constipação em pacientes de todas as idades, incluindo bebês. É utilizada para alívio da constipação, incluindo constipação crônica, funcionando por cerca de 24-48 h. A lactulose permanece inalterada quando atinge os intestinos e, uma vez alcance-os, será dividida nos seus componentes ativos pelas bactérias presentes (como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus bifidus*), aumentando a ação dos intestinos e mantendo o bolo líquido,

de modo a colaborar para a impulsão das fezes (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2012).

#### *2.2.2.2. Terapia de encefalopatia porto sistêmica*

Após o uso contra constipação, o uso de lactulose na prevenção e tratamento da encefalopatia hepática é a aplicação farmacêutica mais importante. Esse quadro representa uma síndrome neuropsiquiátrica que pode progredir na forma de transtornos mentais, chegando ao coma (SCHUMANN, 2002; BRUZZESE *et al.*, 2006; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008). Essa doença é induzida por altas concentrações de amônia do sangue, que é consequência de um mau funcionamento hepático que não permite a remoção adequada. A amônia é produzida pela degradação da proteína causada por bactérias intestinais e, quando insuficientemente removido no nível hepático, atua como um composto neurotóxico no cérebro (BRUZZESE *et al.*, 2006; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; AÏT-AISSA; AÏDER, 2014b).

#### *2.2.2.3. Portadores de *Salmonella* e doença inflamatória intestinal*

É comprovado o potencial de lactulose para uso clinicamente significativo como um poderoso prebiótico em portadores de *Salmonela* não tifoide. Para esses casos, a lactulose é utilizada em dosagens de até 60 g por dia. Acredita-se que a ação se deve a uma queda acentuada do pH do cólon, o que torna a sobrevivência da *Salmonela* difícil (SCHUMANN, 2002). A doença inflamatória intestinal diz respeito a um conjunto de condições inflamatórias do cólon e intestino. A colite ulcerativa e a doença de Crohn são duas doenças crônicas importantes da doença inflamatória intestinal (TALLEY *et al.*, 2011). Os efeitos da lactulose tanto nas bactérias como em endotoxinas bacterianas no intestino fornecem uma base teórica para a sua utilização no tratamento da doença inflamatória intestinal. A terapia oral de pacientes com lactulose leva ao aumento na produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular no cólon com consequente diminuição no pH fecal, criando assim, condições favoráveis para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, que inibem coliformes, bacteróides, *Salmonella* e *Shigella* (AÏT-AISSA; AÏDER, 2014a).

#### *2.2.2.4. Lactulose e endotoxinas*

Aterações na microbiota intestinal estão associadas à saúde intestinal (PAUL,; VERMA; VERMA 2007), redução das infecções urinárias e respiratórias (LIAO *et al.*, 1994) e redução na produção e absorção de endotoxinas no intestino, que é um aspecto chave na resposta inflamatória intestinal (PANESAR; KUMARI, 2011). A lactulose tem propriedades de anti-endotoxinas. O papel da lactulose também tem sido investigado em doentes com icterícia obstrutiva submetidos a cirurgia. Os estudos mostraram que o tratamento com lactulose antes de cirurgias pode prevenir complicações dependentes de endotoxina, tais como disfunção renal (KOUTELIDAKIS *et al.*, 2003). O efeito anti-endotoxina da lactulose também é aplicável no tratamento de distúrbios metabólicos, como a síndrome hepatorrenal (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICH, 2010), disfunção pancreática exócrina (MACK *et al.*, 1992), diabetes mellitus (TABATABAIE *et al.*, 1997) e hipercolesterolemia (LIAO; FLORIN, 1995).

#### *2.2.2.5. Redução dos níveis de amônia no sangue*

A lactulose reduz a produção bacteriana de amônia nos intestinos e atrai amônia do sangue para o cólon, drenando-a como resíduo. A degradação de lactulose em ácidos graxos de cadeia curta produzidos no cólon por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* reduz o pH intestinal, reduzindo a produção do amoníaco, deslocando o equilíbrio para a formação do íon de amônio, enquanto a proliferação das cepas probióticas inibe o crescimento de bactérias produtoras de amoníaco (WRIGHT; CHATTREE; JALAN, 2011). Como a amônia é tóxica no nível do cérebro, a lactulose é eficaz no tratamento da encefalopatia hepática (BRUZZESE *et al.*, 2006; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008).

#### *2.2.2.6. Carcinogênese do cólon e prevenção tumoral*

O câncer do cólon se desenvolve a partir do revestimento do intestino grosso, como resultado de alterações bioquímicas no lúmen, mucosa e tecidos adjacentes do intestino grosso. No contexto do carcinoma do cólon, tem-se observado baixas concentrações fecais de sais biliares secundários quando a lactulose é administrada a voluntários saudáveis, assim foi relatado que a taxa de recorrência de adenomas de cólon no intestino grosso foi reduzida após a administração de lactulose (VERMA; SHUKLA, 2013).

A microbiota do cólon e os produtos metabólicos gerados podem influenciar o desenvolvimento do câncer de cólon. Já foi mostrado que a ingestão de bactérias probióticas vivas e prebióticos, como a lactulose, reduz o risco de câncer de cólon (MOORE; MOORE, 1995; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; PANESAR; KUMARI, 2011; AÏT-AISSA; AÏDER, 2014b). Diferentes trabalhos sobre a prevenção de tumores têm sido realizados e muitos desses estudos foram orientados sobre os efeitos das bifidobactérias na prevenção do carcinoma, descrevendo inúmeros efeitos antitumorais específicos e inespecíficos e efeitos imunológicos exercidos pelos bifidobactérios (SCHUMANN, 2002).

#### *2.2.2.7. Aumento da absorção mineral*

A lactulose pode aumentar significativamente a absorção de cálcio (se a alimentação contém pelo menos 0,3% de cálcio). Realizando-se experimentos em ratos, tem sido demonstrado que a lactulose promove a absorção e retenção no organismo de vários minerais como cálcio, magnésio, zinco, cobre e ferro. Também foi avaliado o efeito da lactulose sobre a absorção de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em homens adultos e evidenciou-se que a absorção destes elementos aumentou com quantidades crescentes de administração de lactulose, aumentando a força óssea (SEKI *et al.*, 2007).

#### *2.2.2.8. Utilização em alimentos*

A lactulose tem muitas vantagens no desenvolvimento de alimentos funcionais, que promovem benefícios à saúde, pode ser adicionada a diversos tipos de formulações alimentícias, aumentando a sua funcionalidade e estimulando o crescimento e atividade de micro-organismos benéficos ao organismo.

No campo alimentício pode-se dizer que é crescente a utilização desse carboidrato, uma vez que estimula a proliferação de bactérias colônicas, como lactobacilos e bifidobactérias em adultos e lactentes. Devido a este efeito de promoção da saúde, a lactulose é um ingrediente ideal para o desenvolvimento de alimentos funcionais destinados a apoiar ou manter o bem-estar geral.

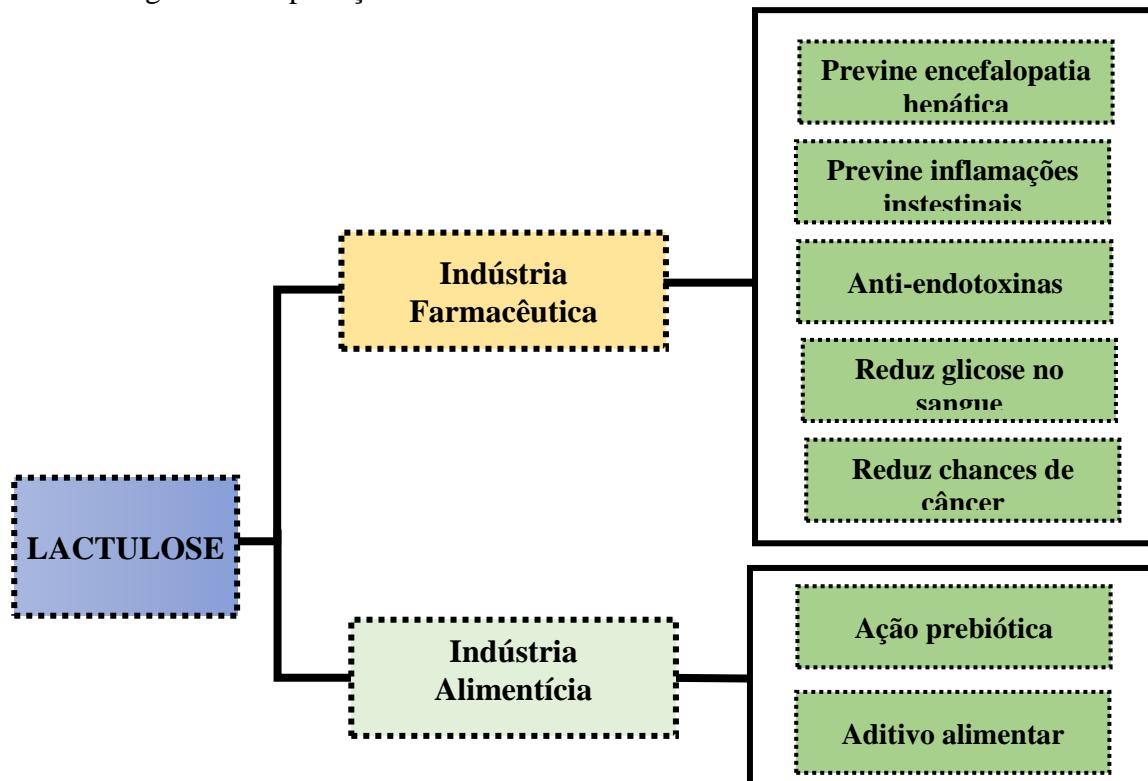
Prebióticos como a lactulose são substratos nutricionais para o desenvolvimento de bactérias benéficas dos gêneros *Lactobacilos* e *Bifidobacterium*, que são favoráveis para a microbiota intestinal (SHORTT; O'BRIEN, 2003). Os substratos são fermentados por essas bactérias, resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta. A partir da redução do pH intestinal mais baixo, ocorre a inibição do

crescimento de micro-organismos potencialmente nocivos (como *Escherichia coli* e *Clostridium*).

Alguns pratos e alimentos destinados a um grupo especial de pessoas com necessidades nutricionais específicas podem conter lactulose. Por exemplo, a incorporação de 0,5 % de lactulose na fórmula para lactentes é considerada adequada para estimular a flora de bifidobactérias, enquanto a presença de lactulose a 1% na fórmula também pode proporcionar um efeito laxativo parcial (OLANO; CORZO, 2009). Estudos de armazenamento para avaliar a estabilidade da fórmula alimentar para lactentes mostraram que a adição de lactulose não influenciou na aceitabilidade do produto e não alterou nenhuma característica de armazenamento do produto, o que foi aceitável até 16 semanas de armazenamento a 38 °C (KOKKE *et al.*, 2008). A adição de lactulose a iogurtes pode levar a redução do período de incubação com aumentos na quantidade de células de bifidobactérias (ÖZER; AKIN; ÖZER, 2005).

Devido ao seu poder prebiótico, a lactulose melhora o balanço natural da microbiota intestinal e, assim, exerce um efeito benéfico no sistema imunológico, atuando com brandura e eficiência no intestino, sendo possível o uso em todos os grupos de idade, podendo ser utilizado em longos períodos de tratamento. A Figura 2.4 resume as diversas aplicações da lactulose.

Figura 2.4. Aplicações de lactulose nos setores alimentício e farmacêutico



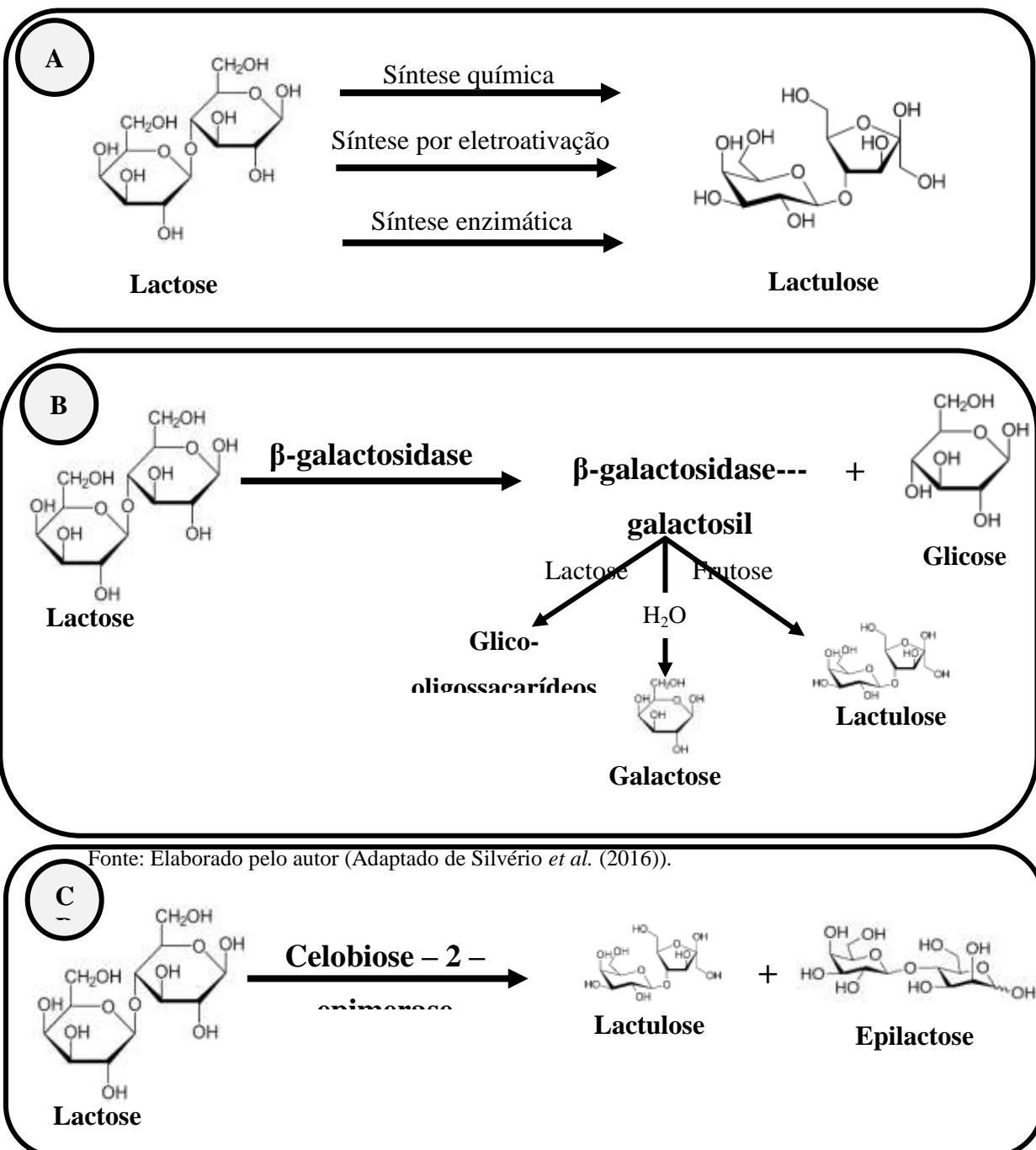
Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Guerrero *et al.* (2015)

### 2.3. Produção de lactulose

A lactulose não é encontrada naturalmente em leite cru, contudo pode ser obtida em pequenas quantidades em leites que passaram por processos de tratamento térmicos, como em leites pasteurizados, originando-se a partir da isomerização da lactose. Essa síntese ocorre durante o aquecimento do leite e sua quantidade dependerá tanto da temperatura como do tempo de aquecimento no tratamento (CLAEYS; LUDIKHUYZE; HENDRICKX, 2001), funcionando, assim, como um indicador e caracterizador do tratamento térmico conduzido (MARCONI *et al.*, 2004). Inicialmente, a *International Dairy Federation* (IDF) e a União Europeia definiram a lactulose como um indicador químico da qualidade do leite, identificando o tratamento térmico ao qual o leite foi submetido. De fato, de acordo com o teor de lactulose no leite tratado termicamente, o tratamento térmico utilizado pode ser estabelecido, seja *Ultra High Temperature* (UHT) direta ou indireta, esterilização ou pasteurização (MARCONI *et al.*, 2004).

A lactulose pode ser sintetizada utilizando métodos químicos ou enzimáticos (SILVÉRIO *et al.*, 2016), sendo a produção comercial geralmente realizada por isomerização alcalina da lactose (AIDER; HALLEUX, 2007), por via das chamadas reações de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (ANGYAL, 2001). A produção comercial de lactulose se iniciou em 1953 e, considerando-se o volume de produção, pode ser considerada o derivado mais importante da lactose (HAJEK *et al.*, 2013). A Figura 2.5 apresenta um esquema que resume as principais vias de produção de lactulose.

Figura 2.5. Representação esquemática das diferentes metodologias empregadas para produzir lactulose a partir da lactose: (A) processos gerais; (B) por síntese enzimática usando  $\beta$ -galactosidase e (C) por celobiose-2-epimerase.



Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Silvério *et al.* (2016)).

A catálise química (Figura 2.5-A-C), que utiliza substâncias tais como ácido bórico e carbonato de cálcio, possui alta eficiência devido ao aumento da taxa de isomerização da lactose que proporciona (PANESAR; KUMARI, 2011). Sob condições básicas, a aldose (glucose) epimeriza a cetose (fructose), e quando a cetose reage com a

galactose forma-se a lactulose (MONTGOMERY; HUDSON, 1930). A velocidade dessa reação é influenciada pelo tempo, temperatura e concentração do catalisador (PASEEPHOL; SMALL; SHERKAT, 2008). No entanto, o uso de álcali forte e ácido bórico pode levar à formação de subprodutos e uma cor acastanhada, o que acrescenta enorme complexidade aos passos de separação e purificação do produto, bem como o aumento do custo de produção e consumo de energia (WU *et al.*, 2017). Esses problemas limitam o desenvolvimento da síntese química para a produção de lactulose, assim, a bioconversão, utilizando diversas enzimas, como será abordado a frente, para produzir lactulose é uma estratégia desejável. Além dessas técnicas existentes, alguns estudos também têm avaliado a isomerização da lactose por eletro ativação, que é uma operação que requer uma corrente elétrica, cuja intensidade da corrente deve garantir o aumento do rendimento de lactulose, uma baixa produção de subproduto e um baixo custo (AISSA; AÏDER, 2013).

### **2.3.1. Síntese Química**

O primeiro trabalho que discutiu a produção de lactulose foi publicado em 1930 (MONTGOMERY; HUDSON, 1930), quando se observou a síntese desse novo dissacarídeo obtido a partir da isomerização da lactose. A reação se deu pelo aquecimento da mistura de lactose e hidróxido de cálcio a 35 °C por várias horas, tendo sido, desde então, objeto de diversas investigações científicas.

A síntese química da lactulose pode ser performada por duas rotas. A primeira delas pela reação de Lobry de Bruyn–van Ekenstein, que está baseada na formação de um intermediário enólico (lactose e epilactose) em um meio alcalino onde a glicose residual da lactose é isomerizada a frutose produzindo lactulose (HAJEK *et al.*, 2013). A segunda rota está baseada num rearranjo de Amadori, onde a lactose reage com amônia e aminas e um complexo lactosil-amina é formado, sendo então hidrolisado para produzir lactulose. Em termos práticos, a estratégia de isomerização alcalina é a mais empregada (AIDER; HALLEUX, 2007; WANG *et al.*, 2013), utilizando-se hidróxido de cálcio, aminos terciários, aluminato de sódio, boratos, hidróxido de sódio, óxido de magnésio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio (AÏT-AISSL; AÏDER, 2014a), zeólitas e sepiolites (VILLAMIEL *et al.*, 2002) como catalisadores.

Paseephol, Small e Sherkat (2008) avaliaram a produção de lactulose a partir de permeado concentrado de leite, um subproduto de baixo custo da indústria láctea, utilizando um catalisador a base de carbonato de cálcio. Esses autores

demonstraram a eficácia do pó de casca de ostra e do calcário para a isomerização da lactose como substituto do pó de casca de ovo, sendo possível obter um rendimento máximo de 18-21% de lactulose a um custo 50% inferior ao da degradação original da lactose. Seo, Park e Han (2015) estudaram a produção de lactulose a partir de soro de leite. Investigaram a influência de três fatores, como temperatura, tempo de reação e concentração de carbonato de sódio por meio da Medologia de Superfície de resposta e obtiveram uma concentração máxima de 29,6 g/L de lactulose nas condições de 90 °C, 0,51% de carbonato de sódio e tempo total de 20,41 min.

Contudo, a maioria desses processos ocasionam a geração de um alto nível de produtos indesejados, que são dificilmente removidos do xarope de lactulose obtido. Para a produção industrial, a formação desses produtos deve ser evitada. Além disso, a presença de monossacarídeos e lactose é especialmente indesejável para processos de separação. Ainda assim, para comercialização, a lactulose é produzida pela isomerização alcalina da lactose, sendo o gerenciamento do resíduo e purificação do produto altamente dispendiosos (GUERRERO *et al.*, 2015; ZOKAEE *et al.*, 2002).

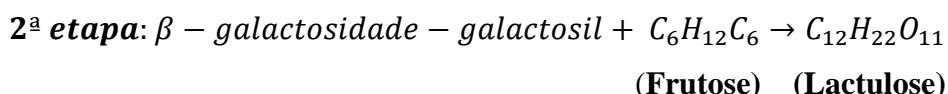
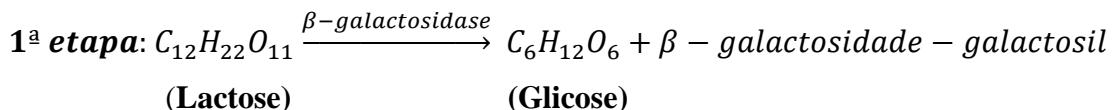
### **2.3.2. Síntese enzimática**

Lactulose também pode ser preparada por meio de rotas enzimáticas. Essa alternativa tem recebido particular atenção nas últimas décadas porque pode ser uma estratégia efetiva para transpor as desvantagens associadas com a síntese química, uma vez que não requer substratos puros, podendo ser utilizadas matérias-primas como soro de leite como fonte de lactose (SILVÉRIO *et al.*, 2016; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICH, 2010). Quando enzimas são usadas como catalisadores, as reações são conduzidas em condições brandas, o que minimiza a degradação do produto e o gasto energético, tornando o processo menos oneroso. Além disso, enzimas são biodegradáveis, apresentam alta especificidade e seletividade, e, em geral, são bem aceitas na indústria farmacêutica e de alimentos (MAYER; KRANZ; FISCHER, 2010). Ademais, um processo enzimático pode promover uma produção limpa de lactulose e, consequentemente, simplificar o processo de purificação (KIM; OH 2012).

A primeira síntese enzimática de lactulose foi descrita em 1978 em um trabalho publicado por Vaheri e Kaupinnen. Eles observaram a síntese de 8,6 g/L de lactulose utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase na presença de lactose e frutose (em pH 7,2 e 37 °C). Essa enzima é conhecida por catalisar a hidrólise de lactose, produzindo

glicose e galactose. Assim o galactosil da lactose pode ser transferido para uma hidroxila contendo um aceptor (frutose) levando a síntese de lactulose ( $\beta$ -d-galactosil-(1-4)-  $\beta$ -D-frutose) (conforme a Equação da reação que está apresentada a seguir) ou outros possíveis isômeros (ponte  $\beta$ -1,1 ou  $\beta$ -1,6), dependendo da seletividade da enzima e condições de reação utilizadas.

**Equação 1:**



A partir de 1978, com a publicação do primeiro trabalho acerca da produção enzimática de lactulose, muitos pesquisadores têm investigado esse processo de produção, tanto com o uso de enzimas livres como imobilizadas. Diferentes metodologias têm sido avaliadas para se alcançar as melhores condições da síntese de lactulose. Além disso, muitas fontes microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, têm sido usadas para produzir enzimas utilizáveis na biossíntese de lactulose. Na Tabela 2.3 apresenta-se um apanhado geral de estudos publicados na literatura a respeito da produção via enzimática de lactulose, bem como as principais condições adotadas. Em geral, três enzimas podem estar envolvidas na síntese de lactulose ( $\beta$ - glicosidase,  $\beta$ -galactosidase e celobiose-2-epimerase), além disso, diferentes  $\alpha$ - galactosidases têm sido estudadas.

Tabela 2.3. Produção enzimática de lactulose: condições utilizadas e produção máxima alcançada

| Enzima                 | Micro-organismo  | Condições reacionais |                  |   | Tipo de meio reacional<br>(Fonte do substrato) | Produção máxima de lactulose | Produtividade (g/L.h) | Referências                  |
|------------------------|--|----------------------|------------------|---|--|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|                        |  | pH                   | Temperatura (°C) | Concentração inicial de substrato       |  |                              |                       |                              |
| Cellobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (via modificação genética) | 7,0                  | 80               | 200 g/L de lactose                      | Soro de leite                                  | 117 g/L                      | 11,7                  | Wu <i>et al.</i> (2017)      |
| β-galactosidase        | <i>Aspergillus lacticoffeatus</i>                                      | 5,0                  | 37               | 300 g/L de lactose e 300 g/L de frutose | Sintético                                      | 2,5 g/L                      | 0,1                   | Cardoso <i>et al.</i> (2017) |
| Cellobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor obsidiansis</i> (via modificação genética)     | 7,5                  | 75               | 200 g/L de lactose                      | Sintético                                      | 10 g/L                       | 62,5                  | Chen <i>et al.</i> (2016)    |
| β-galactosidase        | <i>Lactobacillus plantarum</i> (via modificação genética)              | 7,0                  | 50               | 400 g/L de lactose e 200 g/L de frutose | Sintético                                      | 18,38 g/L                    | 3,06                  | Liao <i>et al.</i> (2016)    |

Tabela 2.3 (Continuação): Produção enzimática de lactulose: condições utilizadas e produção máxima alcançada

|                       |  |     |    |   |               |            |       |                                   |
|-----------------------|--|-----|----|---|---------------|------------|-------|-----------------------------------|
| Celobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (via modificação genética) | 7,5 | 80 | 500 g/L de lactose                      | Sintético     | 57,0 g/L   | 14,3  | Shen <i>et al.</i> (2016)         |
| Celobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (via modificação genética) | 7,5 | 80 | 600 g/L de lactose                      | Sintético     | 350 g/L    | 58,3  | Wang <i>et al.</i> (2016)         |
| β-galactosidase       | <i>Kluyveromyces lactis</i>  | 6,8 | 40 | 167 g/L de lactose e 333 g/L de frutose | Sintético     | 14,5 g/L   | 0,45  | Sitanggang, Drews, Kraumea (2015) |
| β-galactosidase       | <i>Kluyveromyces lactis e marxianus</i>                                | 6,5 | 50 | 250 g/L de lactose                      | Soro de leite | 332 g/Kg   | 12,9  | Padilla <i>et al.</i> (2015)      |
| Celobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (via modificação genética) | 7,5 | 80 | 600 g/L de lactose                      | Sintético     | 390,59 g/L | 195,3 | Wang <i>et al.</i> (2015)         |
| Celobiose-2-epimerase | <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (via modificação genética) | 7,5 | 80 | 700 g/L de lactose                      | Sintético     | 408,0 g/L  | 204   | Kim e Oh (2012)                   |

Tabela 2.3 (Continuação): Produção enzimática de lactulose: condições utilizadas e produção máxima alcançada

|                        |   |     |    |   |               |          |       |                                       |
|------------------------|---|-----|----|---|---------------|----------|-------|---------------------------------------|
| $\beta$ -galactosidase | <i>Arthrobacter</i> sp.                                   | 6,0 | 20 | 400 g/L de lactose e 200 g/L de frutose | Sintético     | -        | -     | Tang <i>et al.</i> (2011)             |
| $\beta$ -galactosidase | <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>e fragilis</i>             | 6,5 | 40 | 200 g/L de lactose e 150 g/L de frutose | Soro de leite | 332 g/L  | 360,9 | Adamczak, Charubin e Bednarski (2009) |
| $\beta$ -galactosidase | <i>Sulfolobus solfataricus</i> (via modificação genética) | 6,0 | 80 | 400 g/L de lactose e 200 g/L de frutose | Sintético     | 50,0 g/L | 8,3   | Kim, Park e Oh (2006)                 |
| $\beta$ -galactosidase | <i>Kluyveromyces lactis</i>                               | 7,0 | 60 | 400 g/L de lactose e 200 g/L de frutose | Sintético     | 20 g/L   | 6,8   | Lee, Kim e Oh (2004)                  |

Atualmente também existem muitas misturas de enzimas comerciais de  $\alpha$ -galactosidase que têm sido estudadas para a produção em escala industrial de lactulose. Entre essas misturas está Maxilacr da DSM e Lactoenzima da Novozymes, provavelmente as mais comuns. Essas misturas enzimáticas são obtidas a partir de diferentes fontes microbianas e têm sido usadas tanto na forma livre como na imobilizada (SILVÉRIO *et al.*, 2016).

A produção de lactulose catalisada por beta-galactosidases requer frutose como substrato e exibe uma baixa conversão. Assim, para um processo em batelada, uma proporção menor de lactose/frutose é geralmente favorável para obter uma maior concentração de lactulose, uma vez que as probabilidades de frutose para atuar como acceptor de galactosil são maiores em comparação com a água (SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2015). No entanto, em processos contínuos, esse fato só é considerado durante as fases iniciais da reação. Para reações com maiores intervalos de tempo, é muito mais provável que a frutose atue como um inibidor na atividade da  $\beta$ -galactosidase (prejudicando, assim, a transgalactosilação) do que como acceptor de galactosil. Em estudos realizados por Guerrero *et al.* (2011), a concentração máxima de lactulose obtida foi na proporção de lactose/frutose de 1/2, atingindo  $15,25 \pm 0,52$  g/L de lactulose. Com uma proporção maior de lactose/frutose, 1/1, obteve-se a menor seletividade, bem como reduziu-se a concentração de lactulose. Além disso, de acordo com a variação da razão lactose/frutose, deve notar-se que a síntese de galactooligossacarídeos (GOS) pode ser aumentada em detrimento da síntese de lactulose: quando a razão lactose/frutose foi igual ou superior a 1/1, a síntese de GOS foi favorecida em vez de lactulose.

#### **2.4. Purificação da lactulose**

As operações de purificação podem representar até 90% dos custos operacionais e a crescente pressão para o desenvolvimento de processos ambientalmente sustentáveis e regulamentos mais rigorosos sobre gerenciamento de resíduos têm sido força motriz para o desenvolvimento de várias estratégias para a purificação efetiva de carboidratos prebióticos (FENG *et al.*, HERNÁNDEZ *et al.*, PINELO; JONSSON; MEYER, 2009; GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, 2013). Isso certamente se aplica à produção de lactulose. A purificação de lactulose, industrialmente, é feita por cromatografia líquida de troca iônica ou de adsorção (FENG *et al.*, 2009). As resinas de troca iônica e de carvão ativado são as matrizes cromatográficas mais utilizadas, com

uma maior afinidade por di- e oligossacarídeos do que pelos monossacarídeos, permitindo a remoção do catalisador químico (CAROBBI; INNOCENTI; RIPOLI, 1990).

Os xaropes comerciais obtidos possuem, em geral, pureza de 50-70% (BIMBI, 1996), sendo seus principais “contaminantes”: a própria lactose excedente da reação, galactose, glicose, epilactose, ácido fórmico e outros carboidratos (PANESAR; KUMARI, 2012). A obtenção de lactulose na sua forma pura, ou seja, com pureza superior a 95%, normalmente, é feita por meio da cristalização direta da lactulose, como Bimbi (1996) demonstrou ao avaliar xaropes comerciais. Porém esse método é lento e necessita de quantidades significativas de lactulose em sua solução, do contrário, outro método de separação deve ser aplicado antes da cristalização, visando eliminar a presença dos carboidratos restantes da reação que, na maioria das vezes, será incompleta na presença desses (AÏT-AISSA; AÏDER, 2014a).

A purificação da lactulose em escala industrial é então uma tarefa complexa que pode envolver várias etapas. Um processo foi descrito considerando um primeiro passo de remoção de catalisador químico usado (hidróxido de alumínio) por centrifugação, o qual é então misturado com hidróxido de sódio e calcinado a 750 °C para recuperar o catalisador na sua forma ativa (aluminato de sódio). O sobrenadante contendo lactulose e lactose não reagida além de alguns outros componentes menores é submetido a várias etapas de ultrafiltração e nanofiltração, remoção de íons com resinas de troca iônica e, em seguida, concentração; a lactose não reagida é então removida por cristalização, obtendo-se uma lactulose altamente purificada com pequenas quantidades de contaminantes (lactose residual, epilactose e galactose) (CAROBBI; INNOCENTI; RIPOLI, 1990; PANESAR; KUMARI, 2011).

Por ser um produto obtido a partir da isomerização da lactose, o processo químico de produção da lactulose costuma, também, gerar outros produtos indesejáveis (AÏT-AISSA; AÏDER, 2014a), como a própria lactose excedente da reação, galactose, glicose, epilactose, ácido fórmico e outros carboidratos (PANESAR; KUMARI, 2012). O crescente número de pesquisas envolvendo a produção de lactulose vem gerando uma maior busca por processos de purificação que tornem essa substância apta a usos diversos: adoçante substituto do açúcar comum, tratamento de constipações e complicações no fígado, anti-inflamatório para o intestino, dentre outros (PANESAR; KUMARI, 2011).

Já na síntese enzimática por transgalactosilação de lactose, os contaminantes a serem removidos são glicose, galactose, frutose e lactose residual. A remoção da frutose não reagida é especialmente importante, uma vez que a frutose altera a doçura e o valor calórico do produto e induz as reações de Maillard (PANESAR; KUMARI, 2011; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICH, 2010).

Os métodos de separação mais estudados são: adsorção seletiva por zeólitas (CHAO *et al.*, 1983), adsorção por uso de resinas catiônicas (DENDENE *et al.*, 1995) e a extração com soluções precipitadas de água-etanol (RUIZ-MATUTE *et al.*, 2007). Cada um desses métodos será apresentado resumidamente e separadamente nesta seção.

Na maioria dos casos, o processo de purificação é feito em pH baixo para evitar a degradação da lactulose, separando-se os principais catalisadores e a lactose, devendo ser separada, cristalizada e reciclada no processo (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICH, 2010). Para remover íons alcalinizantes, que podem causar reações degenerativas, estudos na literatura (Hicks e Parrish, 1980) mostraram que o ácido bórico é o mais indicado (utilizando a trietilamina como catalisador, que deverá ser removido com o uso da resina IR-120 ( $H^+$ )) devendo ser removido por ciclos repetitivos de evaporação a baixa pressão com adição de metanol absoluto. Chao *et al.* (1983) conseguiram a separação de lactulose e lactose por meio da adsorção seletiva por formas catiônicas (especificamente bário ou potássio) de zeólita modificada Y. A lactulose adsorvida foi recuperada por meio do eluente, preferencialmente a água. Ainda assim é considerado normal para o processo que uma parte da lactose também seja adsorvida pelas zeólitas, comprometendo a pureza do produto final.

Dendene *et al.* (1995), utilizaram a resina de troca catiônica Dowex AG50W-X8 para separar três carboidratos presentes no xarope de lactulose industrial: 79% de lactulose, 9% de galactose e 12% de lactose. Essa resina demonstrou, dentre as três que foram testadas, melhor poder de adsorção seletiva em condições específicas para cada separação, seja Lactulose/Lactose ou Lactulose/Galactose. Ruiz-Matute *et al.* (2007) separaram lactulose de lactose por meio da cristalização na presença de etanol, por meio de uma Extração por Líquido Pressurizado (ELP) a 1500 psi por 30 minutos, atingindo pureza superior a 90%, sendo, provavelmente, esse o método mais eficaz de purificação por ser mais rápido e consumir pouco solvente.

#### **2.4.1. Separação de lactulose/lactose por adsorção seletiva em peneiras moleculares zeolíticas.**

Zeólitas são materiais cristalinos de estrutura aberta, constituídos por tetraedros ligados por átomos de oxigênio ( $\text{SiO}_4$  e  $\text{AlO}_4$ ), porém tendo sua abrangência de definição expandida nos últimos anos para qualquer material com essas características ( $\text{GaO}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , etc.) (LUNA, 2001).

Foi com base nos estudos sobre zeólitas que Chao e Sherman (1983) patentearam o processo de separação da lactulose com o uso da zeólita Y substituída com bário (BaY), visto que a zeólita X não adsorve nem lactulose nem lactose significante e Zeólita Y, substituída com Cálcio, não separa significativamente nem a lactulose nem lactose, obtendo um produto de baixa pureza. Seus experimentos com adsorção seletiva foram realizados nas seguintes condições: uma coluna de 1,6 m de comprimento com diâmetro interno de 0,77 cm foi preenchida com zeólita Y convencional (30x50 mesh) que foi trocada com bicarbonato e ligada com 20% de aglutinante, utilizando-se o fluxo de 21,59 lpm/m<sup>2</sup> (litros por minuto por metro quadrado) da solução de lactulose/lactose.

Após a realização dos testes, Chao e Sherman (1983) perceberam a ineficiência do BaY em separar a lactulose a esse fluxo, necessitando de um fluxo mais lento para uma separação que, ainda assim, demonstrou-se ineficiente, retendo 1,7 mL e 3,1 mL de açúcares, lactose e lactulose, respectivamente, durante os testes. Contudo, após um segundo teste, onde testou-se Zeólita BaSY, ou seja, zeólita modificada com vapor de bário Y, nas mesmas condições de granulometria, pressão e temperatura, notou-se uma boa eficiência na separação da lactulose, tendo retido 3,5 mL e 5,8 mL de lactose e lactulose, respectivamente. O mesmo tipo de resultado foi observado em zeólitas a base de potássio, tendo a zeólita convencional substituída com potássio Y (KY), retido apenas 2 mL de açúcares em ambos os testes com lactose e lactulose realizados e a zeólita modificada com vapor de potássio Y (KSY) retido 2,3 mL de lactose e 3,5 mL de lactulose nos testes realizados. Mostrando que zeólitas modificadas com vapor de bário Y são a melhor opção para esta reação de adsorção seletiva, porém mesmo assim, ao final do processo, ao recuperar-se os açúcares, notou-se que estes ainda possuíam traços de lactose que precisariam ser eliminados.

#### **2.4.2. Separação de lactulose, lactose e galactose por meio de colunas de resinas catiônicas de troca iônica.**

Dendene *et al.* (1995) realizaram um estudo de separação de lactulose, lactose e galactose por meio de colunas com resinas de troca-iônica. Durante o estudo,

testaram três resinas conhecidas pelo seu uso na separação de açúcares, todas na forma catiônica ( $\text{Na}^+$ ), para descobrir qual seria a que mais se encaixaria no processo de separação da lactulose. Após os testes preliminares, a 55 °C, a resina Duolite C 204/2078 ainda demonstrava concentrações consideráveis dos três açúcares, tendo adsorvido lactose junto com a lactulose nos primeiros minutos da leitura e galactose nos minutos finais. A segunda e a terceira resina, Duolite C 211/2554 e Dowex AG50W-X8, respectivamente, obtiveram resultados similares, sem sinais de adsorção de lactose, apenas com uma pequena concentração de galactose sendo adsorvida em paralelo a lactulose. Contudo, a terceira resina foi escolhida para o restante do processo por possuir menor coeficiente de distribuição e menor granulometria (100  $\mu\text{m}$ ).

Após a seleção da melhor resina, novos testes foram realizados com a resina em suas formas:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , e em temperaturas distintas (15 °C, 35 °C e 55 °C). Os resultados mostraram que a galactose é melhor separada da lactulose a altas temperaturas (55 °C) com resinas na forma  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  existindo pouca diferença entre os coeficientes de pulso cromatográfico de cada uma, dados estes recolhidos através de gráficos que levavam em conta o tempo da adsorção em relação ao tamanho da coluna por sua velocidade, já que seus coeficientes a essa temperatura foram de 0,176 para a lactulose e 0,352 para a galactose na resina em sua forma  $\text{K}^+$  e 0,187 para a lactulose e 0,329 para a galactose para a resina em sua forma  $\text{Na}^+$ , indicando que apesar da resina em sua forma  $\text{K}^+$  ter apresentado melhores resultados que a na forma  $\text{Na}^+$ , os valores estão próximos o suficiente para afirmar que ambas possuem qualidades similares neste processo. A lactose é melhor separada da lactulose em temperaturas baixas (15 °C) com a resina na forma de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo seus coeficientes de pulso cromatográfico nessa temperatura 0,172 para a lactose e 0,237 para a lactulose para a resina em sua forma  $\text{Na}^+$  e 0,160 para a lactose e 0,265 para a lactulose para a resina em sua forma  $\text{Ca}^{2+}$ , da mesma forma que no teste anterior, a forma  $\text{Ca}^{2+}$  apresentou resultados melhores, mas a diferença entre ambos é desprezível.

#### **2.4.3. Purificação da lactulose de misturas com lactose usando extração por líquido pressurizado**

Ruiz-Matute *et al.* (2007), buscando a separação da lactulose/lactose, utilizaram o método de Extração por Líquido Pressurizado (ELP), que permite uma rápida extração (aproximadamente em 30 minutos), mantendo os solventes permaneçam na forma líquida mesmo em temperaturas acima do seu ponto de ebulição,

proporcionando, assim, uma alta temperatura de extração, aumentando a solubilidade, cinética de dessorção e a interação analito-solvente. Solventes como o etanol, que possui baixo ponto de ebulação, têm potencial para uso nessa técnica, já que se tornam mais eficientes em altas temperaturas para extração de materiais como antocianinas e polifenóis (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012; HEO *et al.*, 2014).

Diante da qualidade da extração por ELP, Ruiz-Matute *et al.* (2007) usaram uma solução lactulose/lactose (9:1) durante o experimento, no qual a amostra era sempre colocada na célula de extração em excesso e no fundo dela existia um filtro de celulose (Dionex) para evitar o recolhimento de partículas em suspensão no frasco de extração. Após isso, a extração foi realizada com o solvente aquecido e pressurizado. A pressão utilizada foi mantida constante (1500 psi), sendo a temperatura e a concentração do solvente (etanol/água) as variáveis a serem testadas no processo, variando de 40 °C a 130 °C e de 100:0 a 70:30, respectivamente. Após os testes, os autores chegaram a resultados variáveis de pureza, sendo estabelecidos como condições ótimas a temperatura de 40 °C e a concentração etanol/água de 70:30. A pureza da lactulose final foi de 93,59%, demonstrando a alta eficiência deste método em separar lactulose e lactose. Estudos posteriores também demonstraram que caso a concentração de etanol seja inferior a 60%, a pureza do produto final também é comprometida.

#### **2.4.4. Cristalização da lactulose a partir de xaropes comerciais**

O processo de cristalização é também um método que pode ser empregado para purificação de lactulose, pois permite o melhor uso de um produto devido a maior pureza observada em um cristal. A cristalização da lactulose por vezes é útil para purificação de xaropes industriais que possuem baixa pureza (BIMBI, 1996) e é um processo que, normalmente, envolve álcoois (PANESAR; KUMARI, 2011). Bimbi (1996) desenvolveu um novo método, tendo em vista que, mesmo xaropes comerciais de lactulose tem pureza relativamente baixa, entre 50-70%. Cerca de 3-14% de sua composição consiste de galactose, 3-9% consiste de lactose e 4-7% de outros carboidratos. O método desenvolvido primeiro consiste na redução do teor de água do xarope aquoso de lactulose até que sua concentração de açúcares esteja entre 70 e 80 °Brix, a solução resultante deve estar entre 5°C-20°C, adicionando-se lactulose tri-hidratada cristalina, para iniciar a cristalização (a quantidade deve variar de 5% a 30% da quantidade de lactulose presente na solução), o tempo total de processo é de 20 a 120 h. Os cristais produzidos tem teor de água inferior a 0,5%, pureza mínima de 98,5% e o

rendimento com relação a lactulose inicialmente presente na solução gira em torno dos 40%.

#### **2.4.5. Outras considerações sobre purificação da lactulose**

Outra estratégia para a purificação de lactulose é o fracionamento por membranas de ultrafiltração e nanofiltração. Ambas as membranas inorgânicas (cerâmicas) e orgânicas (celulose, polissulfona, poliamida) estão disponíveis, sendo esta última a mais utilizada em escala industrial (VANNESTE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Por meio desse método, existe um alto potencial para a purificação e foram observados avanços significativos nos experimentos conduzidos nas últimas décadas (LI *et al.*, 2008; PINELO; JONSSON; MEYER, FENG *et al.*, 2009). No entanto, o fracionamento da membrana de misturas de carboidratos ainda não é uma tecnologia madura e mesmo que o catalisador possa ser efetivamente removido, a lactose não pode ser separada da lactulose por esta estratégia (PINELO; JONSSON; MEYER, FENG *et al.*, 2009; NATH *et al.*, 2013).

Outras estratégias que foram aplicadas para a purificação de glico-oligossacarídeos (GOS) são, em princípio, aplicáveis à purificação de lactulose sintetizada enzimaticamente. Entre elas, a oxidação enzimática tem sido utilizada para a remoção de glicose e lactose por conversão em ácido glucônico e ácido lactobiônico com glicose oxidase e celobiose desidrogenase, respectivamente, sendo esses ácidos retirados do meio por métodos como adsorção. Mesmo que a remoção dos ácidos por cromatografia de troca iônica seja viável, o custo das oxidases e a complexidade do sistema tornam o processo não-realista ao nível da produção (SPLECHTNÁ *et al.*, 2001).

A fermentação seletiva de monossacarídeos com *Saccharomyces cerevisiae* e mono e disacarídeos com *K. lactis* também é uma estratégia viável para a purificação de lactulose que pode ser utilizada para a purificação; removendo eficientemente açúcares contaminantes a um baixo custo (RABIU *et al.*, 2001; YOON; MUKERJEA; ROBYT, 2003; CHENG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009 DUARTE *et al.*, 2010). A fermentação seletiva foi utilizada com sucesso na purificação de GOS com *S. cerevisiae* e *K. lactis* obtendo um produto com elevada pureza (GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, 2014). Uma variação dessa estratégia foi implementada por Rada *et al.* (2008) utilizando estirpes de *Lactobacillus* para a remoção de carboidratos não-prebióticos. A fermentação seletiva é interessante para a

purificação de lactulose, uma vez que permite a remoção completa de monossacarídeos sem consumo dos produtos de síntese (lactulose e GOS). No caso da purificação de lactulose, somente *S. cerevisiae* pode ser usado porque *K. lactis* também consome lactose e lactulose.

A maioria das técnicas descritas não são suficientemente eficientes para a purificação de lactulose, uma vez que a separação da lactose é um grande problema devido à similaridade da estrutura e propriedades físico-químicas de ambos. Mesmo assim, a separação de monossacarídeos é importante para a produção de produtos com baixo teor calórico e baixa doçura, susceptíveis de serem consumidos por pessoas com diabetes e sobrepeso (LI *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

## **2.5. Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase**

As enzimas são consideradas poderosos biocatalisadores e aumentam as taxas reacionais de vários processos biológicos e químicos. Recentemente, há um alto requisito para os potenciais biocatalisantes e são considerados alternativas ecológicas de alto valor para síntese química. A maior parte dos processos que envolvem a síntese química usam solventes orgânicos ambientalmente nocivos e requerem alta energia para os processos (MACKENZIE *et al.*, 2015). Como as enzimas microbianas não possuem nenhuma natureza ambientalmente perigosa podem fornecer soluções "mais limpas" para a síntese de produtos de interesse (MADHAVAN *et al.*, 2017).

Muitas enzimas que catalisam reações de interesse já foram descobertas, no entanto, a quantidade de enzimas conhecidas representa apenas uma pequena fração da diversidade natural disponível na natureza. Mais de 99% da diversidade microbiana também não é possível cultivar em condições laboratoriais (WANG *et al.*, 2016). Um grande número de enzimas tem sido comercialmente utilizado em várias indústrias, como couro, têxteis, alimentos, papel, produtos farmacêuticos e detergentes. Dentre os biocatalisadores industriais mais importantes estão lipases (biocombustível e indústria farmacêutica) (SANTOS *et al.*, 2015), tripsina (indústria do couro) (BHAVSAR *et al.*, 2013), xilanase (indústria de papel e celulose) (KHATRI *et al.*, 2016), lipoxigenase (indústria alimentar) (PLAGEMANN *et al.*, 2013), fitase (indústria alimentar) (REBELLO *et al.*, 2017), proteases ativas a frio e  $\alpha$ -amilase (indústria de detergentes) (YANG *et al.*, 2011; RAI *et al.*, 2017), hialuronidase (enzima farmacêutica) e lactases (indústria de alimentos) (ALBUQUERQUE *et al.* 2016).

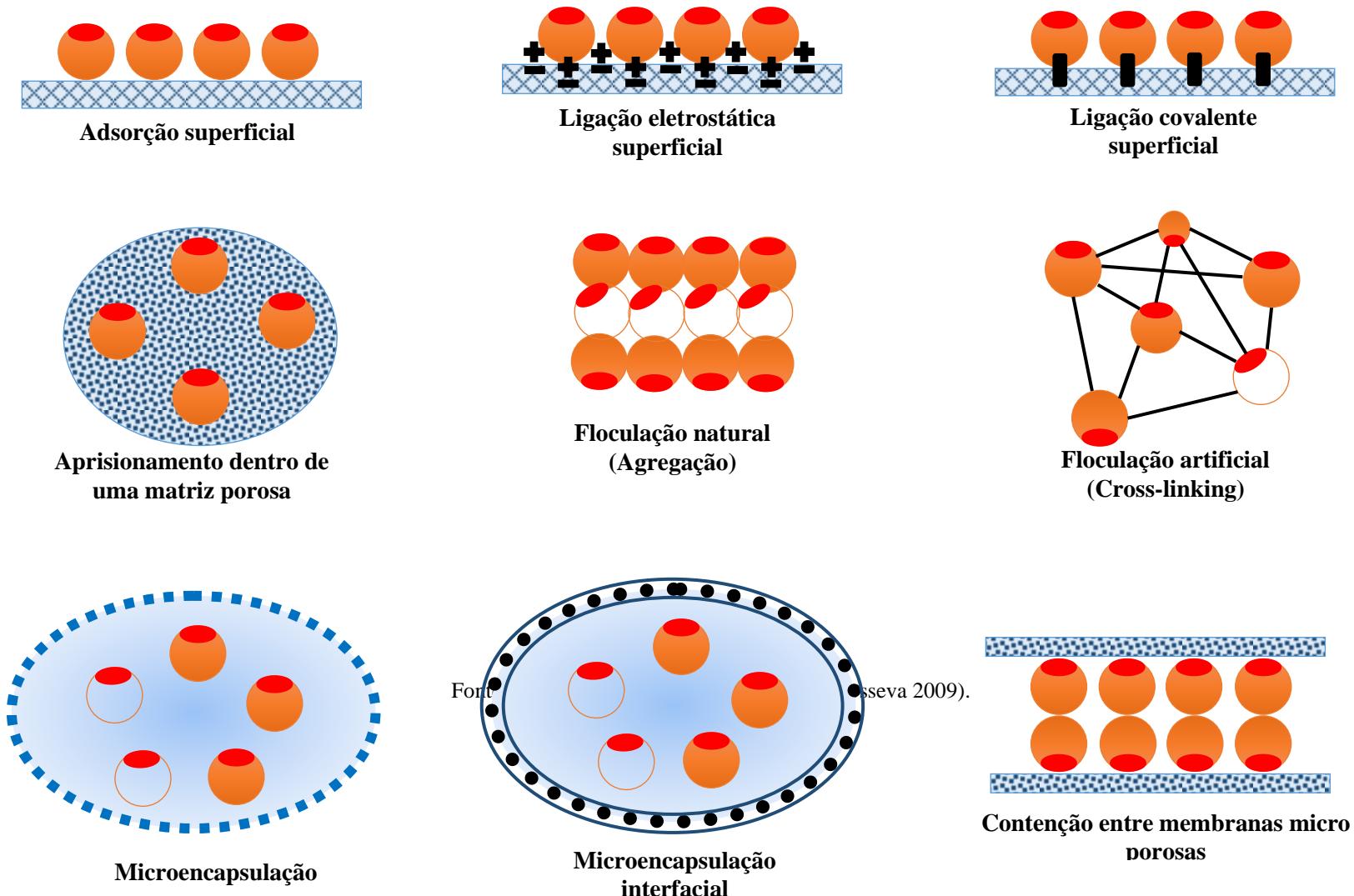
O uso da tecnologia de imobilização enzimática pode melhorar ainda mais a economia dos processos nos quais se busca a utilização de resíduos devido a diferentes vantagens em relação aos sistemas que utilizam micro-organismos ou enzimas livres. As enzimas imobilizadas são definidas como as que são fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região delimitada do espaço com retenção da sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetidamente e continuamente (CHIBATA; TOSA 1977). A imobilização de enzimas é um pré-requisito para muitos dos seus usos como biocatalisadores industriais, pois o principal objetivo da imobilização é facilitar a reutilização enzimática (SHELDON; PELT, 2013). No entanto, muitos pesquisadores concentram a pesquisa em como a imobilização pode melhorar outras propriedades enzimáticas, como estabilidade, atividade ou seletividade (BRADY; JORDAAN, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013; SECUNDO, 2013). Existem muitas estratégias de imobilização por adsorção de proteínas em suportes, sendo um dos protocolos mais utilizados, devido à sua simplicidade e reversibilidade (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

A adsorção, o aprisionamento em gel e a ligação covalente são os métodos mais populares de imobilização utilizados em vários experimentos (Figura 2.6). Na adsorção, os biocatalisadores são mantidos na superfície dos suportes por forças físicas (Forças Van-der-Waals) ou forças eletrostáticas. As vantagens da adsorção são a simplicidade nos procedimentos e a pouca influência na conformação do biocatalisador (MARWAHA; KENNEDY, 1984). No entanto, uma grande desvantagem desta técnica é a debilidade relativa das forças de ligação adsortivas. As principais vantagens da técnica de aprisionamento são a simplicidade pela qual as partículas esféricas podem ser obtidas por gotejamento de uma suspensão enzimática com polímero em um meio contendo contra-íons formadores de precipitação ou por meio de polimerização térmica. A principal limitação desta técnica é o possível vazamento das enzimas durante a operação contínua a longo prazo. No entanto, as melhorias podem ser feitas usando procedimentos de reticulação adequados. As limitações de transferência de massa são uma desvantagem significativa para muitas técnicas de células imobilizadas.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos por acoplamento covalente e coordenação de metais geralmente leva a preparações muito estáveis com vida útil prolongada em comparação com outros métodos de imobilização. Geralmente, envolve duas etapas, primeiramente, ativação do suporte e, em seguida, acoplamento da enzima ao suporte ativado. Existe uma grande variedade de grupos funcionais capazes de serem utilizados no acoplamento covalente, o que torna esse método geralmente aceitável para

imobilização. A imobilização de enzimas a suportes sólidos envolve reações entre os resíduos aminoácidos da proteína e grupos emergentes funcionalizados. Os materiais de lavagem mais frequentemente usados não possuem grupos reativos, mas sim grupos hidroxilo, amino, amida e carboxil, que devem ser ativados para imobilização de proteínas (CABRAL; KENNEDY, 1991).

Figura 2.6. Métodos básicos de imobilização de biocatalisadores.



O uso da enzima solúvel  $\beta$ -galactosidase para hidrolisar a lactose presente no soro de leite converte-a em um xarope com doçura, que pode ser utilizado pela indústria de laticíneos, indústrias de confeitoraria, panificação e refrigerantes. Esses xaropes possuem grande poder adoçante, podendo ser ainda aumentado com a bioconversão da glicose presente no hidrolisado formado para frutose pela enzima glicose isomerase imobilizada. (SIENKIEWICZ; RIEDEL, 1990).

Atualmente, o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) é válido para alguns micro-organismos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, que são os principais produtores dessa enzima utilizada na indústria de alimentos. As  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* são muito semelhantes, com pH ótimo próximo a neutralidade, se mostram adequadas para hidrólise de lactose no leite e são amplamente aceitas como seguras para uso em alimentos.

Embora essa enzima tenha inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos e lácteos, sua estabilidade é uma das limitações que dificultam a implementação geral de biocatalisadores em escala industrial. Assim, há uma necessidade de explorar seu potencial total como catalisador, adotando estratégias adequadas para sua estabilização, como o uso de técnicas de imobilização por adsorção (ALBUQUERQUE *et al.* 2016). A enzima multimérica pode ser estabilizada usando condições experimentais adequadas e ferramentas genéticas para reticular ou fortalecer a interação de subunidade a subunidade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009)

$\beta$ -galactosidases podem ser usadas de várias maneiras para hidrolisar a lactose no leite ou no soro leite e na síntese de oligossacarídeos e, quando são imobilizadas, esse processo pode ser ainda mais efetivo. Essas enzimas têm sido imobilizadas por diversos métodos em matrizes variadas, incluindo aprisionamento, *cross-linking*, adsorção, ligação covalente ou combinação desses métodos (Tabela 2.4).

A primeira aplicação industrial de  $\beta$ -galactosidase imobilizada na indústria de alimentos foi realizada pela SnamProgetti (Itália) e pela Sumitomo Chemicals (Japão) na década de 1970 (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). SnamProgetti usou  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* encapsulada em fibras de triacetato de celulose por fiação com fibras úmidas, que foram cortadas e utilizadas para hidrólise de lactose no leite (MARCONI; MORISI, 1978).

A escolha da tecnologia de processo depende da natureza do substrato, das características da enzima, da economia da produção e da comercialização do produto. A

característica principal que determina a escolha e aplicação de uma dada enzima é a faixa de pH operacional. As enzimas resistentes a pH ácidos, oriundas de fungos, são adequadas para o processamento de soro de leite ácido e soro de soro, enquanto que as enzimas de pH neutro, provenientes de bactérias e leveduras, são adequadas para processamento de leite e soro de leite doce (PANESAR, KUMARI; PANESAR, 2010).

Tabela 2.4. Comparação de alguns sistemas de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase

| Fonte da enzima               | Método de imobilização | Suporte utilizado           | Referências                           |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| <i>Arpergillus oryzae</i>     | Adsorção               | Manae-agarose               | Zaak <i>et al.</i> , 2017             |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>   | Ligaçāo covalente      | Quitosana com glutaraldeído | Lima <i>et al.</i> 2013               |
| <i>Arpergillus oryzae</i>     | Aprisionamento         | Álcool polivinil            | Grosová <i>et al.</i> , 2008          |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>   | Ligaçāo covalente      | Algodão                     | Li, Zhou e Chen, 2007                 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>   | Aprisionamento         | Alginato de cálcio          | Becerra <i>et al.</i> , 2001          |
| <i>Aspergillus oryzae</i>     | Cross-linking          | Quitosana com glutaraldeído | Rejikumar e Devi, 2001.               |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | Ligaçāo covalente      | Sílica-alumínio             | Ladero, Santos, e. García-Ochoa, 2000 |

No presente trabalho, especial atenção foi voltada para a imobilização por adsorção, que é o método mais simples e o mais antigo de imobilizar uma enzima em um veículo insolúvel em água. Muitas vezes, no entanto, forças adicionais estão envolvidas na interação entre suporte e biocatalisador, principalmente interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações heteropolares (iônicas) (HARTMEIER, 1986). As vantagens da adsorção consistem na simplicidade de execução dos procedimentos e na pouca influência na conformação do biocatalisador.

No entanto, a desvantagem desta técnica é a fraqueza relativa das forças de ligação adsortivas.

Em relação à produção de lactulose, alguns artigos são citados na literatura com o uso de  $\beta$ -galactosidase imobilizada, mas ainda há uma lacuna do conhecimento das condições ideais do processo de produção. Ajisaka, Nishida e Fujimoto (1987), por exemplo, tentaram o uso de  $\beta$ -galactosidase, produzida por uma cepa de *E. coli* modificada geneticamente, imobilizada em Eupergit, para produzir lactulose a partir de galactose e frutose. Além da formação de lactulose, também foi gerada 1-lactulose. As concentrações de lactulose formadas nas reações alcançaram 3,3 g/L. Song *et al.* (2013) utilizaram géis de sílica ativados como uma matriz para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* comercial e avaliaram a possibilidade da síntese de lactulose a partir de lactose de soro de leite. Eles observaram que a lactulose poderia ser sintetizada continuamente e foi obtido 19,1 g/L da concentração do produto.

Diante do exposto, aponta-se a importância da imobilização enzimática, especificamente de  $\beta$ -galactosidase, para tornar possível a biossíntese de lactulose a partir de resíduos agroindustriais, como o soro de leite.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados (lactose, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, ácido acético e hidróxido de potássio, glutaraldeído 25%, (v/v) e o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranósideo (ONPG)) foram obtidas da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). A quitosana em pó, com grau de desacetilação de 85,2 %, foi obtida da Polymar Ind. Ltda (Fortaleza, Ceará, Brasil). O soro de leite em pó foi fornecido pela Indústria Alibra Ingredientes Ltda (Campinas-SP).

##### 3.1.2. Enzimas utilizadas

Nos experimentos foram utilizados a enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, Lactozyme® 2600, e a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, obtidas da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Avaliação da imobilização enzimática de $\beta$ -galactosidase

Para uma melhor performance da síntese de lactulose, buscou-se inicialmente estudar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase, nesse caso, avaliou-se a imobilização da enzima oriunda de *Aspergillus oryzae* e de *Kluyveromyces lactis*. Os estudos foram voltados para utilização do suporte Agarose Manae e quitosana. A seguir, estão detalhadas as metodologias utilizadas para imobilização.

##### 3.2.1.1. Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase em Agarose-MANAE

Primeiramente, o suporte Agarose-Manae (suporte glioxil-agarose aminado com etilenodiamina) foi preparado de acordo com metodologia desenvolvida por Fernandez-Lafuente *et al.* (1993). A imobilização foi conduzida empregando-se 10 mg de proteína de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* ou de *Kluyveromyces lactis* por grama de suporte. Essa baixa concentração previne limitações difusionais que poderiam distorcer os resultados. As amostras comerciais da enzima foram dissolvidas a uma

concentração de 5 ou 25 mM de tampão acetado de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 ou carbonato de sódio a pH 9 à temperatura de 25 °C.

### *3.2.1.2. Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em partículas de quitosana*

A  $\beta$ -galactosidase foi imobilizada em gel de quitosana (2%) ativado com glutaraldeído 0,8% (LIMA *et al.*, 2013; BUDRIENE *et al.*, 2005). Utilizou-se uma carga enzimática de 10 mg de proteína por grama de suporte. A imobilização foi realizada a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo 0,1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 0,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, sob agitação suave em agitador rotatório.

### *3.2.1.3. Estabilidade térmica dos derivados enzimáticos*

Os derivados obtidos foram incubados em diferentes pH (utilizando-se tampão acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio para pH 7 ou carbonato de sódio para pH 9) e diferentes forças iônicas (5 mM, 25 mM ou 50 mM). Periodicamente, amostras foram coletadas e a atividade enzimática foi mensurada usando ONPG, como demonstrado no tópico anterior.

### *3.2.1.4. Determinação da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG*

A atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase usando ONPG foi determinada a 37 °C e pH 6,6 e foi utilizada nos experimentos de imobilização e avaliação da carga enzimática ideal para produção de lactulose. O coeficiente de extinção molar do produto o-nitrofenol (O-NP) foi de 4,53 mol/cm. O produto da reação de hidrólise foi determinado por espectrofotômetro a 420 nm. 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. Para a enzima solúvel ou imobilizada, 2 mL de ONPG 1,25 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O 0,1 mM a pH 6,6, foram colocados em tubos de ensaios. Em seguida, adicionou-se uma amostra de 50  $\mu$ L do extrato enzimático ou 0,1g do derivado contendo  $\beta$ -galactosidase a 37 °C. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pelo aquecimento das amostras a 100 °C por 1 min.

A atividade enzimática foi calculada de acordo a Equação 2:

$$A \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{A \times V_t}{\varepsilon \times L \times V_e \times t} \quad (2)$$

Sendo: A - absorbância lida;  $V_t$  - volume total;  $V_e$ : volume de enzima; t: tempo de reação; L: caminho óptico (1 cm); ε: coeficiente de extinção (4,53 mol/cm).

Após o cálculo de todas as atividades, obteve-se a atividade relativa (Ar), definida como a razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial ( $A_0$ ), conforme Equação 3:

$$\text{Atividade relativa} = \frac{A}{A_0} \quad (3)$$

### **3.2.2. Determinação das condições reacionais para a produção de lactulose utilizando β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* livre**

Primeiramente foi avaliado a produção de lactulose por β-galactosidase de *K. lactis* a partir da solução sintética para otimizar a síntese. Para tal, as seguintes variáveis foram analisadas: razão da concentração de lactose e frutose, temperatura, pH, carga enzimática e a influência de cátions divalentes na reação. O meio reacional (10 mL) foi mantido em Erlemeyer (com volume total de 25 mL) sob agitação e, após alcançada a temperatura requerida para reação, a enzima foi adicionada. Amostras foram retiradas para análise de quantificação de carboidratos (lactose, glicose e lactulose). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **3.2.2.1. Razão entre lactose e frutose e concentração inicial de substratos**

O efeito da razão da concentração de lactose e frutose para a produção de lactulose foi primeiramente avaliado. Para tal, reações foram conduzidas em tubos de ensaio contendo lactose e frutose dissolvidos em tampão fosfato de potássio 50 mM, perfazendo um volume total de 10 mL, a pH 7 e 37 °C e uma carga enzimática de 5 U/mL foi adicionada. Foram utilizadas soluções com concentração total de carboidrato de 45% (m/v) variadas nas seguintes razões de lactose e frutose, respectivamente: (1) 40%:5%, (2) 35%:10%, (3) 30%:15%, (4) 22,5%:22,5%, (5) 15%:30% e (6) 10%:35%. Após determinar a razão lactose/frutose mais adequada, foi avaliado a melhor

concentração inicial desses substratos para a síntese de lactulose, testando-se as seguintes concentrações 10, 25, 50, 100, 200, 300 e 450 g/L

### *3.2.2.2. Efeito da temperatura e pH*

O efeito da temperatura na produção de lactulose foi avaliado após a seleção da melhor concentração de lactose e frutose por meio de reação em tubos a pH 7,0 e usando carga enzimática de 5 U/mL. As seguintes temperaturas foram avaliadas: 37, 45, 50, 55 e 60 °C. O pH ótimo foi avaliado após se determinar a temperatura que mais favoreceu a síntese de lactulose, testando-se os seguintes pH: 4, 5, 6, 7 e 8.

### *3.2.2.3. Efeito da variação da carga enzimática*

As cargas enzimáticas para a produção de lactulose foram testadas na faixa entre entre 1 e 12 U/mL a fim de se avaliar a influência da carga enzimática na síntese de lactulose.

### *3.2.2.4. Influência da presença de íons metálicos na síntese de lactulose*

Um ensaio foi conduzido para a avaliar a influência da presença dos cátions  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  na produção de lactulose. Para isso, esses cátions foram adicionados em concentrações variadas ao meio reacional: 0,1, 0,01 e 0,001 % (m/v) utilizando as melhores condições determinadas após os experimentos citados anteriormente.

## *3.2.3. Avaliação da produção de lactulose a partir de soro de leite*

Após a determinação das melhores condições para a produção de lactulose utilizando o meio reacional sintético, avaliou-se a produção de lactulose por *K. lactis* utilizando soro de leite como matéria prima. O soro continha a seguinte composição (por 100 g): 74 g de figuratos; 11 g de proteínas; 1 g de gorduras totais, com pH variando de 6,0 a 7,0 e acidez titulável (% ácido lático) máxima de 2,5%, se tratando de soro doce.

Inicialmente, investigou-se se as proteínas presentes no soro poderiam influenciar negativamente a síntese enzimática de lactulose. Então, com esse resultado, foi possível realizar os testes de produção. Ao final, também foi analisada a possibilidade da produção em uma única batelada de lactulose e etanol. Abaixo estão descritos os métodos utilizados nessa fase da pesquisa.

### *3.2.3.1 Precipitação das proteínas do soro de leite*

Além do soro que foi tratado para precipitação e eliminação de proteínas, também se avaliou o soro sem nenhum tratamento para verificar a possibilidade da sua utilização. Foi observado que as proteínas presentes no soro de leite interferem negativamente na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, tornando-se necessária a eliminação das mesmas. Então, as proteínas do soro de leite foram precipitadas por aquecimento a 90 °C sob suave agitação por 15 min, conforme metodologia adaptada de Lima *et al.* (2013). Após sedimentação das proteínas, o soro de leite pré-tratado foi filtrado em papel de filtro qualitativo e o pH ajustado para 7.

### *3.2.3.2 Produção de lactulose a partir de soro de leite*

Após estabelecer as condições ótimas para a produção de lactulose em meio reacional sintético contendo lactose e frutose, sua produção foi avaliada a partir de soro de leite utilizando a enzima livre e a imobilizada. Para tal procedimento, o soro de leite foi previamente diluído em tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM. Após filtrado, para retirada do precipitado proteico, adicionou-se frutose para atingir a concentração na razão previamente estabelecida nos experimentos de otimização. Amostras foram retiradas para análise de quantificação de carboidratos (lactose, glicose e lactulose). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### *3.2.3.3 Estabilidade operacional*

A estabilidade operacional de hidrólise de lactose catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana foi conduzida em Erlenmeyer-25 mL a 100 rpm. Para tal, ao soro de leite (nas condições previamente estabelecidas como ótimas) foi adicionado 1 g do derivado. Após 6h, a concentração de lactose, glicose e lactulose foram determinadas no sobrenadante. A massa do derivado foi recolhida, lavada e seca e um novo ciclo reacional foi iniciado. Ao total foram realizados 6 ciclos (bateladas consecutivas) de hidrólise.

### *3.2.3.4 Avaliação da produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro de leite*

Também foi analisada a possibilidade da produção conjunta de lactulose e etanol a partir do soro de leite tratado em uma única batelada. Para tal procedimento, reações foram conduzidas sob as condições ótimas encontradas. Para produção de etanol utilizou-se uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, que foi armazenada em Agar

Sabourand (40 g/L de dextrose, 10 g/L de peptona, 20 g/L de agar e pH 5.6) a 4 °C. Já para preparação do inóculo utilizou-se o meio YEPD – *Yeast Extract Peptone Dextrose* - (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar). Primeiramente, adicionou-se a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* immobilizada em quitosana (de acordo com metodologia citada anteriormente) e, após duas horas de reação inoculou-se o micro-organismo para produção do etanol, utilizando um volume de inóculo de 2% v/v. O volume reacional foi o mesmo utilizado nos experimentos anteriores, 10 mL. Amostras foram coletadas periodicamente para análise dos carboidratos (lactose, glicose e lactulose) e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### **3.2.4 Métodos analíticos**

#### *3.2.4.1 Medida do pH*

O pH dos meios reacionais e de cultivo foram medidos utilizando um pHmetro da Tecnal, Tec-3MP (Campinas, SP, Brasil).

#### *3.2.4.2. Determinação da concentração de proteínas*

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Utilizou-se curva de calibração com padrão soro albumina bovina (BSA), adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### *3.2.4.3. Quantificação dos carboidratos*

As concentrações de lactose, glicose, frutose e lactulose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA), com detector de índice de refração Waters (Modelo 2414) e uma coluna Supelco 610-H a 65 °C. O eluente utilizado foi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a uma concentração de 0,1% (m/v) a um fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção adicionado foi 20  $\mu$ L.

A Figura 3.1 mostra um resumo da metodologia empregada para a execução dos experimentos no meio reacional sintético e a Figura 3.2 no meio reacional que utilizava soro de leite.

Figura 3.1. Resumo da metodologia para determinação das condições ótimas para produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*

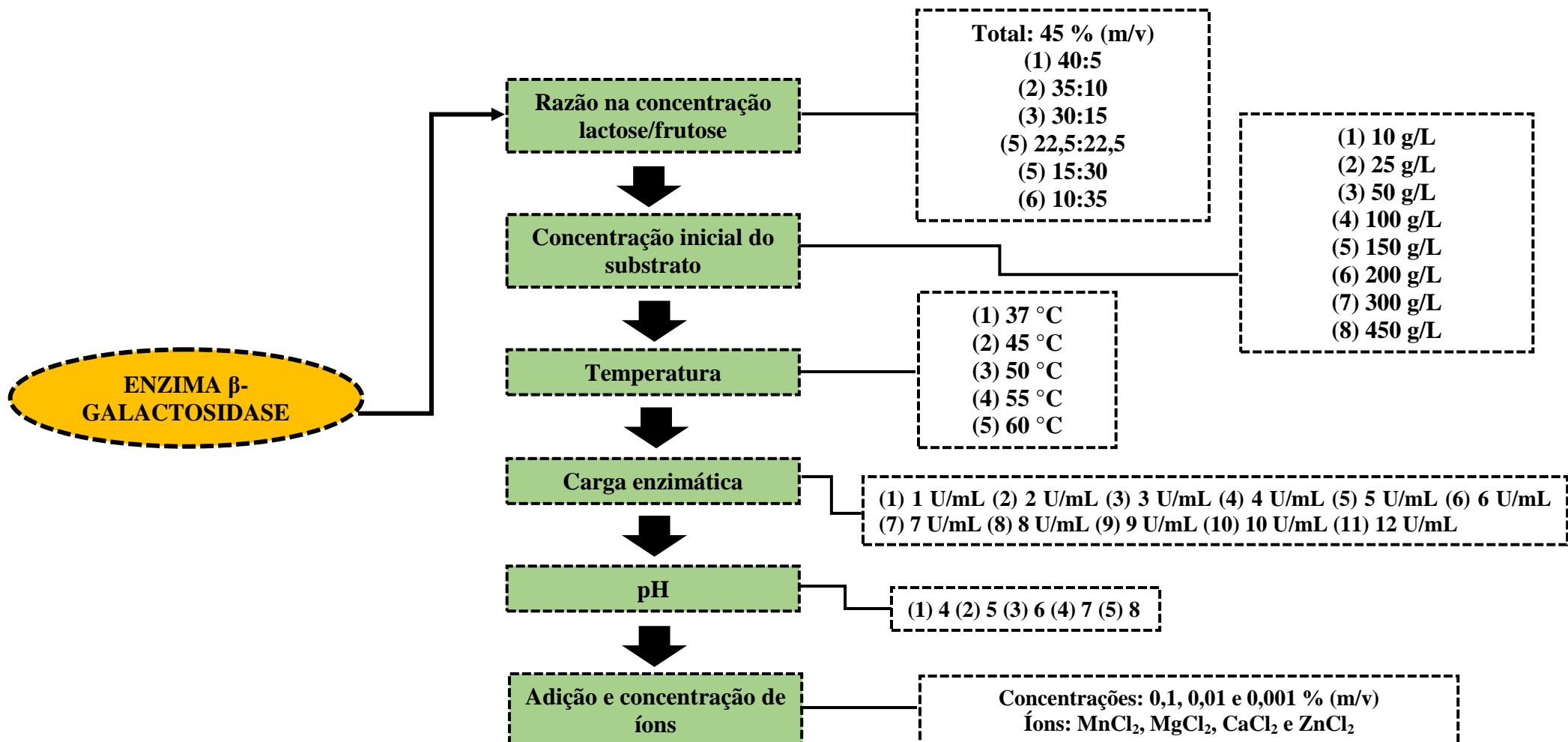
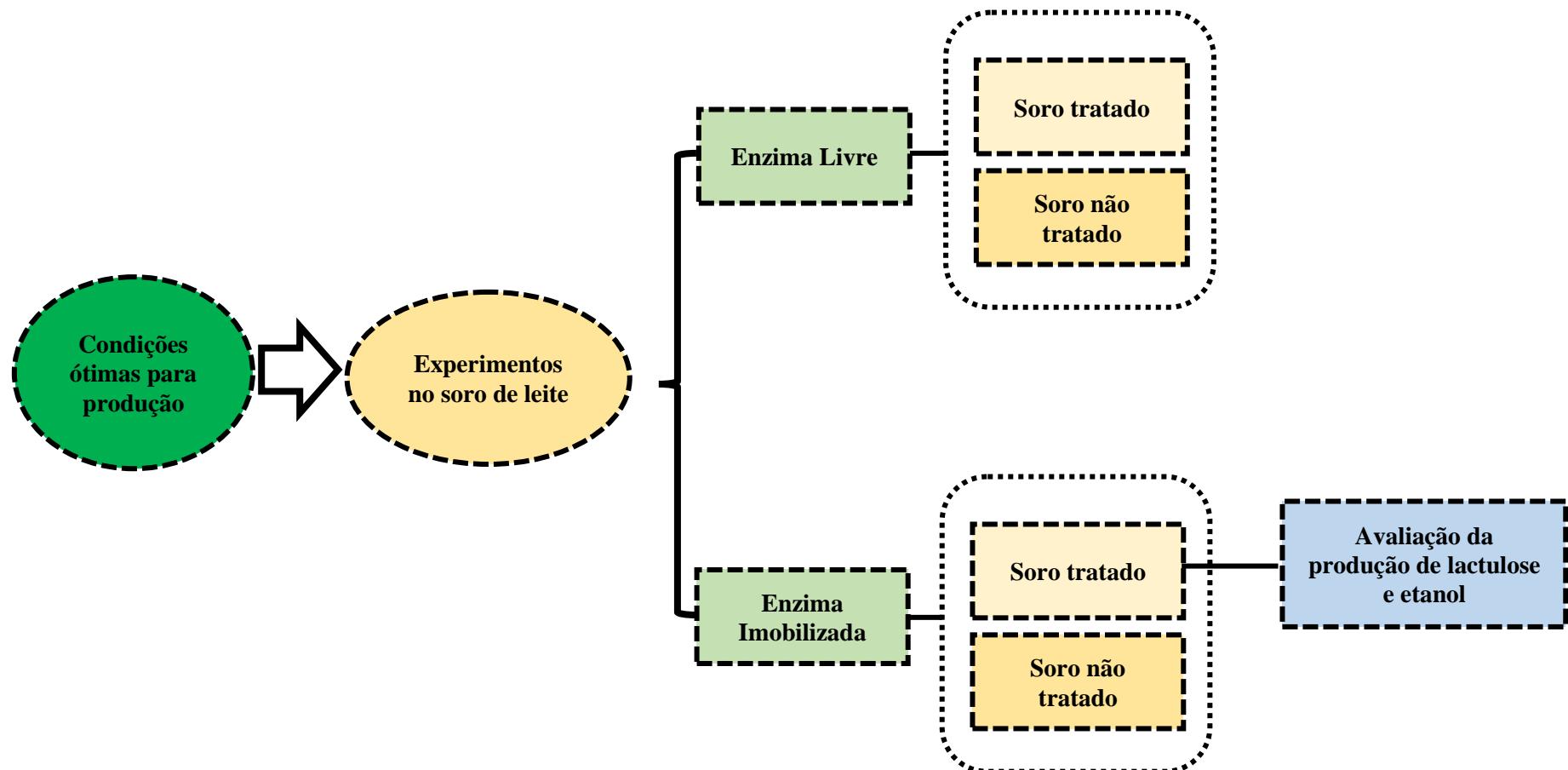


Figura 3.2. Resumo da metodologia de avaliação da produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* a partir do soro de leite



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

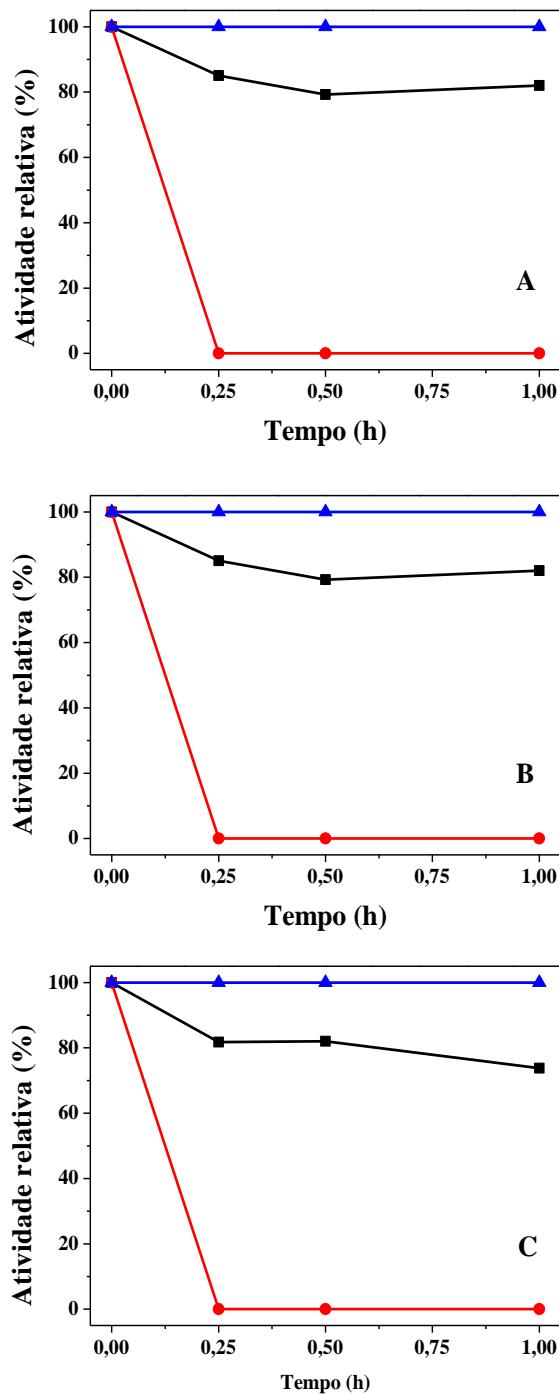
### 4.1. Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase

Previamente à realização dos experimentos para produção de lactulose, avaliou-se a imobilização enzimática de  $\beta$ -galactosidase em busca da melhoria de sua estabilidade. Os experimentos de imobilização com  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foram conduzidos no Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, em Madri, durante período de Doutorado Sanduíche. Já os experimentos que utilizaram a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foram realizados no Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos na Universidade Federal do Ceará.

#### 4.1.1. *Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidae de Aspergillus oryzae sob diferentes condições*

Em primeiro lugar, buscou-se imobilizar a enzima em Manae-Agarose aos pH 5, 7 e 9 usando baixa força iônica. Para controlar o pH, o suporte foi lavado com um alto volume do tampão de imobilização, caso contrário, as propriedades tamponantes do suporte tornariam o pH da imobilização muito similar (RODRIGUES *et al.*, 2013). A Figura 4.1 mostra que a enzima pode ser imobilizada nos 3 valores de pH em apenas alguns minutos, mantendo mais de 80% da atividade em pH 5 e 7 e 75% em pH 9.

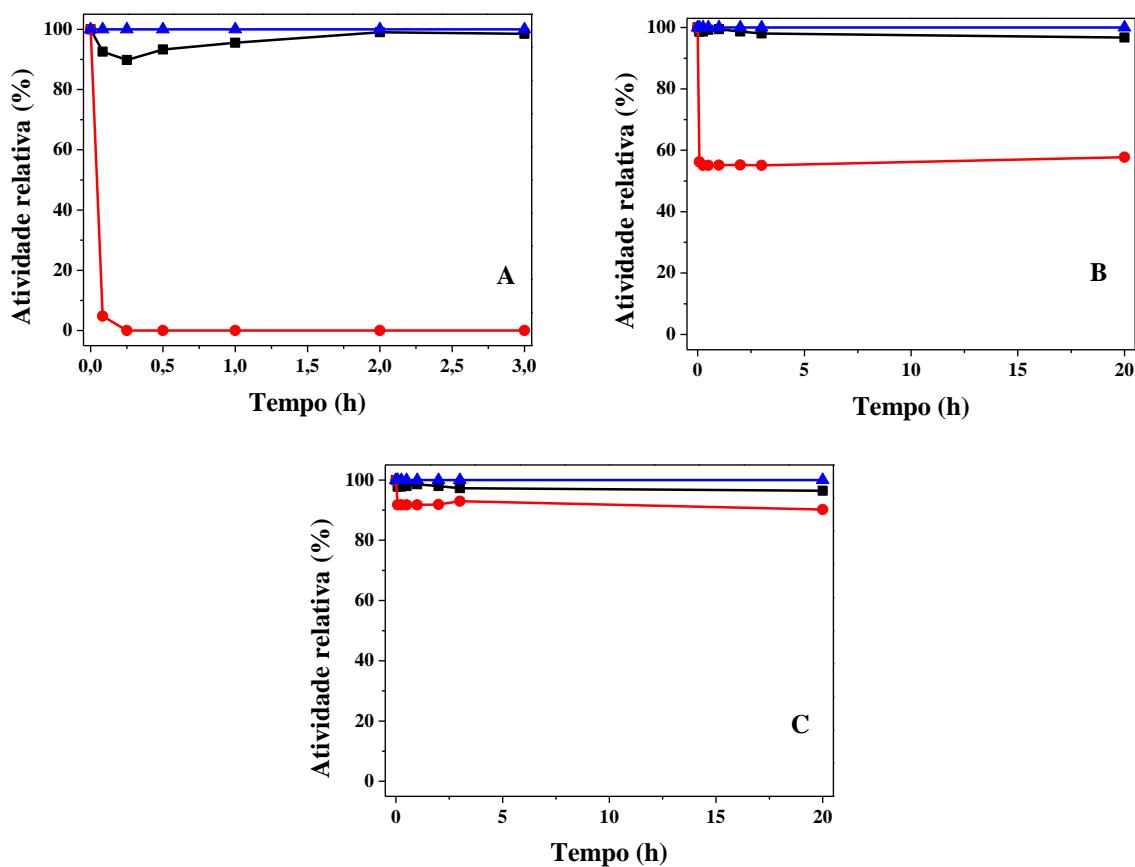
Figura 4.1. Perfil de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em suporte MANAE a 5 mM de tampão e pH 5 (A), 7 (B) e 9 (C). (■): atividade da suspensão de imobilização; (●): atividade do sobrenadante; (▲): enzima livre sob as mesmas condições.



Em relação a utilização do tampão a concentração de 25 mM, o rendimento de imobilização decresceu, exceto no pH 5 (Figura 4.2). Esse efeito é esperado

considerando a competição dos íons tampão (TONG; DONG; SUN, 2002; LYDDIATT, 2002; ANSPACH *et al.* 1999; KUMAR; GALAEV; MATTIASSEN 2000) e da enzima pelo suporte, sendo assim, essas condições não parecem ser ideais para imobilização dessa enzima. A pH 5, a carga do suporte é máxima (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993) e a imobilização seguiu rapidamente.

Figura 4.2. Perfil de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em suporte MANAE a 25 mM de tampão e pH 5 (A), 7 (B) e 9 (C). (■): atividade da suspensão de imobilização; (●): atividade do sobrenadante; (▲): enzima livre sob as mesmas condições.

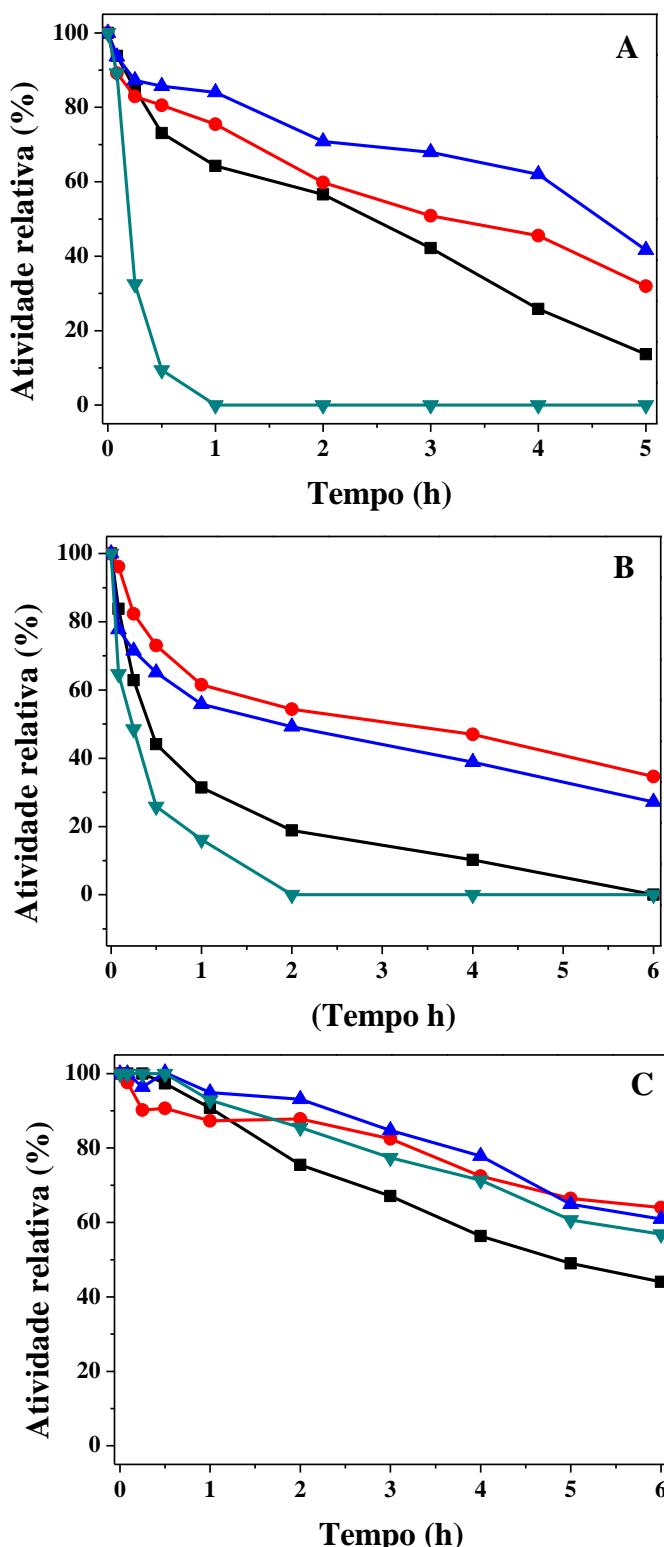


No entanto, a enzima não foi liberada quando imobilizada em tampão 5 mM e incubada em tampão 25 mM para todos os valores de pH avaliados. Portanto, após a troca multi-iônica do suporte enzimático, a força iônica que pode impedir a imobilização não é suficiente para produzir a dessorção enzimática. Contudo, toda enzima pode ser liberada para o meio usando 50 mM de tampão e o suporte pode ser reutilizado em vários ciclos de adsorção/dessorção sem qualquer efeito prejudicial sobre o desempenho.

#### ***4.1.2. Estabilidade térmica de diferentes preparações sob diferentes condições***

A Figura 4.3 mostra a estabilidade de preparações da enzima imobilizada a pH 5, 7 e 9. As estabilidades foram realizadas a pH 4,5 e diferentes concentrações de acetato de sódio (5, 25 ou 50 mM). Usando tampão 5 mM (ajustando-se adequadamente e verificando-se o pH de inativação para garantir que seja o desejado), um fato foi evidenciado: a enzima imobilizada a pH 9 foi a menos estável, inclusive em relação à enzima livre. Por outro lado, os derivados produzidos a pH 5 ou 7 foram um pouco mais estáveis que a enzima livre. Usando o tampão de inativação a 25 mM, a estabilidade da enzima imobilizada a pH 9 permaneceu a preparação menos estável, enquanto as enzimas imobilizadas a pH 5 ou 7 foram claramente mais estáveis que a enzima livre. Não se detectou enzima no sobrenadante durante a inativação nessas condições nos 3 valores de pH estudados. Utilizando 50 mM de tampão, a estabilidade de todas as preparações enzimáticas mostrou-se similar, mas pôde-se verificar que a maior parte da atividade da enzima que foi imobilizada estava presente no sobrenadante.

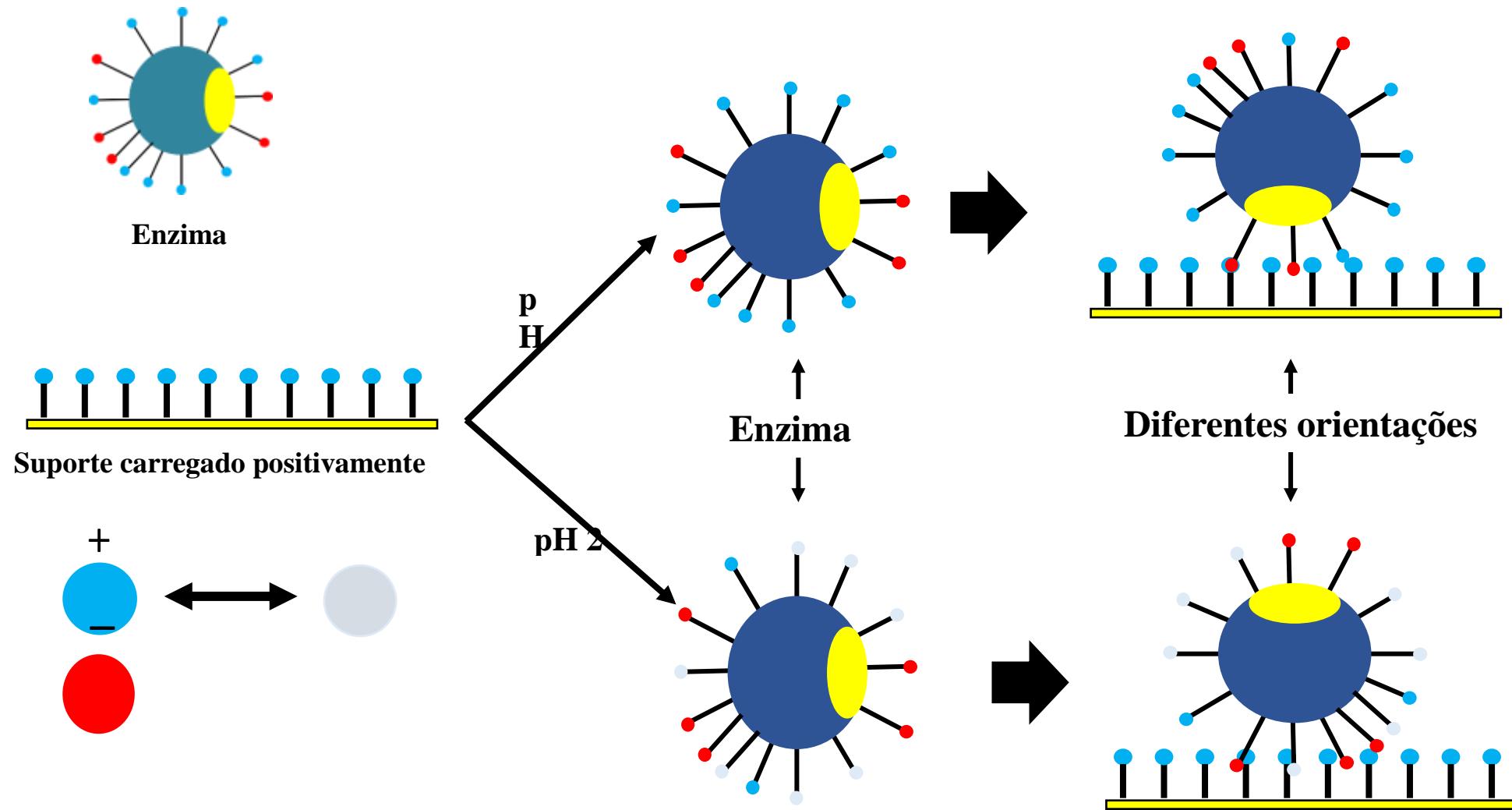
Figura 4.3. Estabilidade térmica de diferentes derivados de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* a pH 4,5 usando acetato de sódio 5 (A), 25 (B) ou 50 mM (C). As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲): Enzima immobilizada a pH 5; (●): Enzima immobilizada a pH 7; (▼): enzima immobilizada a pH 9; (■) Enzima livre.



Considerando a estabilidade muito distinta da enzima imobilizada a pH 9 com aquela imobilizada nos outros valores de pH, a provável explicação é que a enzima é imobilizada no suporte via diferentes áreas a pH 9 e por outras áreas a pH 5 e pH 7. Caso contrário, a estabilidade deveria ser semelhante, uma vez que o suporte é o mesmo, a enzima é a mesma, e as condições de inativação são idênticas. Esse fato pode ser causado porque a diferentes valores de pH, o balanço iônico de diferentes áres da proteína pode ser diferente, permitindo a imobilização por diferentes áreas desta molécula. Essa situação está representada na Figura 4.4.

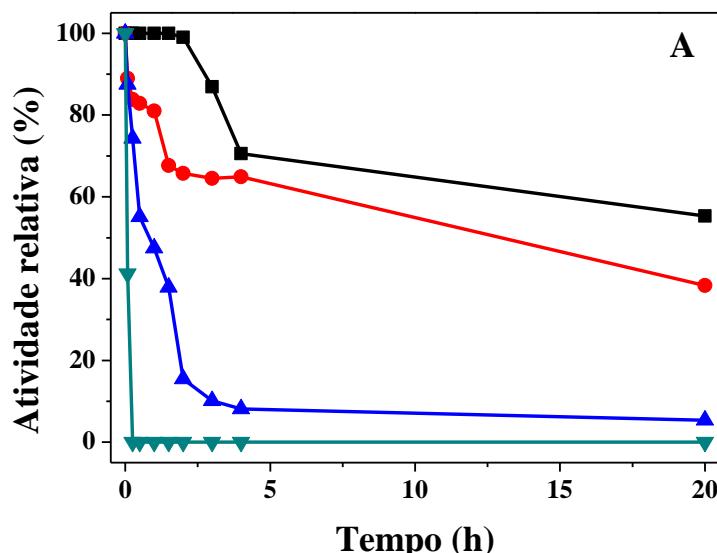
Não se espera que a adsorção iônica tenha grandes efeitos positivos sobre a rigidez enzimática, mas pode melhorar a sua estabilidade operacional sob certas condições (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2015), evitando a precipitação da enzima. A interação iônica fraca de um único ponto (TONG; DONG; SUN, 2002; LYDDIATT, 2002; ANSPACH *et al.* 1999, KUMAR; GALAEV; MATTIASSEN 2000) e a existência de muitos grupos iônicos sob a superfície da proteína, que podem fixar incorretamente estruturas enzimáticas (SANTOS *et al.*, 2015), são os principais motivos pelos quais se esperam uma baixa estabilização de uma enzima monomérica após a troca iônica. No caso da enzima utilizada, a área envolvida na imobilização a pH 9 parece sofrer interações negativas com o suporte, enquanto esses efeitos foram mais amenos nas imobilizações conduzidas sob pH 5 ou pH 7. A 5 mM, a estabilização observada para a enzima imobilizada a pH 5 ou 7 foi irrelevante, enquanto que usando tampão 25 mM foi estabilizada de 2-3 vezes. Isso pode ser devido à baixa interação entre a enzima e suporte. Usando tampão de concentração 50 mM e a temperatura de 55 °C a enzima se desorve e as estabilidades são semelhantes às da enzima livre.

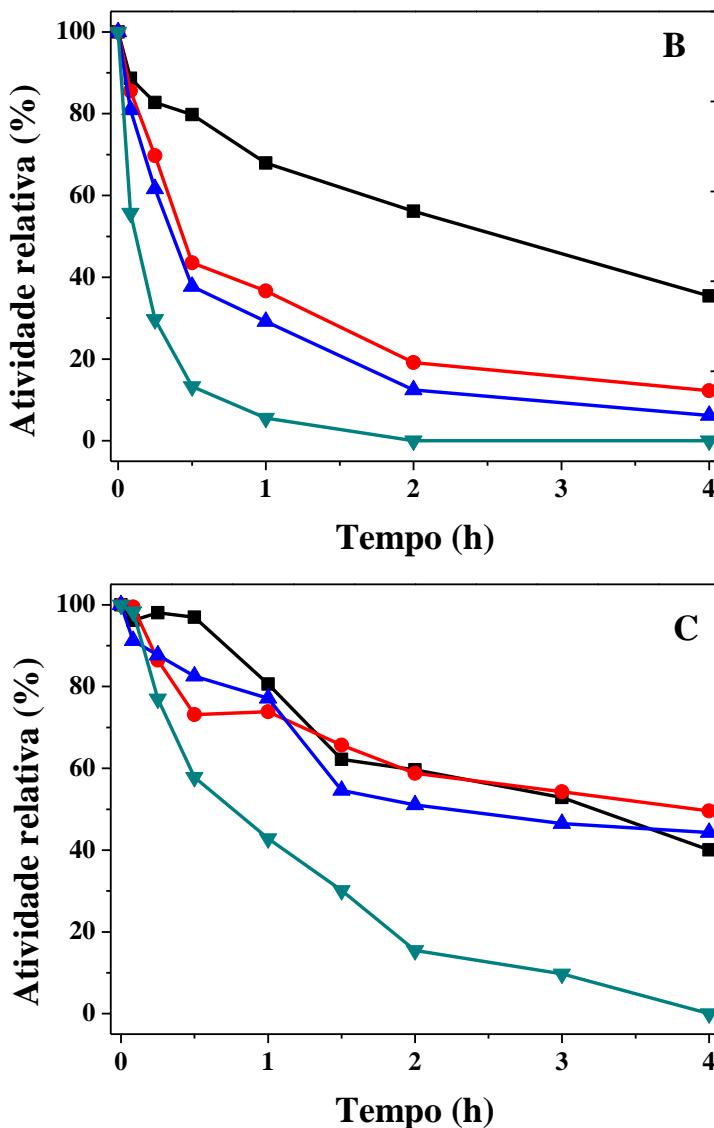
Figura 4.4. Efeito do pH de immobilização na orientação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em relação à superfície de suporte



As inativações a pH 7 ofereceram um perfil similar (Figura 4.5). Nesse caso, pode não ser esperado que qualquer causa intermolecular possa explicar a inativação da enzima livre, e todas as preparações enzimáticas imobilizadas são menos estáveis usando tampão de inativação 5 mM, conforme esperado da "atividade" física do suporte ativado (SANTOS *et al.*, 2015). Nesse caso, a pH 9, o derivado se mantém com comportamento semelhante ao do menos estável, enquanto que a pH 5 é significativamente mais estável que a enzima imobilizada a pH 7. Usando tampão a 25 mM, que enfraquece as interações do suporte enzimático (TONG; DONG; SUN, 2002; LYDDIATT, 2002; ANSPACH *et al.* 1999; KUMAR; GALAEV; MATTIASSEN 2000), as diferenças entre as enzimas imobilizadas são menores, contudo ainda a enzima imobilizada a pH 9 é consideravelmente menos estável. Embora a enzima esteja dessorvida nessas condições, sua baixa estabilidade enquanto imobilizada a pH 9 faz com que a enzima seja inativada antes mesmo de ser dessorvida.

Figura 4.5. Estabilidade térmica de diferentes derivados de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* a pH 7 empregando 5 mM (A), 25 mM (B) ou 50 mM (C) de tampão fosfato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲) enzima imobilizada a pH 5; (●) enzima imobilizada a pH 7; (▼) enzima imobilizada a pH 9; (■) enzima livre.

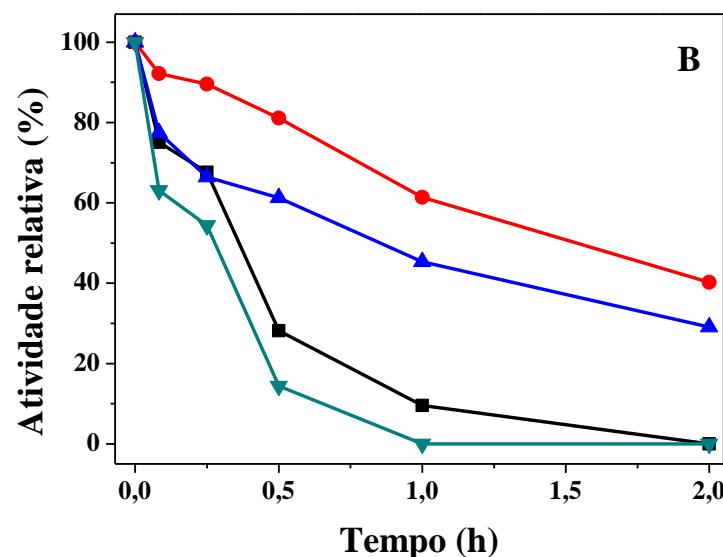
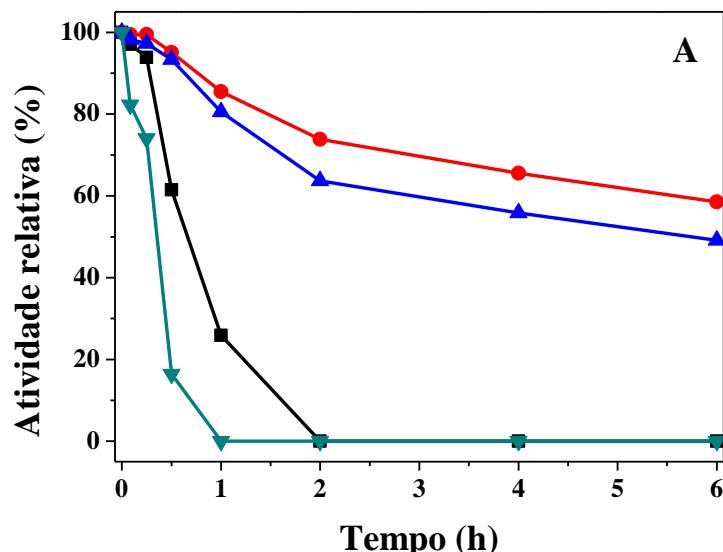


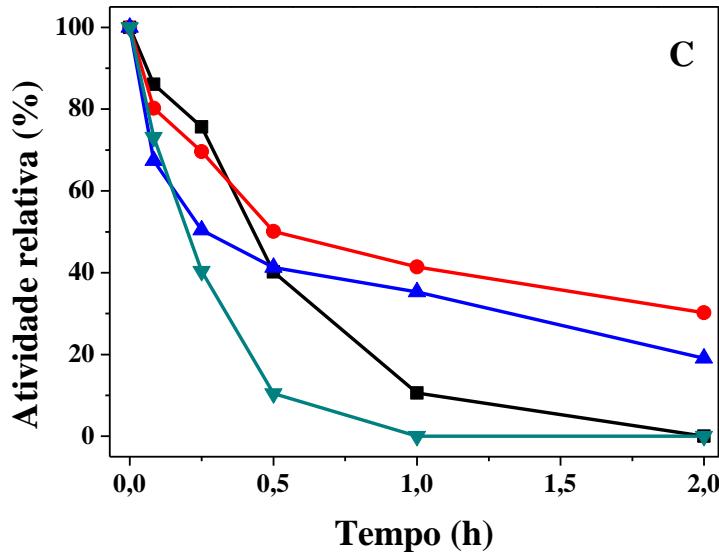


As inativações a pH 9 apresentam uma nova situação (Figura 4.6). A enzima imobilizada a pH 9 é a menos estável, até menos que a enzima livre, enquanto a imobilizada a pH 5 é mais estável que a enzima imobilizada a pH 7, e ambas mais estáveis que a enzima livre. Nesse caso as diferenças observadas diminuíram quando a concentração do tampão foi aumentada, mas a estabilidade da enzima livre não é superior em nenhum dos casos, embora a 50 mM alguma quantidade de enzima possa ser encontrada no sobrenadante. As hipóteses são similares às previamente descritas. Assim, a enzima imobilizada a pH 5 mostrou-se a preparação mais estável, e a imobilização a pH 9 é a menos estável sob todas as inativações de pH estudadas,

confirmando a hipótese da influência do pH e da força iônica na orientação da enzima (Figura 4.4).

Figura 4.6. Estabilidade térmica de diferentes derivados de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* a pH 9 empregando 5 mM (A), 25 mM (B) ou 50 mM (C) de tampão fosfato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲) enzima immobilizada a pH 5; (●) enzima immobilizada a pH 7; (▼) enzima immobilizada a pH 9; (■) enzima livre.

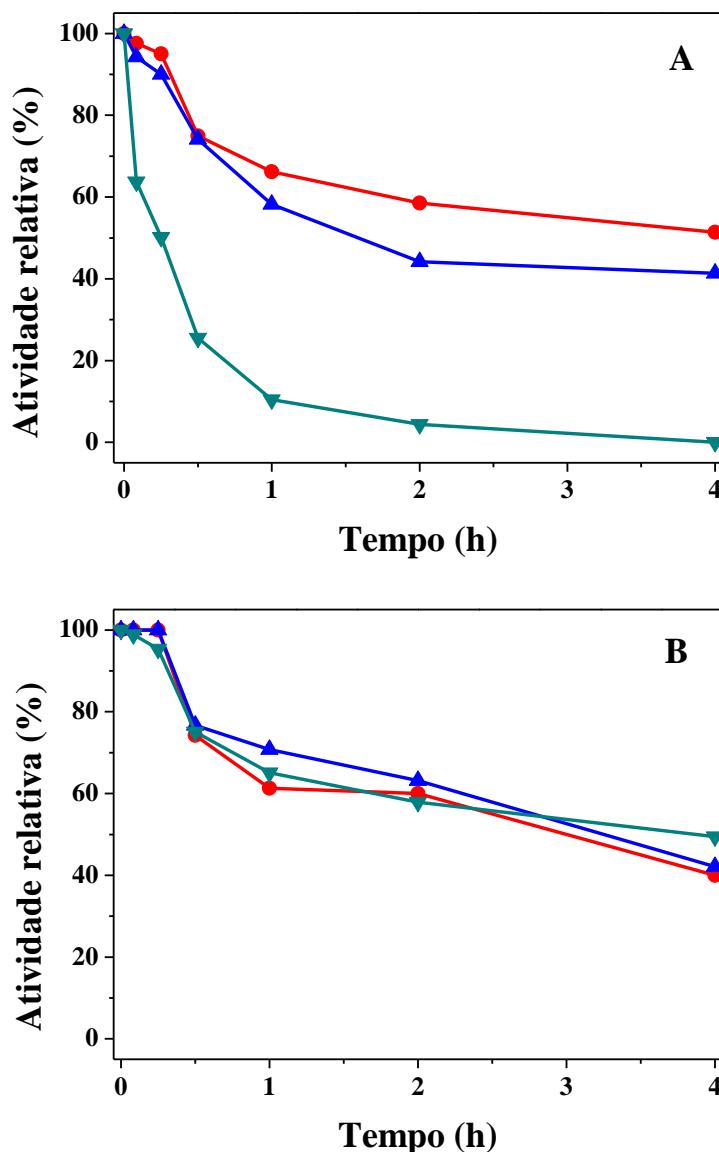




#### 4.1.3. Estabilidade na presença de etanol

A Figura 4.7 mostra a inativação dos três biocatalisadores preparados na presença de etanol em duas concentrações de tampão. A precipitação instantânea visível da enzima livre faz com que não sejam inclusos aqui os resultados obtidos com esta. É evidente que novamente a estabilidade da enzima immobilizada a pH 9 é menor do que as outras duas preparações usando baixa concentração de tampão, mas isso não ocorre usando este a 25 mM. Os resultados confirmam os obtidos em inativações térmicas: a enzima immobilizada a pH 9 sofre algumas interações negativas com o suporte, que são diminuídas quando a força iônica é aumentada.

Figura 4.7. Estabilidade térmica de diferentes derivados de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* a pH 5 na presença de 50 % de etanol em 5 mM (A) ou 25 mM (B) de acetato de sódio. As inativações foram conduzidas a 50 °C. (▲) enzima immobilizada a pH 5; (●) enzima immobilizada a pH 7; (▼) enzima immobilizada a pH 9.



No caso específico da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, a immobilização no suporte MANAE permitiu manter um nível muito alto de atividade enzimática nos 3 pHs de immobilização utilizados (75-85%). A enzima permaneceu immobilizada em condições onde a dessorção não ocorreu, sugerindo que a immobilização e a dessorção enzimáticas não são processos totalmente similares. A immobilização da enzima requer o estabelecimento de várias ligações desta com o suporte, o que é muito

difícil pelo incremento da força iônica. No entanto, a sua dessorção requer a quebra simultânea das pontes iônicas formadas, muito provavelmente mais do que o necessário para a imobilização da enzima, pois a proximidade da enzima e do suporte intensifica a interação.

Contudo, quando foram conduzidos os experimentos para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em suporte MANAE, verificou-se que não foi possível a imobilização em nenhuma das condições anteriormente citadas. A próxima etapa do trabalho, dessa forma, investigou a imobilização dessa enzima em quitosana, conforme protocolos estabelecidos anteriormente por Lima *et al.* (2013). Pode-se observar na Figura 4.8, a imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana 2% (m/v) ativada com glutaraldeído. Analisando a Figura 4.8, quando se observa a linha que representa a atividade do sobrenadante, percebe-se que praticamente 100% da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* oferecida foi imobilizada no suporte. Uma vez que a reação de produção de lactulose, após a determinação das condições ótimas, deve ser conduzida a 50 °C, analisou-se a estabilidade térmica do derivado enzimático obtido em quitosana (Figura 4.9). Verificou-se, diante dos experimentos de estabilidade, que a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre se inativa rapidamente, cerca de 80% em apenas 2 min de reação. No entanto, a enzima imobilizada em quitosana e reticulada com glutaraldeído se manteve com estabilidade acima de 60% a 60 °C.

Figura 4.8. Perfil de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído. (■) atividade da suspensão de imobilização; (●) sobrenadante da suspensão de imobilização; (▲) enzima livre sob as mesmas condições.

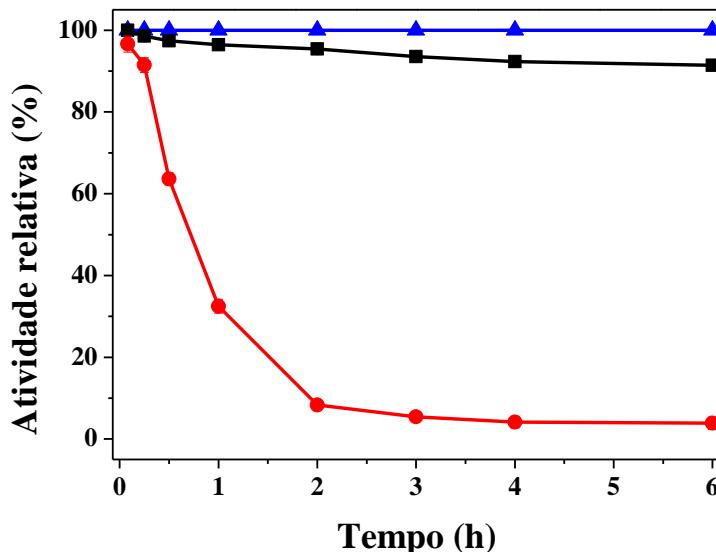
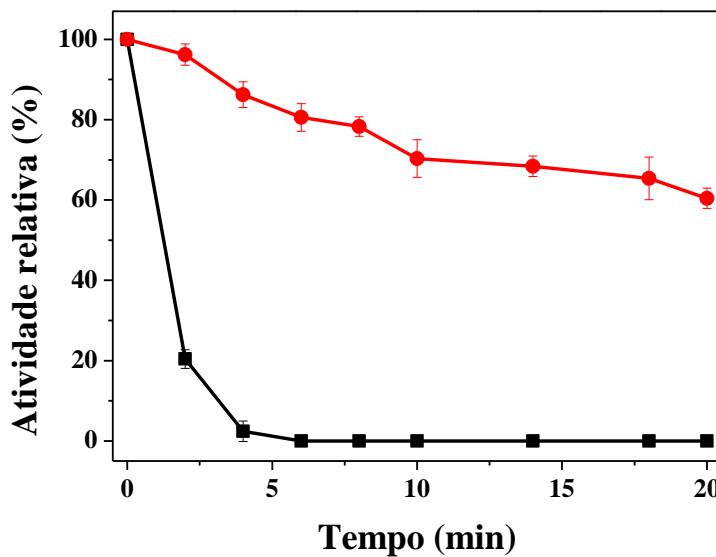


Figura 4.9. Estabilidade térmica a 60 °C da  $\beta$ -galactosidase livre (■) e imobilizada em quitosana reticulada com glutaraldeído (●).



Ressalta-se que não foi possível a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* no suporte Agarose-Manae, portanto, essa enzima (imobilizada

em quitosana) foi utilizada nos testes realizados para a produção de lactulose a partir de soro de leite, como mostrado nos resultados que seguem.

#### **4.2. Condições ótimas para a produção de lactulose utilizando $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis***

Com o objetivo de obter o maior rendimento possível de lactulose, foram estudados os efeitos das variáveis operacionais: razão lactose/frutose, concentrações iniciais de açúcares (lactose e frutose), temperatura, pH e carga enzimática. A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos nesta etapa de determinação das melhores condições da produção de lactulose.

##### **4.2.1. Razão entre as concentrações de lactose e frutose**

Para determinar a razão ótima de lactose e frutose para a máxima produção de lactulose, diferentes reações foram conduzidas com 45% (m/v) de açúcares totais, variando a razão de lactose e frutose (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Efeito da razão entre as concentrações de lactose e frutose na produção de lactulose pela  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* com total de 45% (m/v) de açúcares. A 37 °C, pH 7, 5 U/mL e 100 rpm.

| <b>Lactose : Frutose<br/>(% m/v)</b> | <b>Lactose (g/L)</b> | <b>Frutose (g/L)</b> | <b>Lactulose (g/L)</b> |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
|                                      | <b>0h</b>            | <b>0h</b>            | <b>2h</b>              |
| <b>1 (40:5)</b>                      | 390,92 ± 0,21        | 50,42 ± 0,50         | 0,00 ± 0,00            |
| <b>2 (35:10)</b>                     | 335,12 ± 0,40        | 94,28 ± 0,10         | 0,00 ± 0,00            |
| <b>3 (30:15)</b>                     | 297,73 ± 0,44        | 146,9 ± 0,30         | 2,30 ± 0,36            |
| <b>4 (22,5:22,5)</b>                 | 222,20 ± 0,35        | 230,50 ± 0,15        | 6,06 ± 0,55            |
| <b>5 (15:30)</b>                     | 148,80 ± 0,61        | 290,92 ± 0,21        | 10,34 ± 0,42           |
| <b>6 (10:35)</b>                     | 100,34 ± 0,32        | 349,00 ± 0,12        | 7,95 ± 0,65            |

A máxima produção de lactulose foi alcançada quando foi utilizada uma razão de 15% (m/v) de lactose para 30% (m/v) de frutose, proporcionando uma concentração de 10,34 g/L de lactulose, implicando numa razão ótima de 1:2 em relação as concentrações de lactose e frutose, respectivamente. Quando se utilizou a proporção correspondente a 10% de lactose para 35% de frutose em m/v, a produção de lactulose foi reduzida em 23,1% em relação a concentração mais alta obtida, ou seja, produziu-se apenas  $7,95 \pm 0,65$  g/L.

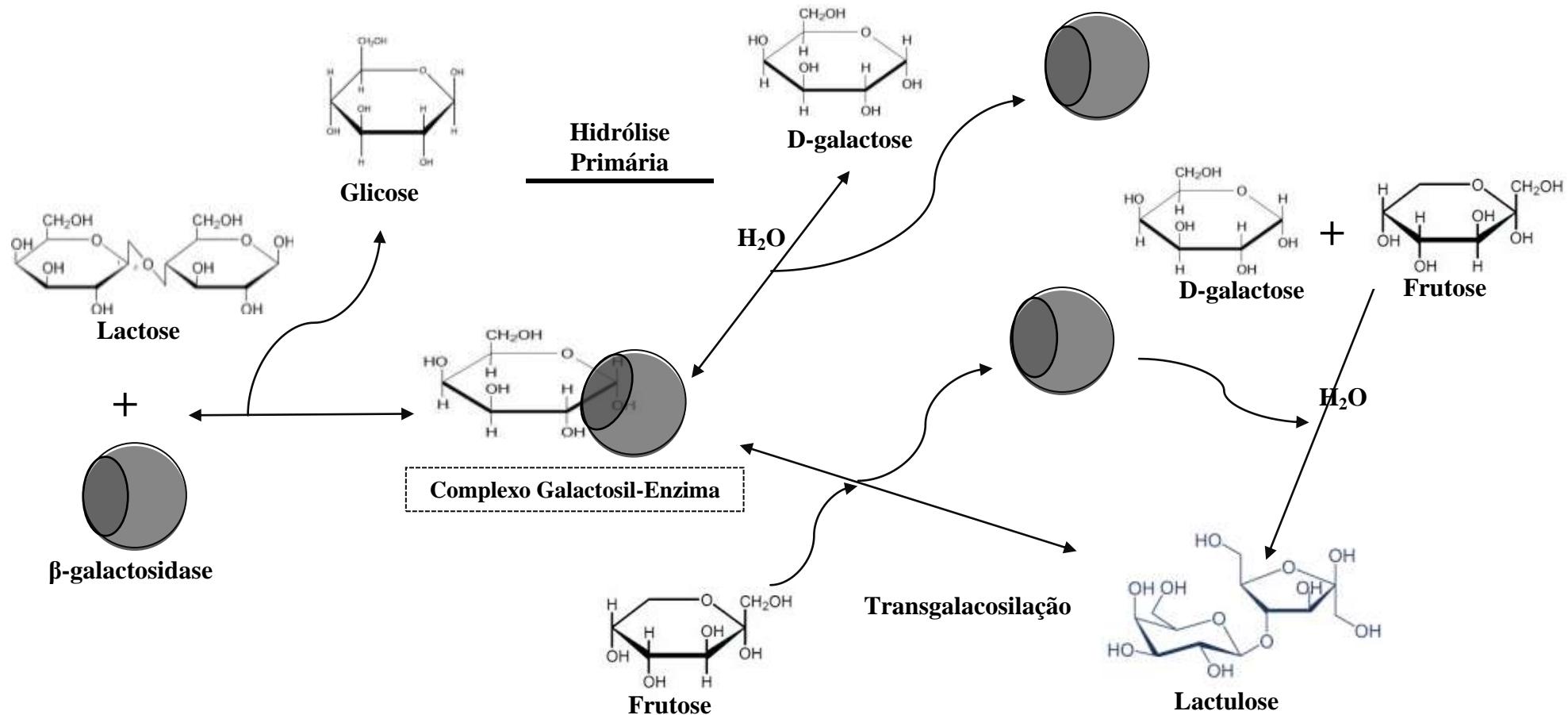
Em geral, a formação de lactulose é dependente da razão entre a concentração de lactose/frutose. Todos os resultados apresentados indicam que uma produção eficaz de lactulose é alcançada quando a proporção de lactose/frutose é apropriada. A literatura propõe um mecanismo da produção de lactulose via processo enzimático, no qual a lactose é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, seguido da formação de galactose e glicose. A galactose formada se liga à enzima para criar o complexo galactosil-enzima para futuramente reagir com frutose como um acceptor, formando a lactulose (KIM; PARK; OH, 2006).

Os resultados obtidos em relação a razão ótima de lactose e frutose a ser utilizada para a síntese de lactulose são distintos se comparados com um trabalho publicado por Kim, Park e Oh (2006), uma vez que esses autores perceberam que a razão ótima de lactose e frutose para a síntese de lactulose seria de 2:1, respectivamente. No entanto, a  $\beta$ -galactosidase utilizada por esses pesquisadores foi obtida a partir de uma modificação genética utilizando genes da bactéria *Sulfolobus solfataricus*, sendo distinta da enzima utilizada no presente trabalho.

Sitanggang, Drews e Kraume (2015) avaliaram a influência das condições operacionais na síntese de lactulose em um sistema reator de membranas. Já esses autores observaram que uma baixa razão da concentração de lactose e frutose é, geralmente, favorável para obter um aumento da concentração da lactulose, uma vez que se aumentam as probabilidades da frutose atuar como acceptor de galactosil (mostrado na Figura 4.10). Esses pesquisadores obtiveram resultados similares aos obtidos no presente estudo, usando uma razão de lactose e frutose de 1:2, respectivamente, alcançaram a melhor produção de lactulose, 15,25 g/L. A literatura também cita outros resultados (GUERRERO *et al.*, 2011) que mostram que ao se utilizar razões de lactose e frutose iguais ou superiores a 1:1 (ou seja, concentrações de frutose superiores as de lactose), a síntese de galacto-oligossacarídeos é favorecida em relação a produção de lactulose. Para um processo contínuo em reator de leito fixo,

Song *et al.* (2013) também reportaram que a uma razão lactose/frutose de 1:2 obteve-se uma síntese máxima de lactulose usando uma  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada. Já em estudos realizados por Liao *et al.* (2016), concluiu-se que a concentração de lactulose diminuiu juntamente com o aumento da concentração de frutose. Para esses autores, quando a proporção em massa de lactose e frutose foi de 4:1, obteve-se a concentração máxima de lactulose (15,14 g/L). No entanto, o rendimento máximo de lactulose ( $33,89 \pm 1,44$  mg de lactulose/g de lactose inicial) ocorreu na proporção de massa de 2:1 de lactose para frutose.

Figura 4.10. Possíveis reações e produtos da transgalactosilação na presença de frutose catalisada por  $\beta$ -galactosidase

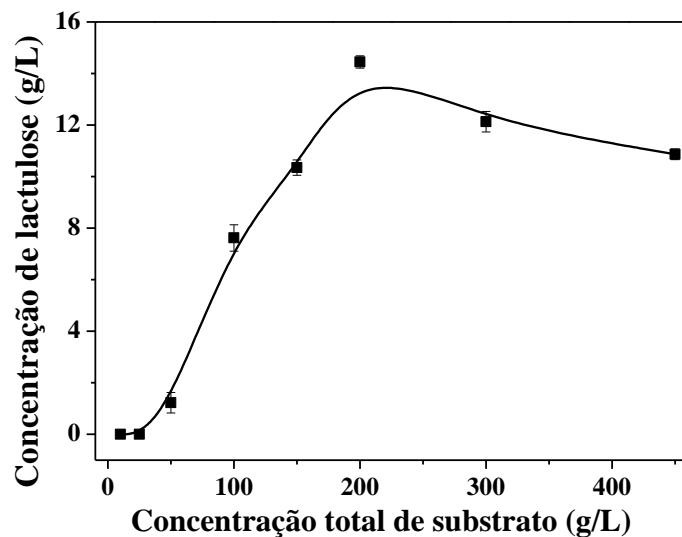


Fonte: Elaborado pelo autor (Adaptado de Sitanggang, Drews, Kraumea (2015)

O meio para a síntese de lactulose contém lactose e frutose de modo que ambos os açúcares possam atuar como aceptores de galactose, levando à síntese de galactoligossacarídeos (GOS) e lactulose, respectivamente. O mecanismo para a síntese de lactulose com  $\beta$ -galactosidase é semelhante ao descrito para GOS (VERA *et al.*, 2011, 2013; GUERRERO *et al.*, 2011) (Figura 2.5). A síntese de lactulose a partir de lactose e frutose é uma reação controlada cineticamente, onde a enzima age pela primeira vez em lactose formando o complexo galactosil-enzima com a liberação de uma molécula de glicose por molécula de lactose reagida. O complexo galactosil-enzima então reage com uma molécula de frutose para produzir lactulose, ou com moléculas de lactose para formar consecutivamente GOS com diferentes comprimentos de cadeia (VERA *et al.*, 2011, 2013). Alternativamente, o complexo pode reagir com água para produzir galactose. Enquanto a lactose e a frutose estiverem em alta concentração, as reações de transgalactosilação prevalecerão sobre a hidrólise; no entanto, à medida que diminuem como consequência da reação, a hidrólise assumirá o controle, sendo a água o principal acceptor, e, portanto, a galactose será liberada.

Após se determinar a razão ótima de lactose e frutose para a produção de lactulose, foi avaliado o efeito da concentração total de substrato na produção de lactulose (mantendo a razão ótima de 1:2 de lactose e frutose previamente determinada). A Figura 4.11 mostra os resultados obtidos de acordo com as diversas concentrações totais utilizadas (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 450 g/L). Observa-se que em concentrações totais de carboidratos até 25 g/L não foi possível sintetizar a lactulose a partir do meio reacional (provavelmente devido a menor probabilidade da enzima entrar em contato com os substratos). A partir da concentração de 50 g/L, inicia-se a produção de lactulose, alcançando, a essa concentração, produção de 1,23 g/L. Com concentração total de 200 g/L foi obtida a mais elevada concentração de lactulose, 14,45 g/L. A partir de 300 g/L de concentração total de carboidratos, a síntese de lactulose foi reduzida, atingindo 12,13 g/L nessa concentração e 10,87 g/L quando se empregou uma concentração total de 450 g/L. Esse fato, pode estar associado à inibição pelo substrato, uma vez que o substrato pode provocar inibição da sua própria catálise por via de ligação ao centro ativo da enzima. Assim, conclui-se que a razão entre a concentração de lactose e frutose para otimizar a síntese de lactulose pela  $\beta$ -galactosidase utilizada é de 1/2 (respectivamente) e a concentração total que favoreceu a síntese do prebiótico foi de 200 g/L.

Figura 4.11. Efeito da concentração total de substrato (lactose + frutose) na produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* na razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) a 37 °C, pH 7,5 U/mL e 100 rpm.



A Tabela 4.2 compara a produção de lactulose pela enzima utilizada nesses experimentos com estudos em que houve o uso da enzima  $\beta$ -galactosidase de diversas origens para produção de lactulose. Comparando os presentes resultados com os obtidos por Lee, Kim e Oh (2004), por exemplo, observa-se que a concentração de lactulose obtida foi levemente inferior, no entanto, o rendimento (representado por g de lactulose produzida por g de lactose consumida) obtido no presente estudo foi cerca de 6,6 vezes superior, mostrando maior eficiência no processo.

Tabela 4.2. Produção de lactulose por via enzimática utilizando diferentes  $\beta$ -galactosidases e diferentes concentrações de substrato

| Origem                                   | Substrato (g/L) |         | Lactulose<br>(g/L) | Produtividade<br>(g/L.h) | Rendimento<br>(%) | Ref.  |
|--|-----------------|---------|--------------------|--------------------------|-------------------|---|
|  | Lactose         | Frutose |                    |                          |                   |   |
| <i>K. lactis</i>                         | 66,7            | 133,3   | 14,5               | 7,3                      | 20                | Presente estudo                                   |
| <i>Bacillus circulans</i>                | 56              | 444     | 16                 | NR*                      | 3                 | Guerrero <i>et al.</i><br>(2011)                  |
| <i>Pyrococcus furiosus</i>               | 34              | 270     | 15                 | 52                       | 5                 | Mayer, Kranz e<br>Fischer, 2010)<br><br>Adamczak, |
| <i>Aspergillus niger</i>                 | 200             | 150     | 65                 | NR*                      | 19                | Charubin e<br>Bednarski (2009)                    |
| <i>Sulfolobus</i><br><i>solfataricus</i> | 400             | 200     | 50                 | 8                        | 8                 | Kim, Park e Oh,<br>2006                           |
| <i>K. lactis</i>                         | 400             | 200     | 20                 | 7                        | 3                 | Lee, Kim e Oh<br>(2004)                           |
| <i>Saccharomyces</i><br><i>fragilis</i>  | 120             | 200     | 9                  | NR*                      | 3                 | Vaheri e Kaupinnen<br>(1978)                      |

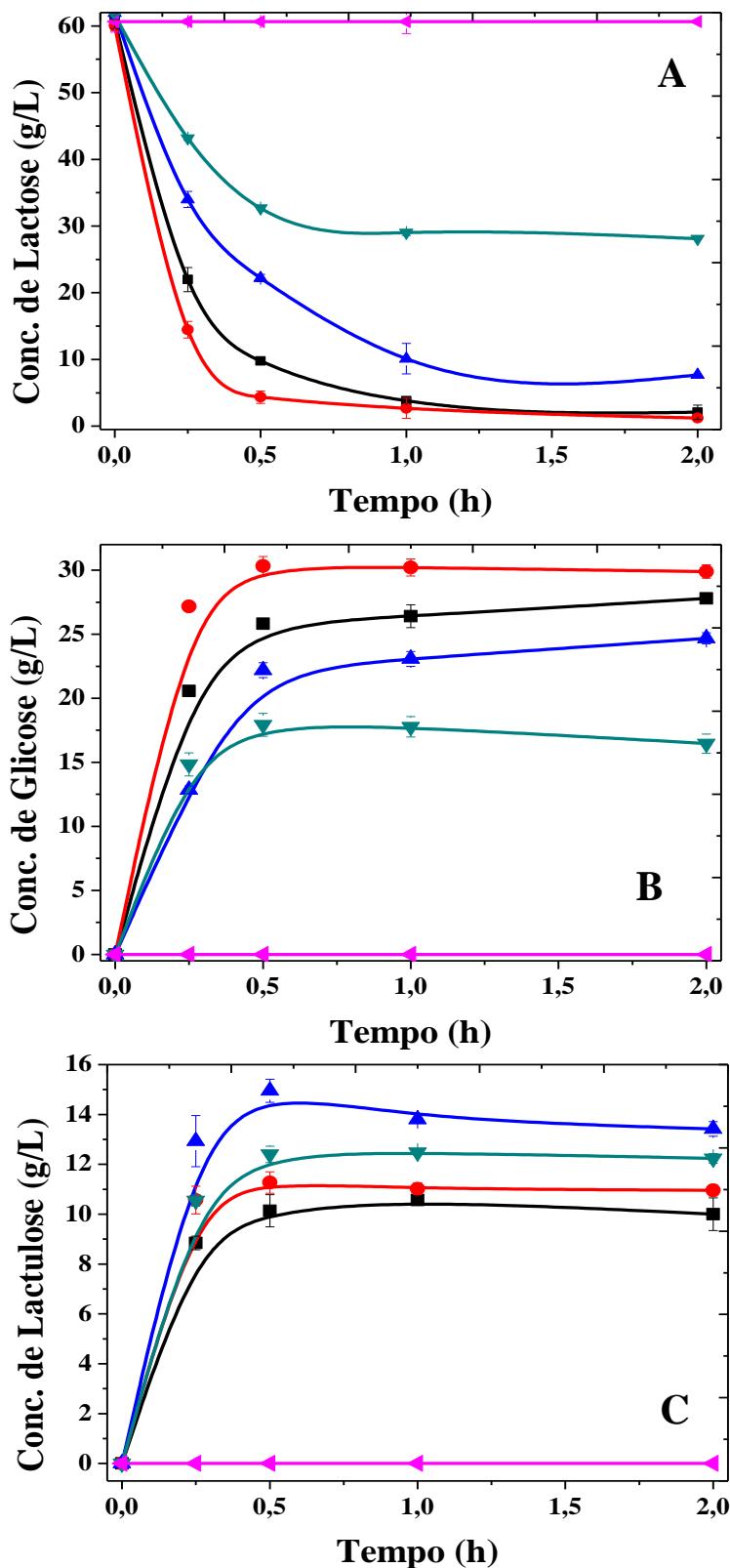
#### **4.2.2. Efeito da temperatura**

Após se determinar a melhor razão e concentração de lactose e frutose a serem usados como substratos para a produção de lactulose, avaliou-se o efeito da temperatura para o processo, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.12. Na Figura 4.12-A, observa-se o consumo de lactose na reação para produção de lactulose nas temperaturas avaliadas (37, 45, 50, 55 e 60 °C). A 37 °C e 45 °C foram observados os maiores consumos de lactose, mostrando que a essas temperaturas a atuação da enzima  $\beta$ -galactosidase foi favorecida, incrementando a sua atividade. A hidrólise de lactose nessas duas temperaturas citadas foi acima de 90% em até 1 h de reação. Já à temperatura de 50 °C, a utilização de lactose na reação chegou a aproximadamente 80%, mostrando uma redução na atividade da enzima a essa temperatura reacional. Quando os experimentos foram conduzidos a 55 °C, observou-se que o consumo da lactose nas reações foi reduzido, alcançando-se o consumo de cerca de 50% em 1h de reação. A 60 °C, a enzima  $\beta$ -galactosidase não foi capaz de converter a lactulose, mantendo-se, ao longo da reação, 100% da concentração inicial. Em trabalho realizado por Kim, Park e Oh (2006) observou-se que a enzima  $\beta$ -galactosidase converteu 50% da lactose presente no meio reacional em cerca de 2 h.

A Figura 4.12-B apresenta os perfis de concentração de glicose liberada durante a reação de síntese de lactulose nas diferentes temperaturas avaliadas. Na síntese enzimática por transgalactosilação da lactose, a glicose é considerada um contaminante que deve ser removido após o processo, portanto, quanto mais altas as concentrações de glicose, mais caros serão os processos de purificação, além disso, pode interferir negativamente na síntese de lactulose.

Os resultados para liberação de glicose no meio reacional nos experimentos que avaliaram a temperatura são coincidentes com a concentração de lactose hidrolisada. Observa-se que nas reações sob 37 °C e 45 °C atingiram-se as maiores produções de glicose a partir da hidrólise da lactose, alcançando as concentrações de  $27,80 \pm 0,11$  g/L e  $30,33 \pm 0,74$  g/L, respectivamente. Porém, a 50 °C e a 55 °C a produção de glicose foi menor, atingindo  $24,68 \pm 0,44$  g/L e  $17,92 \pm 0,90$  g/L, respectivamente. A 60 °C, devido a provável desnaturação da enzima, não se observou a síntese de glicose.

Figura 4.12: Hidrólise de lactose (A), produção de glicose (B) e lactulose (C) utilizando diferentes temperaturas reacionais: 37 °C (■), 45 °C (●), 50 °C (▲), 55 °C (▼) e 60 °C (◀). Condições: 100 rpm, 5 U/mL.



Quando a enzima está em meio de lactose, a hidrólise e a transgalactosilação são reações que concorrem entre si, prevalecendo a transgalactosilação no início da reação, quando a concentração de lactose é alta, sendo progressivamente deslocada por hidrólise à medida que a conversão de lactose aumenta, de modo que a glicose e galactose são os produtos finais. A hidrólise da lactose segue a cinética de Michaelis-Menten com inibição competitiva por galactose (VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). Dessa maneira, elevadas concentrações de glicose podem indicar uma interferência negativa na produção de lactulose, uma vez que pode levar a uma inibição competitiva pelo produto, reduzindo a síntese de lactulose.

A Figura 4.12-C apresenta a produção de lactulose nas diferentes temperaturas avaliadas para se selecionar a temperatura ótima para sua síntese. Analisando-a, como já se esperava, nota-se que à temperatura de 60 °C a enzima, provavelmente devido à desnaturação parcial ou total, não foi capaz de catalisar a reação para produção de lactulose, não se detectando, portanto, a produção dessa substância. A 37 °C a quantidade de lactulose obtida foi de  $10,57 \pm 0,16$  g/L. A 45 °C a produção foi um pouco mais favorecida, atingindo  $11,27 \pm 0,13$  g/L. A 50 °C foi a temperatura ótima para produção de lactulose, atingindo-se a produção de  $14,95 \pm 0,47$  g/L. Já a temperatura de 55 °C houve um pequeno decréscimo em relação a temperatura ótima, quantificando-se  $12,48 \pm 0,02$  g/L de lactulose.

A Tabela 4.3 resume os valores encontrados para a produção lactulose nos experimentos realizados para escolha da melhor temperatura. Pode-se observar que a produtividade e rendimento mais elevados alcançados foram de 29,9 g/L.h e 44,8 g de lactulose/g de lactose, respectivamente, a 50 °C. Conclui-se, portanto, que é a temperatura ótima para produção de lactulose pela enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, sendo empregada nos experimentos seguintes.

Tabela 4.3. Influência de diferentes temperaturas na produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase livre de *K. lactis* em meio sintético a pH 7, carga enzimática de 5 U/mL e 100 rpm em até 2 h de reação.

| Temperatura (°C) | Concentração máxima de lactulose (g/L) | Produtividade (g/L.h) | Rendimento % (g de lactulose/g de lactose) |
|------------------|--|-----------------------|--|
| <b>37</b>        | 10,57 ± 0,16                           | 10,6                  | 17,3                                       |
| <b>45</b>        | 11,27 ± 0,43                           | 22,5                  | 18,7                                       |
| <b>50</b>        | 14,95 ± 0,47                           | 29,9                  | 24,1                                       |
| <b>55</b>        | 12,48 ± 0,02                           | 12,5                  | 20,2                                       |
| <b>60</b>        | -                                      | -                     | -  |

Analizando os resultados apresentados na Figura 4.12-C, nota-se que a produção de lactulose varia de forma gradual de acordo com a variação da temperatura, isto é, com o seu aumento ou diminuição. A 60 °C os valores são condizentes, já que a enzima foi inativada, não se observando produção de lactulose. No entanto, quando se volta a atenção para a temperatura de 50 °C, na qual obteve-se a maior produção de lactulose, nota-se que não foi a temperatura onde observou-se a maior concentração de lactose hidrolisada. As temperaturas mais baixas ou superiores a 50 °C notou-se que a produção de lactulose foi menor, indicando que a síntese de lactulose foi significativamente afetada pela temperatura. A hidrólise completa de lactose (primária) usando  $\beta$ -galactosidase é obtida quando a água atua como um nucleófilo para as porções de galactosil produzidas (o que pode melhor ser observado na Figura 2.5). A hidrólise primária produz uma molécula de galactose e glicose para cada molécula de lactose. Durante a hidrólise da lactose, no entanto, a própria lactose também pode atuar como um acceptor (MAHONEY, 1998), podendo produzir, assim, galacto-oligossacarídeos (GOS). A competição entre a água e a lactose pode influenciar notavelmente a seletividade da reação: para hidrólise primária ou transgalactosilação de GOS, sendo notável a influência da temperatura nos experimentos realizados.

Liao *et al.* (2016), realizando experimentos com uma  $\beta$ -galactosidase de genes de *Lactobacillus plantarum* expressa em *Escherichia coli*, encontraram, dentre as temperaturas avaliadas (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C), que a reação conduzida a 50

°C foi a que mais favoreceu a síntese de lactulose a partir de lactose e frutose, e que as taxas de produção variaram significativamente, dependendo da temperatura utilizada. Assim como no presente estudo, a concentração máxima de lactulose, 14,37 g/L, foi obtida quando a temperatura reacional utilizada foi 50 °C.

No estudo realizado por Kim, Park e Oh (2006), foi utilizada uma  $\beta$ -galactosidase termostável de *Sulfolobus solfataricus* a seguintes temperaturas: 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C. Eles notaram que, a temperaturas inferiores a 80 °C, o aumento na temperatura leva a uma reação de transgalactosilação mais rápida, resultando em um aumento na produção de lactulose, chegando a seu máximo a 80 °C.

Num contexto geral, o processo enzimático utiliza temperaturas brandas em relação ao processo químico tradicional de produção de lactulose, o que pode ser interessante e desejável em relação à economia energética que isso pode trazer. Assim, os resultados encontrados nos presentes experimentos utilizando temperaturas variadas para a produção de lactulose são considerados satisfatórios.

#### **4.2.3. Efeito da carga enzimática**

Após avaliar a razão de lactose e frutose, a concentração total desses constituintes e a temperatura ideal para a produção de lactulose no processo utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, decidiu-se verificar a influência da concentração da carga enzimática na produção de lactulose, a qual foi avaliada de 1 a 12 U/mL (utilizando as condições selecionadas previamente, que foram razão lactose/frutose de 15:30% (m/v), concentração total de substrato de 200 g/L e temperatura de 50 °C. A Figura 4.13 mostra a influência das cargas enzimáticas citadas na hidrólise de lactose.

Utilizando as cargas enzimáticas de 1 ou 2 U/mL, a concentração de lactose hidrolisada teve valores similares, alcançando 26,76% e 29,71%, respectivamente. Utilizando a carga enzimática de 3 U/mL o valor de hidrólise da lactose presente foi de 39,31%. A partir da carga enzimática de 4 U/mL notou-se uma maior utilização de lactose (53,94%). A partir dessa, a hidrólise ultrapassou 50%, como observado na Figura 4.14. Além disso, notou-se que a conversão da lactose em glicose e galactose aumentou com o aumento da carga enzimática utilizada.

Figura 4.13. Influência da carga enzimática na hidrólise da lactose a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) e concentração total de substratos 200g/L. Cargas enzimáticas: (■) 1 U/mL, (●) 2 U/mL, (▲) 3 U/mL, (▼) 4 U/mL, (◀) 5 U/mL, (▶) 6 U/mL, (◆) 7 U/mL, (◆) 8 U/mL, (◆) 9 U/mL, (★) 10 U/mL, (●) 12 U/mL.

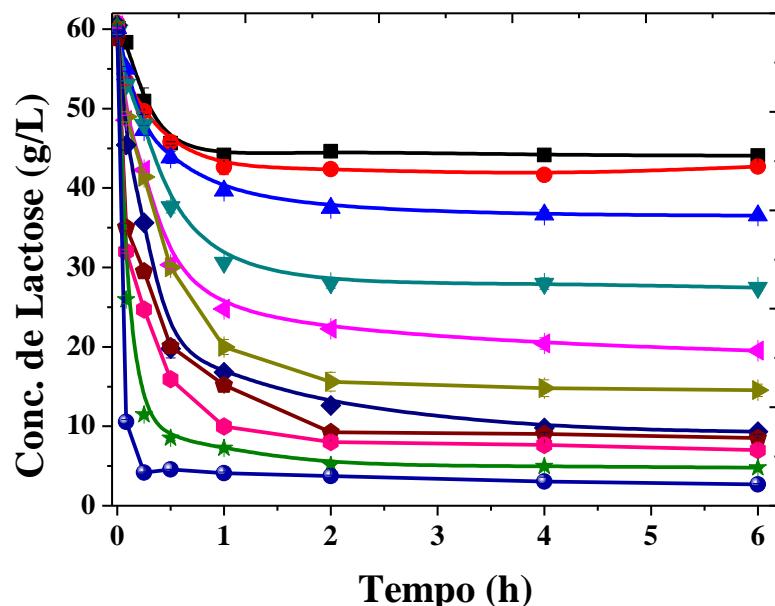
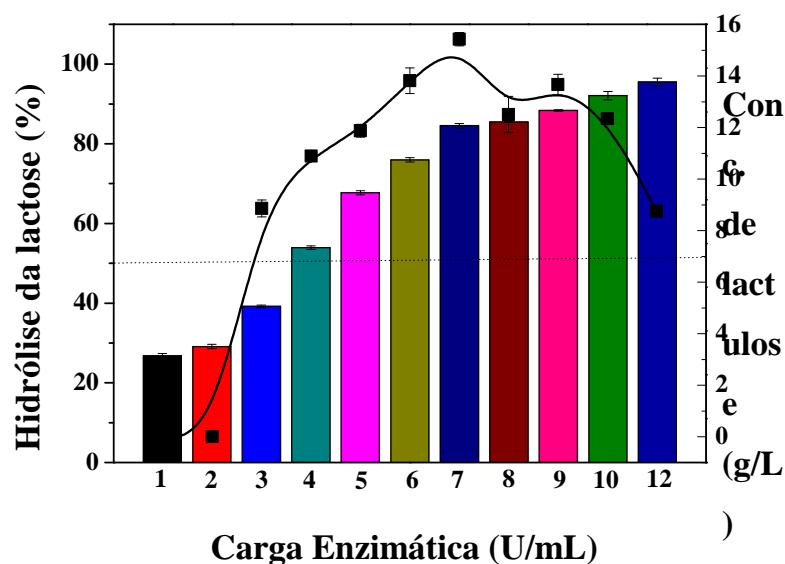


Figura 4.14. Lactose hidrolisada (%) em relação a variação da carga enzimática empregada da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e produção de lactulose correspondente (linha com quadrados). Condições reacionais: 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) e concentração total de substratos 200g/L.

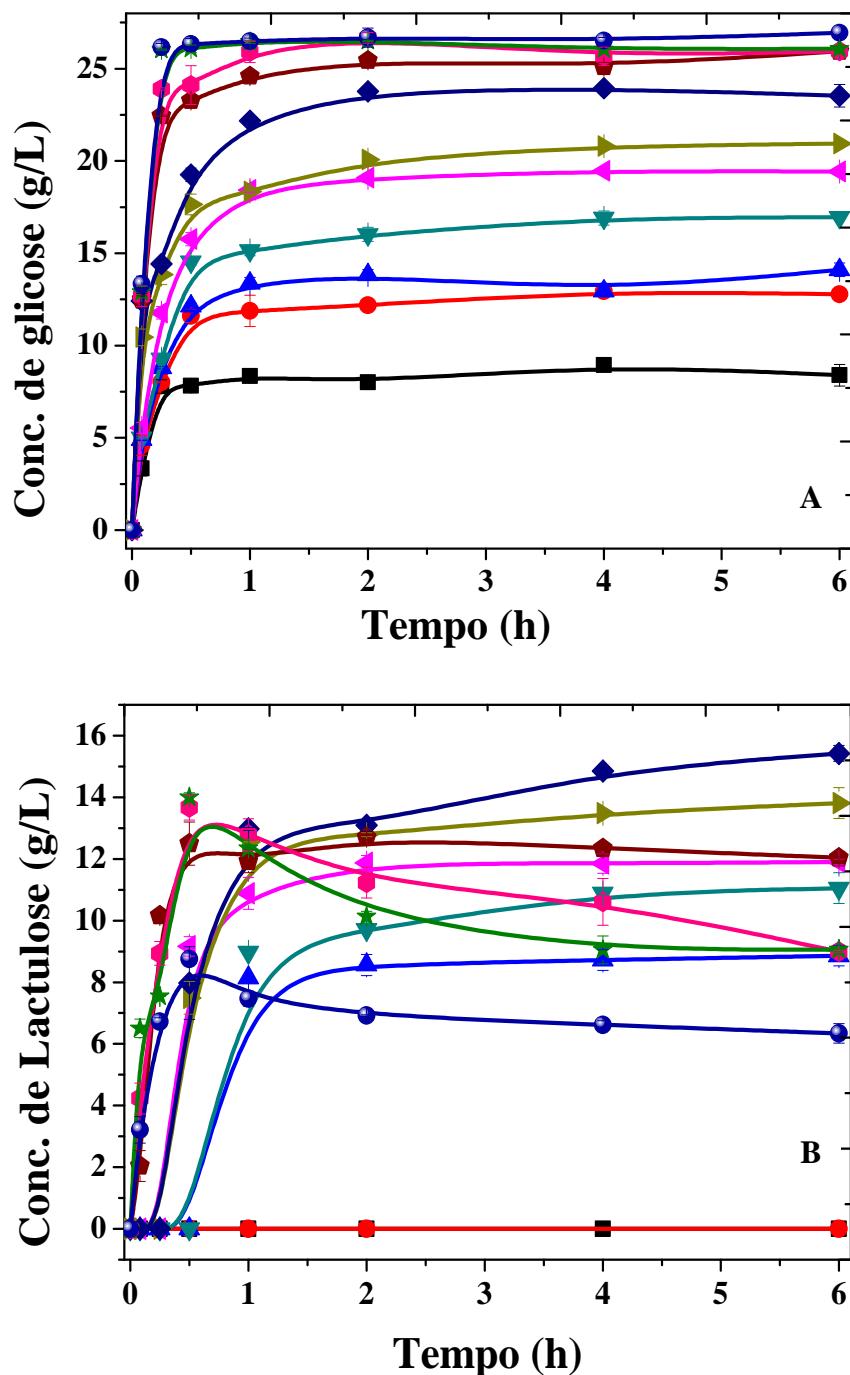


A partir dos valores obtidos, percebe-se que entre as cargas de 3 e 7 U/mL, a hidrólise de lactose foi praticamente logarítmica, sendo de 84,56% o seu consumo na reação nessa última carga enzimática citada. Nas concentrações enzimáticas de 8, 9, 10 e 12 U/mL o ritmo de consumo da lactose foi reduzido, contudo ainda seguiu de forma gradual, sendo o ápice do consumo de lactose evidenciado, portanto, na carga enzimática de 12 U/mL, correspondendo a 95,50%. Assim, evidencia-se que, à medida que a carga enzimática foi aumentada, foi possível hidrolisar mais lactose no meio reacional.

A Figura 4.15 mostra a produção de glicose e lactulose utilizando as distintas cargas enzimáticas. Observa-se um comportamento que condiz com o consumo da lactose na reação, ou seja, a medida que se incrementou a carga enzimática oferecida na reação, aumentou-se a produção de glicose, corroborando com o perfil da porcentagem de conversão da lactose citado anteriormente (Figura 4.15-A). Nesse contexto, a menor concentração de glicose produzida,  $8,94 \pm \text{g/L}$ , foi onde se utilizou uma carga enzimática de 1 U/mL. Já a maior quantidade de glicose,  $26,95 \pm \text{g/L}$ , foi produzida quando se empregou uma carga de 12 U/mL, sendo essa concentração alcançada 3 vezes superior em relação ao obtido quando se utilizou a menor carga enzimática, reforçando que o aumento da carga enzimática leva ao aumento das reações de hidrólise da lactose.

No que diz respeito à produção de lactulose, cujo resultados estão apresentados na Figura 4.15-B, nota-se que quando foi adicionado a concentração de 1 ou 2 U/mL, não se produziu lactulose a partir do meio reacional. A partir de 3 U/mL iniciou-se a produção de lactulose, com máximo de 8,86 g/L nessa concentração. Com a adição de 4 U/mL de enzima ao meio foi produzido 11,05 g/L de lactulose. A 5 e 6 U/mL produziu-se 11,87 g/L e 13,42 g/L, respectivamente. À carga enzimática de 7 U/mL foi sintetizada a maior quantidade de lactulose, 15,42 g/L e, a partir dessa concentração, os valores de lactulose obtidos foram reduzidos. Nota-se que a partir de cargas enzimáticas acima de 7 U/mL a produção de lactulose não foi favorecida, ocorrendo a redução da produção. Por exemplo, quando se adicionou a carga de 12 U/mL ao meio reacional, a quantidade máxima de lactulose produzida foi de 8,75 g/L, ou seja, uma redução de 43,3% do valor máximo obtido a 7 U/mL, que foi  $15,42 \pm 0,26$ .

Figura 4.15. Influência da carga enzimática de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* na produção de glicose (A) e lactulose (B) a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) e concentração total de substratos 200 g/L Cargas enzimáticas: (■) 1 U/mL, (●) 2 U/mL, (▲) 3 U/mL, (▼) 4 U/mL, (◀) 5 U/mL, (►) 6 U/mL, (◆) 7 U/mL, (◆) 8 U/mL, (●) 9 U/mL, (★) 10 U/mL, (●) 12 U/mL.



A Tabela 4.4 mostra os valores de rendimento e produtividade obtidos nesses experimentos. A maior produtividade, 78,3 g/L.h, foi obtida quanto se utilizou a

carga enzimática de 10 U/mL, contudo o rendimento (g de lactulose produzido por g de lactose consumida) foi de 20,4%, sendo esse rendimento inferior ao observado quando a carga enzimática foi de 7 U/mL, com rendimento de 25,5%. Diante do constatado, 7 U/mL corresponde a carga enzimática na qual se obteve a maior produção e maior rendimento, sendo selecionada para os experimentos posteriores.

Tabela 4.4. Influência da carga enzimática nos parâmetros de produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase utilizando meio sintético com lactose e frutose a 50 °C, pH 7, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v) e concentração total de substratos 200 g/L.

| Carga enzimática<br>(U/mL) | Concentração<br>máxima de<br>lactulose (g/L) | Produtividade<br>(g/L.h) | Rendimento % (g de<br>lactulose/g de<br>lactose) |
|----------------------------|--|--------------------------|--|
| 1                          | 0,00 ± 0,00                                  | 0,0                      | 0,00   |
| 2                          | 0,00 ± 0,00                                  | 0,0                      | 0,00   |
| 3                          | 8,86 ± 0,33                                  | 8,1                      | 14,7   |
| 4                          | 10,89 ± 0,07                                 | 9,0                      | 18,3   |
| 5                          | 11,87 ± 0,25                                 | 18,3                     | 19,6   |
| 6                          | 13,48 ± 0,11                                 | 15,0                     | 22,3   |
| 7                          | 15,42 ± 0,26                                 | 16,0                     | 25,5   |
| 8                          | 12,70 ± 0,06                                 | 41,0                     | 21,6   |
| 9                          | 13,67 ± 0,41                                 | 51,0                     | 22,7   |
| 10                         | 14,00 ± 0,04                                 | 78,3                     | 20,4   |
| 12                         | 8,75 ± 0,20                                  | 38,7                     | 14,6   |

O observado quanto à concentração enzimática está ligado ao fato que existe uma taxa máxima na qual certa quantidade de enzima pode catalisar uma reação específica. Apenas quando a concentração de substrato é elevada, esta taxa máxima pode ser alcançada. Sob condições de alta concentração de substrato, a enzima está em saturação, isto é, seus sítios ativos estão todos ocupados por moléculas de substrato ou produto. Nesta condição, um aumento na concentração de substrato não afetará a taxa de reação porque todos os sítios ativos já estarão sendo utilizados. Em um determinado tempo, algumas das moléculas de enzima poderão estar inoperantes por falta de

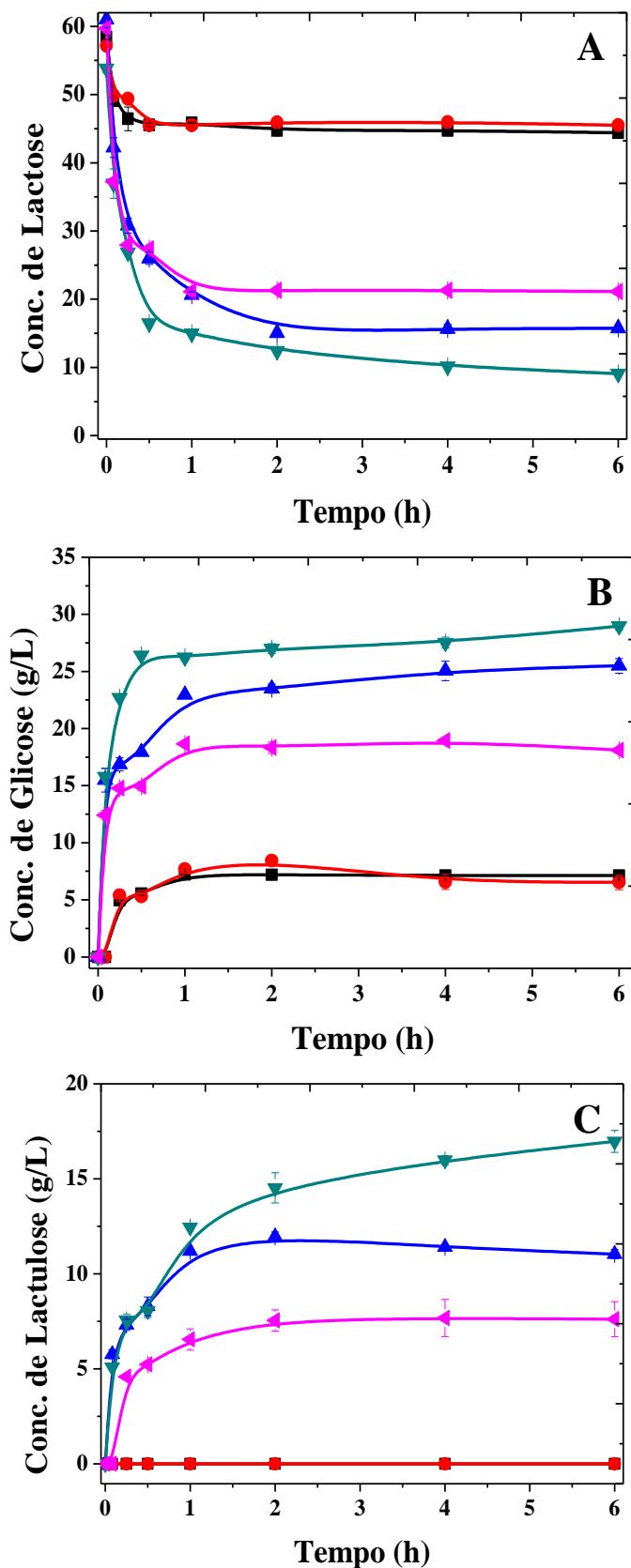
substrato, assim, a velocidade de reação será influenciada pela concentração de substrato.

Outros pesquisadores avaliaram também a importância da carga enzimática na produção de lactulose. Por exemplo, Kim, Park e Oh (2006) avaliaram as cargas enzimáticas de 1, 2, 3, 5 e 7 U/mL e observaram que a produção inicial máxima foi em 5 U/mL. Abaixo de 3 U/mL a produção de lactulose aumentou com o decorrer do tempo reacional. Liao *et al.* (2016) avaliaram as concentrações enzimáticas de 0,5, 1, 2 e 3 U/mL de  $\beta$ -galactosidase de *Lactobacillus plantarum* FMNP01 geneticamente modificada. A produção mais alta ( $15,14 \pm 1,69$  g/L) e rendimento de lactulose ( $37,85 \pm 4,22$  mg de lactulose/ g de lactose) foram observados à concentração de 1 U/mL. Diminuindo a carga enzimática para 0,5 U/mL ou aumentando para 3 U/mL, observou-se nitidamente a redução na produção e no rendimento de lactulose, sugerindo que a transformação de frutose é dependente da concentração da enzima. Comportamento semelhante foi encontrado no presente estudo, onde o aumento da produção de lactulose aumentou gradualmente, chegando ao máximo em 7 U/mL, e após essa faixa a produção foi diminuída, evidenciando que existe uma concentração ideal para a produção de lactulose. Song *et al.* (2013), estudando a otimização da síntese de lactulose a partir de lactose do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase e glicose isomerase imobilizadas, concluíram que, para se alcançar a concentração máxima de 7,68 g/L de lactulose, necessita-se empregar 12 U/mL de  $\beta$ -galactosidase e 60 U/mL de glicose isomerase.

#### **4.2.4. Efeito do pH**

Após a seleção da razão de lactose/frutose (15%/30% m/v), concentração inicial de substrato (200 g/L), temperatura ótima para a produção de lactulose, que foi de 50 °C, e da carga enzimática, que foi de 7 U/mL (alcançando-se produção de  $15,42 \pm 0,26$  g/L), avaliou-se o pH ideal para a sua síntese. A Figura 4.16 mostra a concentração de lactose hidrolisada e produção de glicose e lactulose na reação mediante a variação do pH (4, 5, 6, 7 e 8).

Figura 4.16. Influência do pH na hidrólise da lactose (A), produção de glicose (B) e lactulose (C) por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em meio reacional sintético a 50°C, razão lactose/frutose de 15/35% (m/v), concentração total de substratos 200g/L e 7 U/mL. pH: 4 (■), 5 (●), 6 (▲), 7 (▼) e 8 (◀).



Observa-se que em pH mais ácidos ocorreu uma menor conversão do substrato, sendo os perfis de hidrólise de lactose a pH 4 e pH 5 similares, convertendo-se apenas cerca de 14% e 20%, respectivamente (Figura 16-A). A pH 8 houve uma maior utilização de lactose em relação aos pH 4 e 5, mostrando que a enzima é mais afetada em pH ácidos do que em pH acima da neutralidade, alcançando-se, nesse pH, uma conversão de lactose de cerca de 65% da quantidade inicial. No entanto, os melhores resultados em relação ao consumo de lactose foram observados nos pH 6 e 7, que tiveram perfis similares. A pH 6, 74% da lactose presente no meio foi convertida, resultado aproximadamente 5,2 vezes superior de quando se utilizou pH 4 e cerca de 3,7 vezes superior de quando se empregou pH 5 para o meio reacional. Contudo, o pH 7 foi o que mais favoreceu o consumo de lactose, proporcionando a conversão de 83% desse substrato na reação. Esses resultados estão de acordo com a produção de glicose observada na Figura 4.16-B, na qual, pode-se constatar que, nos valores de pH mais ácidos, 4 e 5, a liberação de glicose no meio foi reduzida, sendo a concentração máxima atingida de  $7,21 \pm 0,03$  g/L e  $7,69 \pm 0,32$  g/L, respectivamente. Já a pH 8, 18,94 g/L de glicose foram produzidos. Em pH 6 e 7 o perfil foi o oposto em relação ao consumo de lactose, obtendo-se, portanto, as maiores concentrações de glicose, que foram de 25,49 g/L e 28,97 g/L, respectivamente.

A variação do pH também se mostrou uma variável importante em relação a produção de lactulose (Figura 4.16-C). Nos pH 4 e 5 não houve a produção de lactulose. Já a pH 8 observou-se uma pequena produção, atingindo a concentração de 7,67 g/L. A pH 6 a produção de lactulose alcançada foi de 11,96 g/L, o que evidencia que a pH mais próximo a neutralidade a enzima  $\beta$ -galactosidase teve melhor atuação para a produção de lactulose. A produção máxima de lactulose foi de 16,97 g/L, observada quando se empregou pH 7 na reação.

A Tabela 4.5 apresenta a produção, produtividade volumétrica e rendimento de lactulose nos diferentes pH avaliados. A maior produtividade, 7,3 g/L.h, foi alcançada a pH 7, seguida pela produtivida de 5,9 g/L.h, a pH 6, e 3,7 g/L.h, a pH 8.

Tabela 4.5. Influência do pH nos parâmetros de produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase utilizando meio sintético com lactose e frutose a 50 °C, 7 U/mL e 100 rpm.

| pH       | Concentração máxima de lactulose (g/L) | Produtividade (g/L.h) | Rendimento % (g de lactulose/g de lactose) |
|----------|--|-----------------------|--|
| <b>4</b> | ND*                                    | ND                    | ND   |
| <b>5</b> | ND                                     | ND                    | ND   |
| <b>6</b> | 11,95 ± 0,25                           | 5,9                   | 19,6                                       |
| <b>7</b> | 16,97 ± 0,58                           | 7,3                   | 31,5                                       |
| <b>8</b> | 7,67 ± 0,98                            | 3,7                   | 12,8                                       |

\*ND: Não detectado.

Na isomerização de lactose em lactulose, o pH da solução caracteriza a concentração de prótons e desempenha um papel muito importante na estabilidade da enzima, podendo ser considerado como um dos fatores mais influentes na reação de isomerização da lactose em lactulose. Por esta razão, vários autores avaliaram o efeito do pH do meio. A Tabela 4.6 compara os resultados obtidos no presente trabalho com valores mostrados na literatura para a produção de lactulose em diferentes pH por  $\beta$ -galactosidases de diferentes origens.

Tabela 4.6. Estudos da produção enzimática de lactulose por  $\beta$ -galactosidase em diferentes pH.

| Micro-organismo<br>de origem      | pH  | Lactulose<br>(g/L) | Produtividade<br>(g/L.h) | Rendimento<br>(%) | Referências                                 |
|-----------------------------------|-----|--------------------|--------------------------|-------------------|---|
| <i>K. lactis</i>                  | 7   | 16,97              | 16                       | 32                | Esse trabalho                               |
| <i>Pyrococcus furiosus</i>        | 5   | 15                 | 8,21                     | 44                | Mayer <i>et al.</i><br>(2004)               |
| <i>Aspergillus oryzae</i>         | 4,5 | 65                 | NR*                      | 32                | Adamczak,<br>Charubin e<br>Bednarski (2009) |
| <i>Aspergillus oryzae</i>         | 5   | 10                 | 5,5                      | 30                | Mayer <i>et al.</i><br>(2004)               |
| <i>Aspergillus oryzae</i>         | 4,5 | 33                 | NR*                      | 27,5              | Guerrero <i>et al.</i><br>(2011)            |
| <i>S. solfataricus</i>            | 6   | 50                 | 8,3                      | 12,5              | Kim, Park e Oh<br>(2006)                    |
| <i>Saccharomyces<br/>fragilis</i> | 7,2 | 9                  | NR                       | 7,4               | Vaheri e<br>Kaupinnen (1978)                |
| <i>L. acidophilus</i>             | 6,6 | 25                 | 3,6                      | 6,3               | Hashem <i>et al.</i><br>(2013)              |
| <i>K. lactis</i>                  | 7   | 20                 | 6,8                      | 5                 | Lee, Kim e Oh<br>(2004)                     |
| <i>K. lactis</i>                  | 7,5 | 8                  | 2,9                      | 3,2               | Hua <i>et al.</i> (2013)                    |
| <i>K. lactis</i>                  | 6,7 | 10,4               | 4,2                      | 8,7               | Khatami <i>et al.</i><br>(2014)             |

\*NR: não reportado

Kim, Park e Oh (2006) observaram que, dentre os pH testados, 4, 5, 6, 7 e 8, o que mais contribuiu para a atuação da  $\beta$ -galactosidase de *Sulfolobus solfataricus* foi o pH 6, no entanto, a pH 5 e 7, as atividades enzimáticas mostraram-se acima de 90%. Em geral, pode-se concluir que a maioria dos estudos (KIM; PARK; OH, 2006; LEE; KIM; OH 2004; KHATAMI *et al.* (2014)) tem indicado que em pH próximo à neutralidade à produção de lactulose é favorecida, assim como o identificado no presente estudo. A estabilidade de  $\beta$ -galactosidases depende fortemente do pH, uma vez que essa enzima somente é estável e ativa em pH compreendido entre 6 e 8 (KUBY; LARDY, 1953), sendo observada uma rápida e irreversível perda da atividade para valores de pH inferiores a 5,5 (HESTRIN; FEINGOLD; SCHRAMM, 1955).

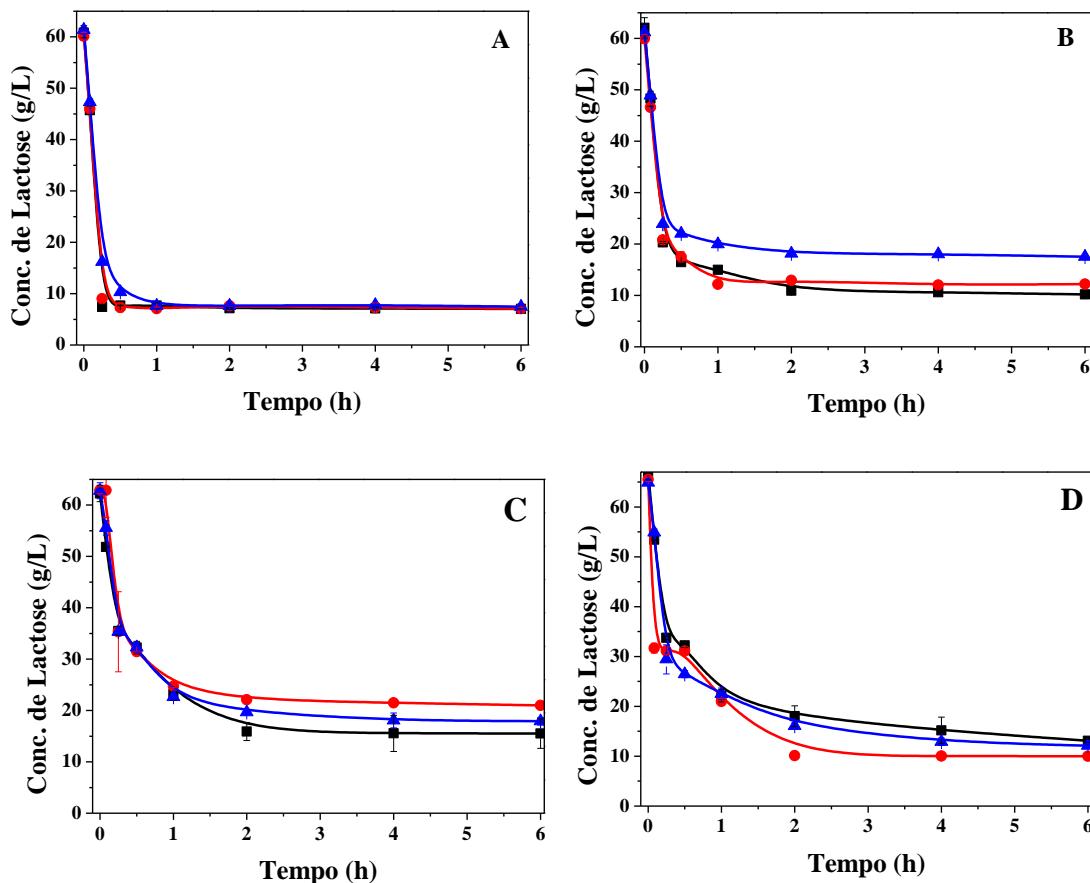
#### **4.2.5. Influência da presença de íons metálicos**

Por último, avaliou-se a influência de íons na produção de lactulose. Os cátions metálicos  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , bem como a variação da concentração dos mesmos, em 0,1%, 0,01% e 0,001% foi analisada. A influência de tais íons é um dos fatores mais estudados por afetarem a atividade e a estabilidade da  $\beta$ -galactosidase.

Na Figura 4.17 (A-D) pode-se observar os perfis de consumo da lactose quando se utilizaram as diferentes concentrações dos cátions analisados. De modo geral, observou-se que as variações nas suas concentrações não foram significantes para a hidrólise de lactose, contudo, algumas diferenças foram observadas quando se muda o tipo de cátion adicionado. Por exemplo, quando se utilizou  $Mn^{2+}$  ocorreu a utilização máxima de lactose, atingindo 88,4%. Já taxas inferiores de hidrólise foram observadas quando se adicionou  $Ca^{2+}$  ao meio, atingindo apenas 70,1%. Em relação ao  $Zn^{2+}$  e ao  $Mg^{2+}$  adicionados, observou-se um consumo máximo de 84,7% e 83,6%, respectivamente.

Estudos têm mostrado que sua presença pode influenciar nessa síntese, devido à possível dependência da presença de alguns íons (mono ou divalentes) para a atuação de  $\beta$ -galactosidases (LIU *et al.*, 2015). Em geral,  $\beta$ -galactosidases oriundas de fungos são reportadas como menos dependentes desse efeito (MLICOVÁ; ROSENBERG, 2006), no entanto, alguns estudos têm mostrado a importância de alguns íons metálicos na atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus* spp. (SEN; RAY; CHATTOPADHYAY, 2012). Sabe-se que a maneira como o metal se liga pode afetar a atividade da  $\beta$ -galactosidase e isso é fortemente dependente da fonte da enzima (CARDOSO *et al.*, 2017).

Figura 4.17. Influência de cátions na concentração de lactose hidrolisada por  $\beta$ -galactosidase em meio sintético a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v), concentração total de substratos 200g/L, 7 U/mL e pH 7. Cátions: (A):  $Mn^{2+}$ , (B)  $Mg^{2+}$ , (C)  $Ca^{2+}$  e (D)  $Zn^{2+}$ . Concentração do cátion: (■) 0,1%, (●) 0,01% e (▲) 0,001% (m/v).

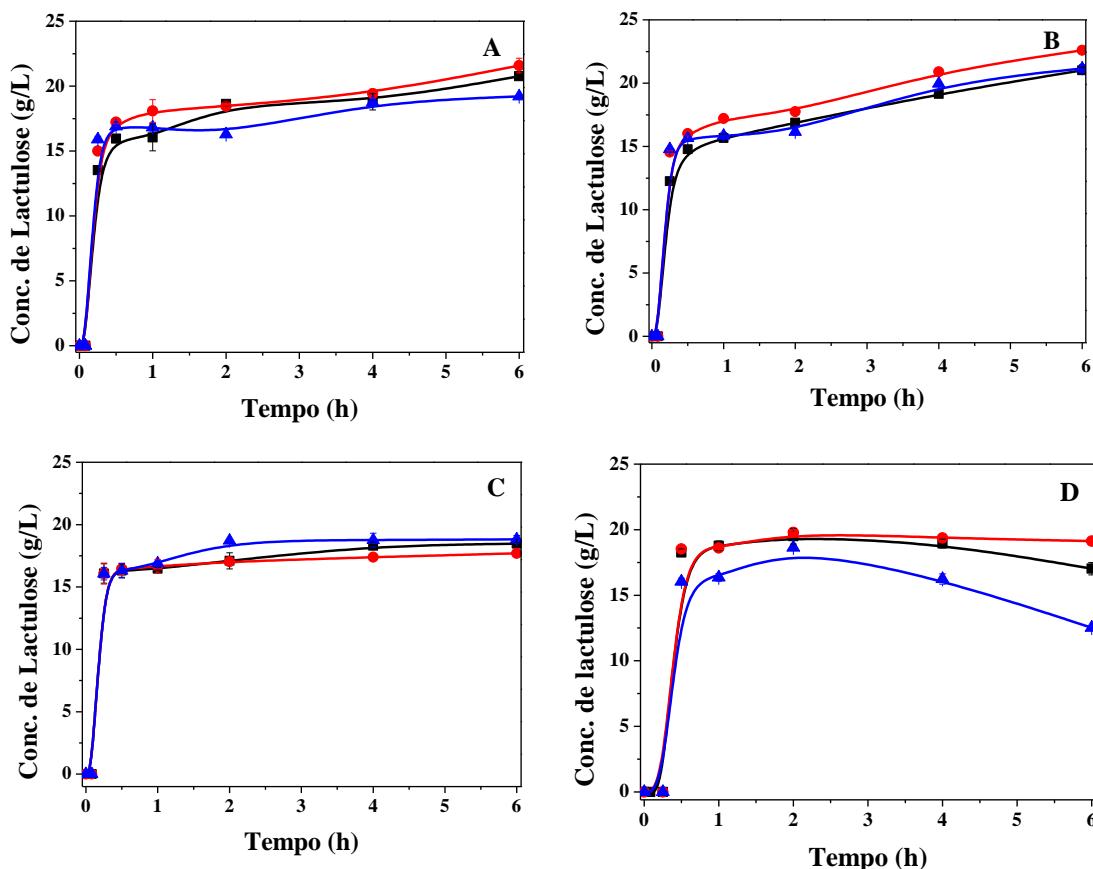


Na Figura 4.17 pode-se verificar que, apesar da variação entre os diferentes cátions utilizados, evidenciando uma influencia na conversão da lactose, as variações entre as concentrações utilizadas não foram discrepantes. O cátion com o qual se observou uma maior variação na hidrólise da lactose foi o  $Mg^{2+}$  (Figura 4.17 B), variando de 71,4%, quando se utilizou 0,001% de  $Mg^{2+}$ , a 84,7%, quando se utilizou a maior concentração (0,1%).

Em relação à produção de lactulose mediante a utilização da estratégia de se adicionar cátions ao meio reacional, pode-se observar na Figura 4.18 os perfis reacionais. A variação na produção de lactulose com a adição dos cátions, por exemplo, pelo período de até 2 h de reação, também não foi tão acentuada. A maior produção de lactulose, nesse tempo de análise, foi na concentração de 0,1% de  $Zn^{2+}$ , alcançando-se 19,5 g/L. Já a menor produção, 16,15 g/L, foi quando se empregou 0,001% de  $Mg^{2+}$ .

Por outro lado, quando se observa a Figura 4.18, após 2h de reação, houve um comportamento distinto ao observado nos testes conduzidos.

Figura 4.18. Lactulose produzida em relação aos cátions adicionados. (A):  $Mn^{2+}$ , (B)  $Mg^{2+}$ , (C)  $Ca^{2+}$  e (D)  $Zn^{2+}$ . Condições: 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v), concentração total de substratos 20v0g/L, carga enzimática de 7 U/mL e pH 7. Concentração de cátion: (■) 0,1%, (●) 0,01% e (▲) 0,001% (m/v).



Na Figura 4.18-A, que mostra a adição de  $Mn^{2+}$ , percebe-se que não houve grandes variações entre as três concentrações utilizadas, contudo, na concentração de 0,01%, foi onde observou-se a maior produção, 21,59 g/L, em 6 h de reação. Em relação à adição de  $Mg^{2+}$  (Figura 4.18-B), o perfil foi bastante parecido ao observado quando se adicionou  $Mn^{2+}$ , inclusive quando se compara a concentração na qual obteve-se a maior concentração de lactulose, que foi 0,01%, atingindo-se 22,59 g/L em 6 h de reação.

A adição de  $Ca^{2+}$ , em 6 h de reação (Figura 4.18-C), não proporcionou uma produção de lactulose tão elevada, atingindo-se 18,83 g/L na menor concentração

adicionada, 0,001%, o que sugere uma inibição à medida que se aumenta a concentração do cátion  $\text{Ca}^{2+}$ . Independentemente da origem da enzima, em todos os trabalhos consultados, é indicado que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  inibam o funcionamento da enzima  $\beta$ -galactosidase (GARMAN; COOLBEAR; SMART, 1996), enquanto os íons  $\text{Mg}^{2+}$  aumentam sua atividade. Estes últimos íons são essenciais para evitar a desativação em certos casos (GARMAN; COOLBEAR; SMART, 1996). Em relação a adição de  $\text{Zn}^{2+}$  (Figura 4.18-D), um comportamento distinto foi observado, visto que, a partir de 2 h de reação, a concentração de lactulose começou a reduzir em todas as concentrações do cátion adicionadas, acentuando esse comportamento na concentração de 0,001% de  $\text{Zn}^{2+}$ .

A Tabela 4.7 mostra os valores de produção máxima de lactulose (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (% de g de lactulose produzida por g de lactose consumida) para todas as concentrações de cátions utilizados. Com a adição de 0,01% de  $\text{Mn}^{2+}$  obteve-se a maior quantidade de lactulose sintetizada,  $22,59 \pm 0,11$  g/L, e avaliando os efeitos da adição de cátions na produção de lactulose, por teste de médias (Teste de Tukey), com nível de significância de 95%, observou-se que este resultado apresentou diferença significativa em relação aos demais cátions adicionados em quaisquer concentrações.

Tabela 4.7. Influência da adição de cátions nos parâmetros de produção máxima de lactulose (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (g de lactulose/g de lactose) por  $\beta$ -galactosidase em meio sintético a 50 °C, razão lactose/frutose de 15/30% (m/v), concentração total de substratos 200 g/L, carga enzimática de 7 U/mL e pH 7, em 2 h de reação.

| Parâmetros                       | Cátions (concentração em %) |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | $Mn^{2+}$                   |                   |                   | $Mg^{2+}$         |                   |                   | $Ca^+$            |                   |                   | $Zn^{2+}$         |                   |                   |
|                                  | <b>0,1</b>                  | <b>0,01</b>       | <b>0,001</b>      | <b>0,1</b>        | <b>0,01</b>       | <b>0,001</b>      | <b>0,1</b>        | <b>0,01</b>       | <b>0,001</b>      | <b>0,1</b>        | <b>0,01</b>       | <b>0,001</b>      |
| <b>Produção (g/L)*</b>           | 20,71 ±                     | 21,59 ±           | 19,21 ±           | 21,01 ±           | 22,59 ±           | 21,16 ±           | 18,47 ±           | 17,70 ±           | 18,83 ±           | 19,50 ±           | 19,78 ±           | 18,63 ±           |
|                                  | 0,11 <sup>a</sup>           | 0,56 <sup>b</sup> | 0,04 <sup>c</sup> | 0,22 <sup>a</sup> | 0,11 <sup>d</sup> | 0,31 <sup>b</sup> | 0,10 <sup>e</sup> | 0,24 <sup>f</sup> | 0,30 <sup>e</sup> | 0,60 <sup>c</sup> | 0,22 <sup>g</sup> | 0,12 <sup>e</sup> |
| <b>Produtividade<br/>(g/L.h)</b> | 54,13                       | 60,01             | 63,60             | 49,01             | 58,21             | 59,17             | 64,34             | 64,32             | 64,28             | 36,53             | 37,05             | 32,08             |
| <b>Rendimento (%)</b>            | 34,13                       | 35,90             | 31,30             | 33,86             | 37,70             | 34,57             | 29,66             | 28,14             | 29,98             | 29,11             | 30,19             | 28,71             |

\*Mesma letra não difere estatisticamente ( $p<0,05$ )

Por outro lado, a produção mais baixa foi encontrada ao se adicionar 0,01% de Ca<sup>2+</sup>, atingindo-se uma produção máxima de 17,70 ± 0,24 g/L, que também se mostrou significativamente diferente em relação as demais concentrações do cátion adicionadas (0,1 e 0,001%). Oposto à produção mínima observada, a maior produtividade, 64,34 g/L.h, foi alcançada com a adição de Ca<sup>2+</sup> na maior concentração (0,1%). Esse fato evidencia que, apesar de não ter sido eficaz na obtenção de uma maior produção de lactulose, o cátion Ca<sup>2+</sup> propiciou uma maior velocidade de síntese enzimática de lactulose. Em contrapartida, as menores produtividades foram notadas quando se adicionou o cátion Zn<sup>2+</sup>, sendo a mais baixa alcançada com a adição de 0,001% de Zn<sup>2+</sup>, que proporcionou uma produtividade de 32,08 g/L.h, valor 50,1% mais baixo que maior produtividade alcançada (com Ca<sup>2+</sup>). O rendimento mais elevado (37,70%) foi identificado com a adição de 0,01% de Mg<sup>2+</sup>, que corresponde também a maior produção. Já o menor rendimento foi de 28,14%, quando utilizado 0,01% de Ca<sup>2+</sup>.

A enzima β-galactosidase é uma glicosidase com 1023 aminoácidos (FOWLER; ZABIN, 1978) por cada subunidade da proteína tetramérica. Embora o substrato natural seja lactose, a enzima hidrolisa e transgalactosila uma variedade de β-D-galactopiranosídeos, sendo modelo para as glicosidases que atuam sobre os dissacarídeos. Geralmente, cátions monovalentes e bivalentes atuam na estrutura da enzima ou estão envolvidos na sua ligação com o substrato, podendo tornar essa mais atrativa eletrostaticamente (WHEATLEY *et al.*, 2015). Em betagalactosidases, a interação com cátions pode causar uma grande redução ou mesmo uma completa perda de atividade enzimática, exigindo que a seletividade seja mantida em um local dinâmico o suficiente para permitir a ligação e liberação do substrato, afetando assim as propriedades da enzima (WHEATLEY *et al.*, 2015).

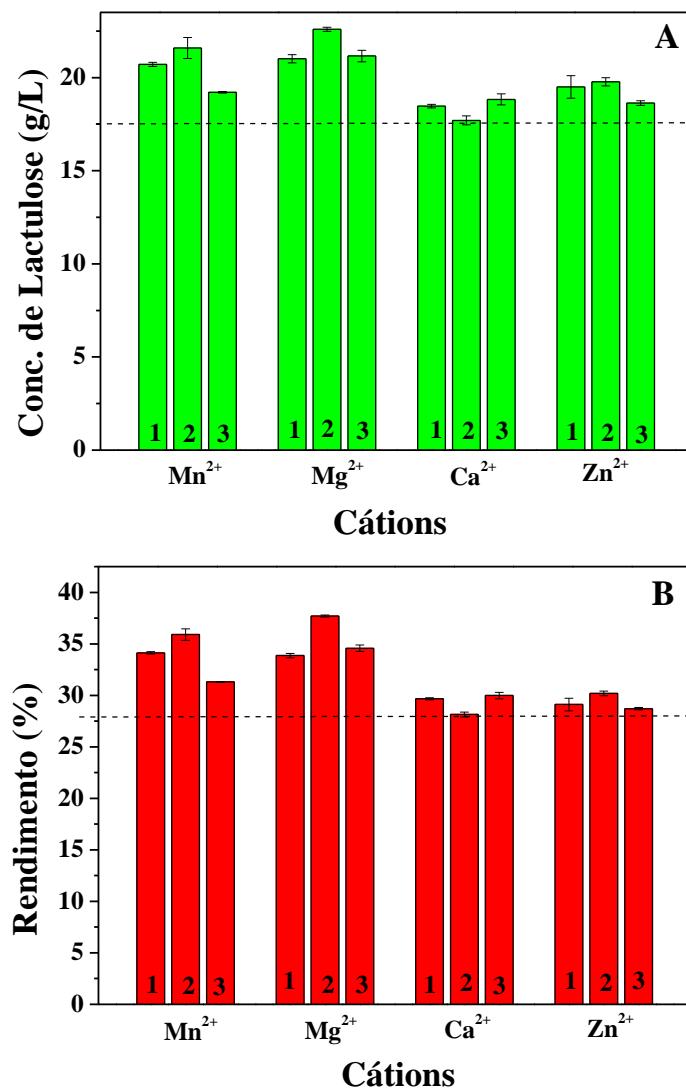
Os mecanismos exatos que regulam a especificidade por um dado íon e seu acoplamento à atividade enzimática ainda não foram completamente elucidados, além disso, o conhecimento desses mecanismos pode levar à capacidade de programar a especificidade iônica das enzimas a uma aplicação de grande interesse (PAGE; CERA, 2006). Cátions divalentes, como Mg<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>, não interagem diretamente com o substrato, porém interagem com regiões adjacentes do sítio catalítico Glu 461 (LO *et al.*, 2010) e, na ligação ao substrato, a principal função biológica destes cátions parece ser neutralizar a carga negativa nos grupos fosfato do substrato (WHEATLEY *et al.*, 2015)

Kim, Park e Oh (2006) investigaram o efeito de cátions divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ) na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Sulfolobus solfataricus* para a produção de lactulose. Nos testes que conduziram, cada cátion foi adicionado a uma concentração final de 0,1% na mistura reacional (contendo lactose e frutose). Com a adição de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , ou  $Co^{2+}$  observou-se quase os mesmos níveis de produção de lactulose que foram próximos ao teste com controle (sem adição de cátions). Em contraste, a adição de  $Ba^{2+}$  reduziu a produção de lactulose em 73% comparado com o teste controle.

Cardoso *et al.* (2017) avaliaram o efeito de diversos íons ( $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ ) na produção de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus lacticoffeatus*. Esses pesquisadores constataram que nem os íons mono, nem os divalentes, promoveram uma melhoria significativa na atividade hidrolítica. Além disso, a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi negativamente afetada pela presença de  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , resultando em um decréscimo de 6, 11, 21 e 43%, respectivamente, na atividade enzimática. Outros autores também relatam este efeito inibitório em  $\beta$ -galactosidases de *Aspergillus carbonarius* (EL-GINDY, 2003), *Aspergillus alliaceus* (SEN *et al.*, 2012) e *Penicillium multicolor* (TAKENISH *et al.*, 1983).

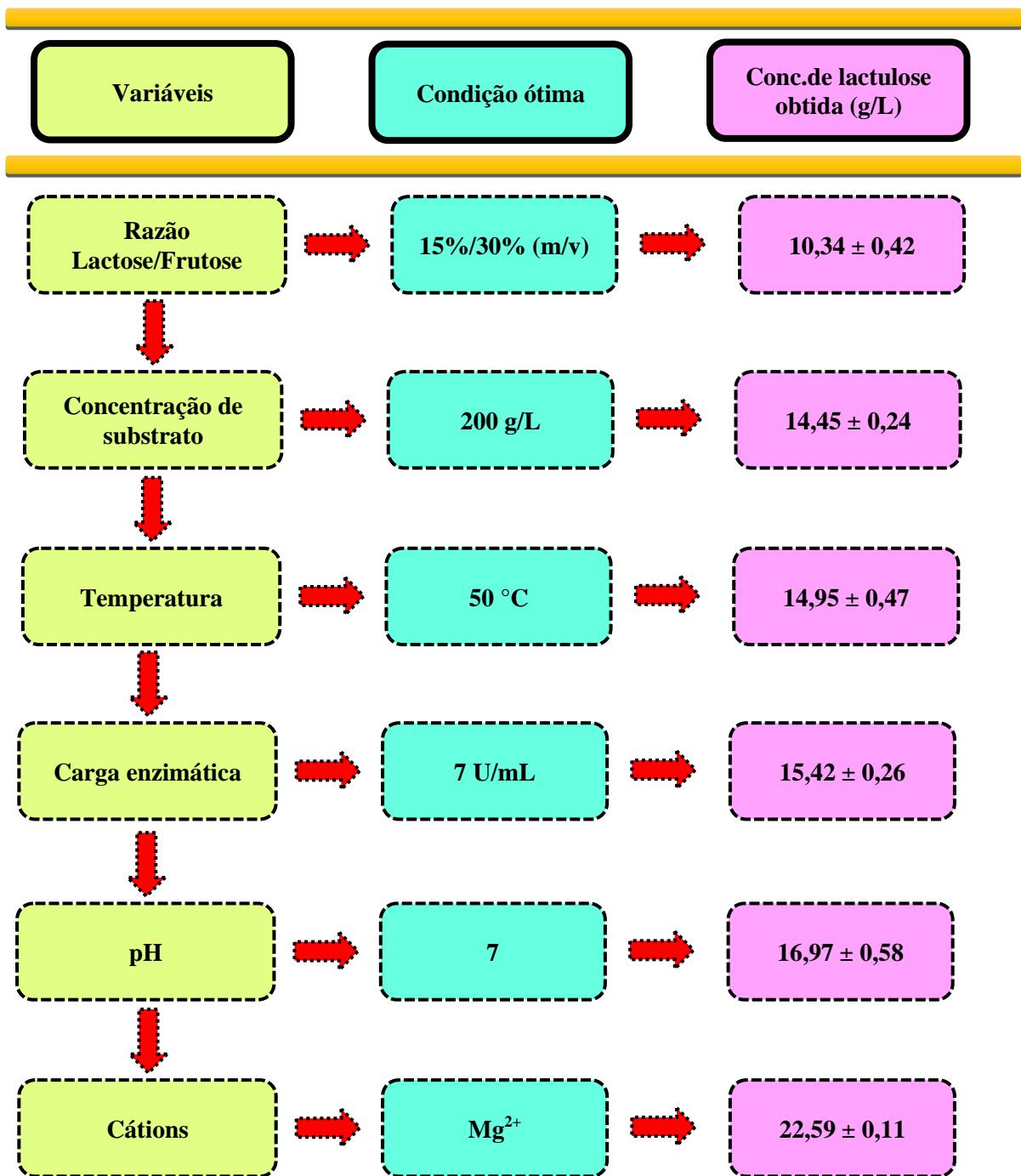
Diante dos resultados obtidos, observa-se que a concentração de 0,01% de  $Mg^{2+}$ , que proporcionou 22,59 g/L de lactulose e o maior rendimento, 37,70 %, favoreceu a produção de lactulose. Na Figura 4.19 os resultados para a produção (A) e rendimento (B) são apresentados em formato de barras para melhor visualização dos efeitos.

Figura 4.19. Produção máxima de lactulose (g/L) (A) e Rendimento (%) (B) em g de lactulose produzida por g de lactose consumida. Concentração do cátion utilizado (% m/v): (1) 0,1%, (2) 0,01% e (3) 0,001%. A linha tracejada representa a concentração da lactulose produzida sem a adição de íons.



A Figura 4.20 apresenta as melhores condições para a produção de lactulose com base nos estudos realizados para avaliação das condições ótimas.

Figura 4.20. Resumo das condições ótimas selecionadas para a produção de lactulose por via enzimática com  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* livre e em meio sintético.

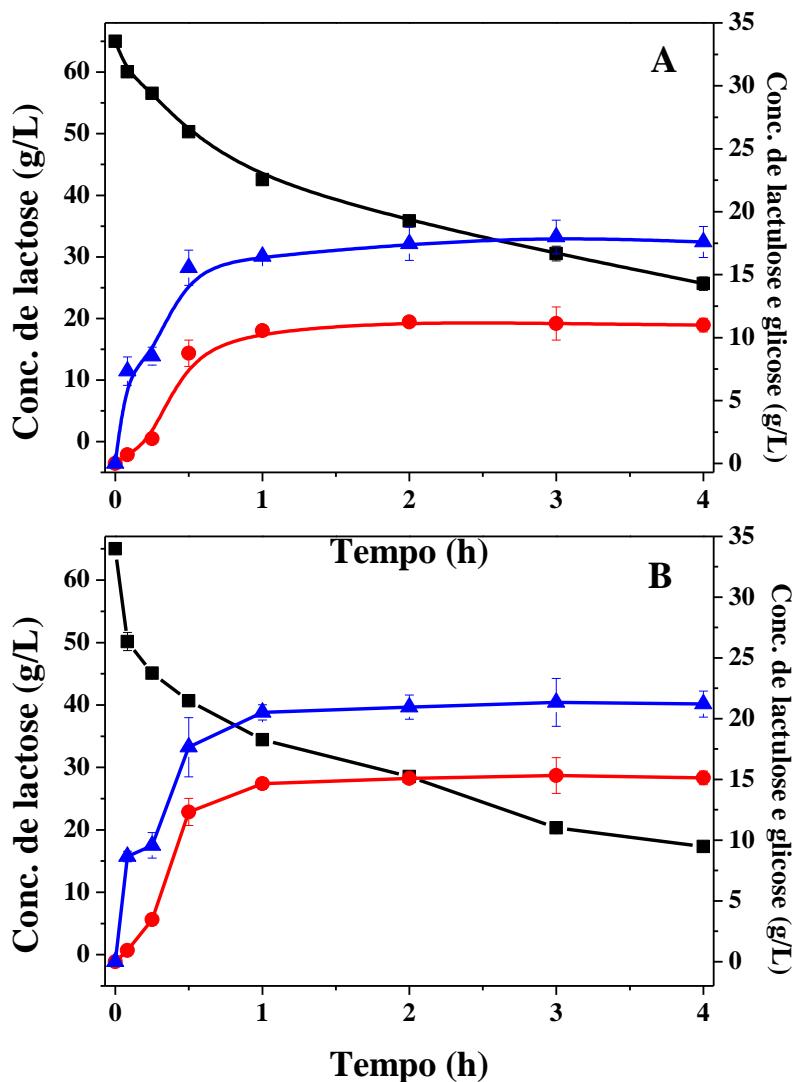


#### 4.3. Avaliação da produção de lactulose a partir de soro de leite

O desenvolvimento de tecnologias verdes e a reciclagem para economias viáveis é um dos passos críticos para a conservação e o uso sustentável dos recursos existentes (DEPLANCHE *et al.*, 2014). Nessa parte do estudo buscou-se a utilização do soro de leite para a produção de lactulose, o que tem potencial para ser uma alternativa promissora para a redução do despejo desse resíduo, agregando valor a essa matéria-prima. O uso de soro de leite como substrato da biossíntese da lactulose não só melhora o valor econômico do soro de leite, mas também, reduz o impacto deste no meio ambiente. O soro de leite é o principal subproduto da indústria de queijos e é causador de importantes problemas ambientais, uma vez que a sua eliminação é altamente contaminante (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

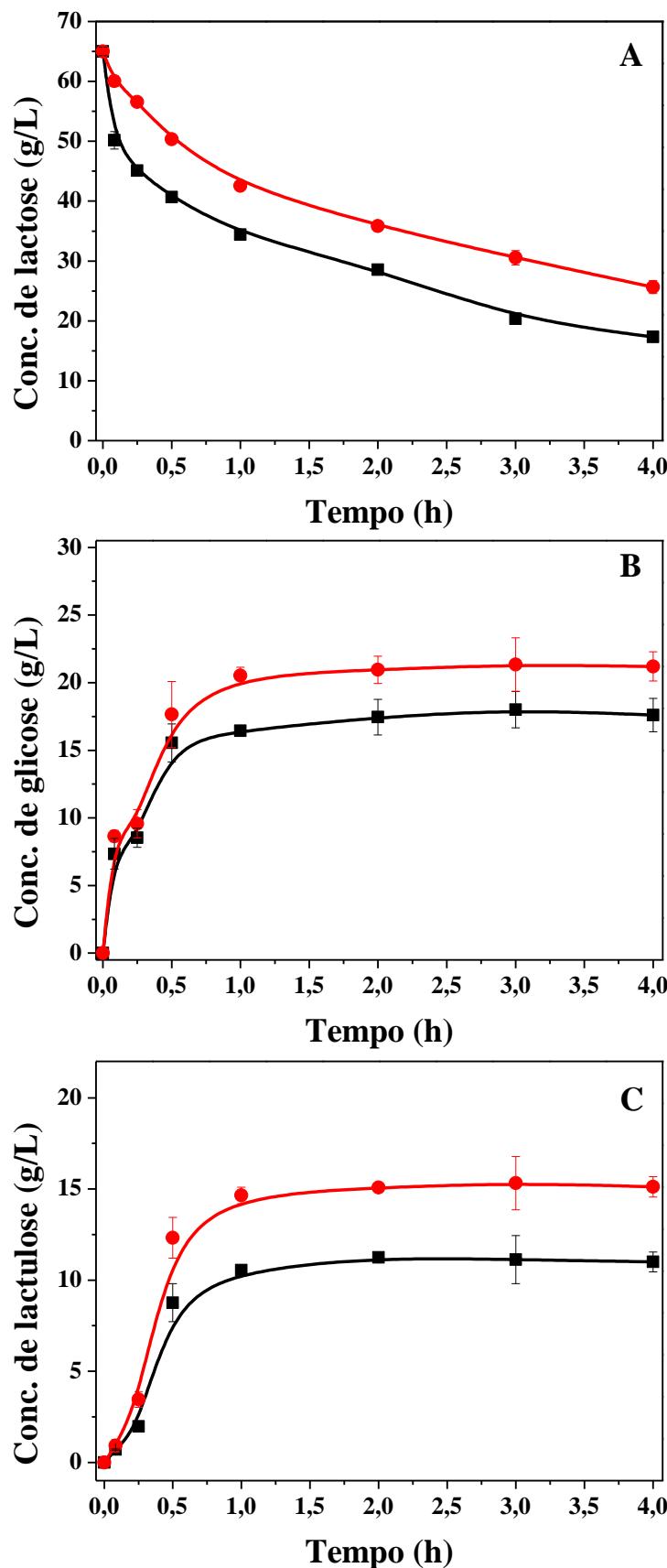
Devido a rica composição proteica do soro de leite (LIMA *et al.*, 2013), primeiramente verificou-se a necessidade de realizar um tratamento prévio neste para a precipitação de proteínas visando a síntese de lactulose. Para tal teste, inicialmente conduziu-se utilizando o soro de leite com a adição de frutose nas condições estabelecidas anteriormente (Figura 4.20) com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* na forma livre. Na Figura 4.21-A estão os resultados para o soro não tratado e na Figura 4.21-B os perfis de produção usando o soro pré-tratado. Observa-se que foi possível produzir lactulose nas duas condições, contudo há uma diferença nos perfis observados nas figuras citadas. Quando se utilizou a enzima livre no soro não tratado, nota-se que foi hidrolisada uma quantidade de lactose de cerca de 60,5%. Por outro lado, quando se precipita as proteínas do soro, cerca de 73,3% da lactose é hidrolisada na reação, ou seja, aproximadamente 13% a mais. Da mesma forma, a glicose também foi liberada em maiores concentrações, o que está de acordo com a reação de hidrólise da lactose pela enzima. No soro pré-tratado a quantidade de glicose foi de cerca de  $21,34 \pm 1,98$  g/L, já no que não passou pela precipitação de proteínas a concentração alcançou  $18,00 \pm 1,34$  g/L.

Figura 4.21. Produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase livre de *Kluyveromyces lactis* a partir do soro de leite não tratado (A) e tratado para precipitação de proteínas (B), razão lactose/frutose de 15/30% (m/v), concentração total de substratos 200 g/L, a 50 °C, carga enzimática 7 U/mL e pH 7. (■) lactose; (●) lactulose e (▲) glicose.



Na Figura 4.22 (A-C) separaram-se os resultados obtidos com o soro pré-tratado e tratado para melhor visualização das diferenças nas reações realizadas com a enzima livre. Pode-se notar nitidamente a diferença no uso dos dois tipos de soro de leite. Destaca-se a produção de lactulose (Figura 4.22-C). No soro não tratado a produção máxima de lactulose foi de  $11,25 \pm 0,07$  g/L, já no soro de leite pré-tratado a produção de lactulose foi cerca de 7% a mais, evidenciando a interferências das diversas proteínas no soro de leite na síntese enzimática de lactulose. Na Tabela 4.8 além da produção máxima de lactulose, apresenta-se a produtividade (g/L.h) e rendimento (%).

Figura 4.22. Hidrólise de lactose (A), produção de glicose (B) e produção de lactulose (C) por  $\beta$ -galactosidase livre de *Kluyveromyces lactis* a partir do soro de leite não tratado (■) e tratado (●) a 50 °C, pH 7, 150 rpm e carga enzimática de 7 U/mL de enzima.



Analisando-a, conclui-se que a produtividade de lactulose no soro pré-tratado foi cerca de 40,6% superior em relação a do soro não tratado. Já o rendimento (%) de produção de lactulose foi de 23,6% quando utilizou-se o soro tratado e apenas de 17,3% a partir do não tratado. Nota-se, por meio dos dados contidos na Tabela 4.8, que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) quando se utilizou o soro tratado e o soro não tratado para produção de lactulose, o que evidencia a necessidade de um pré-tratamento para a redução ou eliminação das proteínas presentes, que podem interferir na atividade enzimática.

Após a realização dos testes com a enzima livre, investigou-se a conversão do soro de leite (tratado e não tratado) com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada, buscando-se aumentar a eficiência do processo, devido as diversas vantagens apresentadas pelo processo de imobilização (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; ZAAK *et al.* 2017).

Tabela 4.8. Produção máxima (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (%) de lactulose usando a enzima  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada no soro de leite sem tratamento e no soro de leite pré-tratado.

| Enzima             | Meio reacional   | Produção máxima (g/L) | Produtividade (g/L.h) | Rendimento (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| <b>Livre</b>       | Soro Não tratado | $11,25 \pm 0,07^a$    | 17,5                  | 17,3           |
|                    | Soro tratado     | $15,32 \pm 1,46^b$    | 24,6                  | 23,6           |
| <b>Imobilizada</b> | Soro Não tratado | $13,32 \pm 1,03^a$    | 16,6                  | 20,3           |
|                    | Soro tratado     | $17,32 \pm 0,88^b$    | 31,5                  | 26,7           |

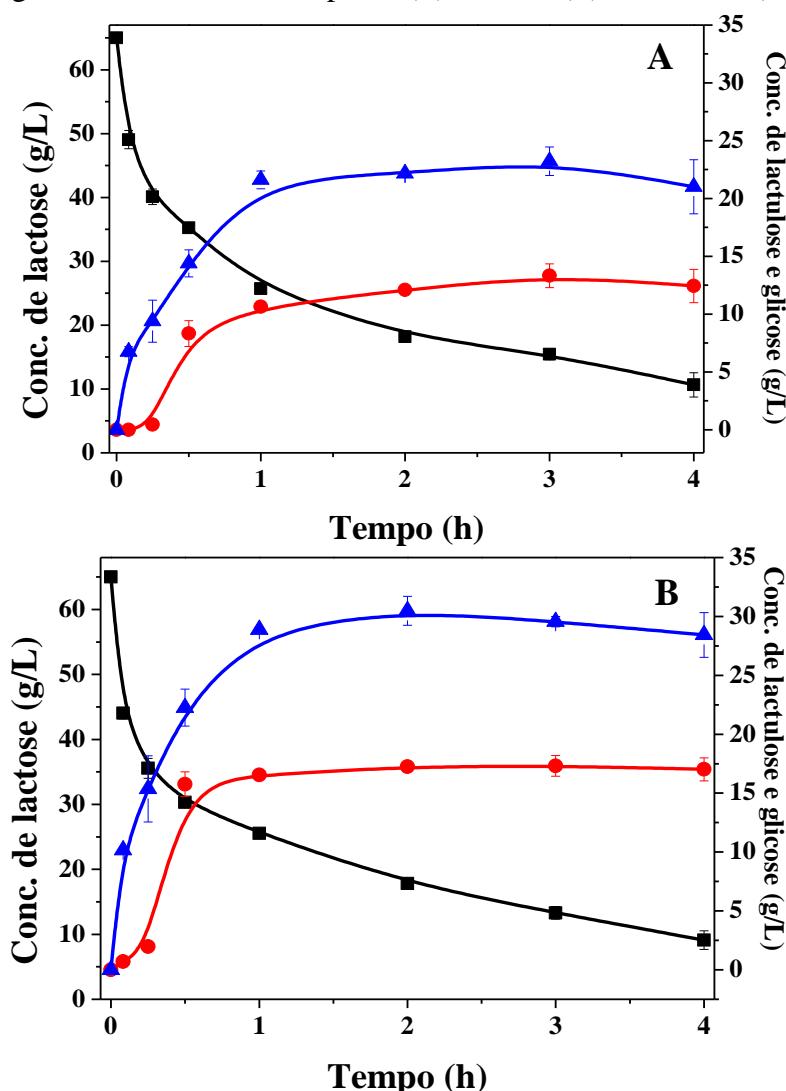
\*Mesma letra não difere estatisticamente ( $p<0,05$ )

A Figura 4.23 mostra o perfil da síntese de lactulose no soro não tratado (A) e tratado (B) utilizando a enzima imobilizada, ou seja, utilizaram-se as condições ótimas para produção da lactulose descritas anteriormente. Observa-se que teve um elevado consumo de lactose, cerca de 82,8%, o que é muito importante, visto que se mostra que a enzima  $\beta$ -galactosidase foi capaz de catalisar a reação de hidrólise da lactose presente no soro de leite, evidenciando que o soro de leite pode ser utilizado como substrato para a produção de bioproductos de valor agregado. A produção máxima de lactulose

alcançada no soro de leite não tratado (Tabela 4.8) foi de  $13,32 \pm 1,03$  g/L, com uma liberação de  $23,22 \pm 1,23$  g/L de glicose.

Diante disso, realizou-se um pré-tratamento no soro de leite a ser utilizado nas reações para buscar o aumento da produção, visto a possibilidade da interferência das proteínas contidas. Observa-se que 86% da lactose foi consumida na reação, valor superior ao observado quando o soro não foi tratado. Também se observou um aumento de 43,3% na produção de lactulose após o pré-tratamento do soro de leite, atingindo a concentração de  $17,32 \pm 0,88$  g/L.

Figura 4.23. Produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase imobilizada de *Kluyveromyces lactis* a partir do soro de leite não tratado (A) e tratado para precipitação de proteínas (B), razão lactose/frutose de 15/30% (m/v), concentração total de substratos 200 g/L, a 50 °C, carga enzimática 7 U/mL e pH 7. (■) lactose; (●) lactulose e (▲) glicose.



Pode-se observar (Tabela 4.8) que a produtividade de lactulose no soro tratado (31,5 g/L.h) foi praticamente o dobro da produtividade naquele que não foi tratado (16,5 g/L.h). O rendimento (%) no soro tratado também foi superior em relação ao que não teve as proteínas precipitadas, sendo de 20,3 nesse e 26,7% naquele.

Alguns estudos apresentam resultados em relação à utilização do soro de leite para a produção de lactulose, porém com a condição de que seja anteriormente pré-tratado. A ultrafiltração de soro, por exemplo, produz concentrado de proteína de soro de leite usado na indústria de alimentos e permeado de soro de leite, que compreende principalmente lactose e sais, com baixo valor de mercado. Assim, a possibilidade de usar lactose a partir de um material de resíduos, como o permeado de soro, para obter lactulose é particularmente interessante para a indústria de alimentos (LAMSAL, 2012).

Adamczak, Charubin e Bednarski (2009) avaliaram a síntese de galactooligossacarídeos e lactulose a partir de concentrados de permeado de soro de leite que passaram por ultrafiltração prévia usando diferentes tipos e  $\beta$ -galactosidases comerciais (Maxilact 2000 de *Kluyveromyces lactis* (DSM, Warsaw, Poland), Lactozym 2000L de *Kluyveromyces fragilis* (Novozymes, Poland) e Ha-Lactase de *Aspergillus oryzae* (Chr. Hansen, Croatia). Esses autores observaram que a eficiência da síntese foi influenciada pelo tipo de enzima e pela concentração de substratos e razão lactose e frutose. No seu estudo, utilizaram soro com 200 g/L de lactose com adição de 5 g, 10 g ou 15 g de frutose por 100 mL de solução. A concentração mais elevada de lactulose, 65 g/L, foi obtida quando 15 g de frutose foram adicionadas a solução de 100 mL de soro.

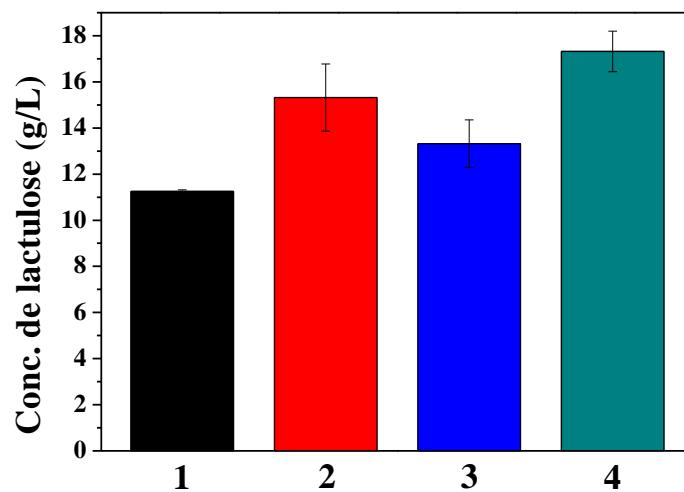
Wu *et al.* (2017) investigaram a produção de lactulose a partir de soro de leite por celobiose 2-epimerase em um reator de membrana enzimática e alcançaram cerca de 58% de conversão da lactose do soro de leite em lactulose. Padilla *et al.* (2015) avaliaram a produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* a partir da lactose de permeado de soro de leite. Assim como no presente trabalho, a produção obtida foi comparada com sintetizada usando lactose pura como substrato, alcançando valor máximo de lactulose de aproximadamente 10 g/L, valor inferior ao observado nos presentes experimentos.

Em contraste com a metodologia utilizada no presente trabalho, Seo, Park e Han (2015) avaliaram a produção de lactulose de soro de leite usando carbonato de sódio, uma síntese química. Avaliaram três parâmetros: temperatura, tempo de reação e concentração de carbonato de sódio e alcançaram um rendimento máximo de 29,6% com produção máxima de 15,8 g/L de lactulose. Em comparação com os resultados

otidos aqui, observa-se que, mesmo com algumas formas químicas de produção, os presentes resultados são promissores.

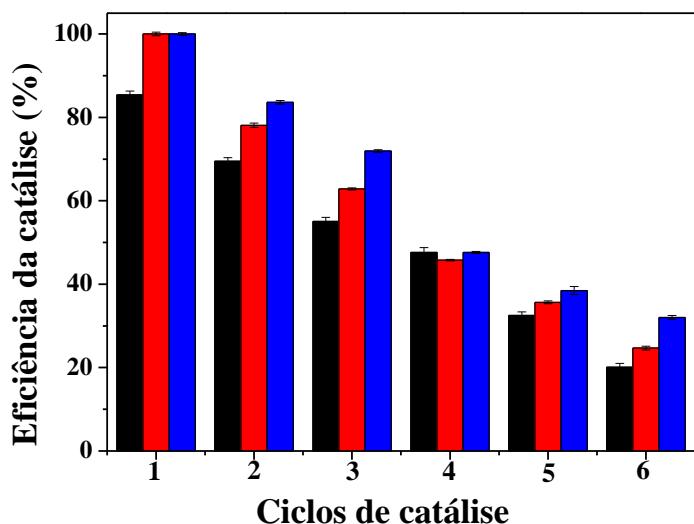
A Figura 4.24 apresenta uma comparação da produção de lactulose a partir da utilização da enzima livre e imobilizada tanto no soro de leite sem tratamento como no soro com tratamento para precipitação de proteínas. A partir dessa figura pode-se notar que a opção na qual se obteve a maior produção de lactulose foi utilizando a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana.

Figura 4.24. Comparação da produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*: livre no soro de leite não tratado (1), livre no soro de leite tratado (2), imobilizada no soro de leite não tratado (3), imobilizada no soro de leite tratado (4).



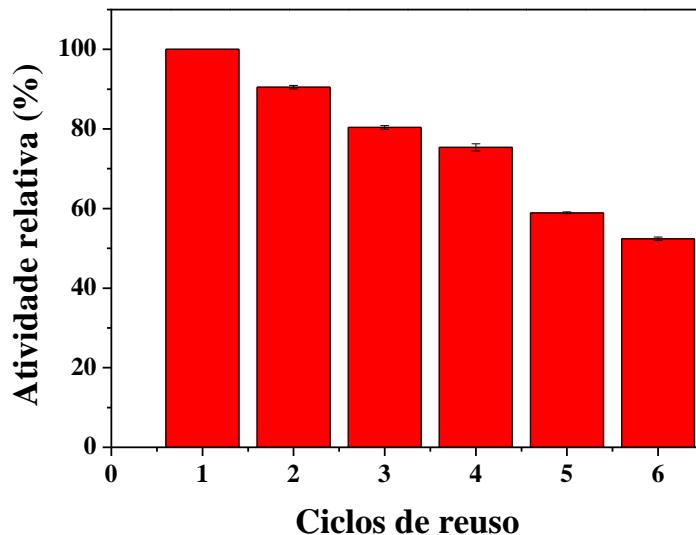
Diante da maior produção a partir da utilização da enzima imobilizada e do tratamento do soro para precipitação de proteínas, conduziu-se um experimento para verificar a eficiência da  $\beta$ -galactosidase imobilizada diante de vários ciclos de reação, ou seja, sua estabilidade operacional. A Figura 4.25 mostra a eficiência do derivado obtido em reações consecutivas no soro de leite tratado. Observa-se que a lactose foi convertida acima de 50% até o terceiro ciclo reacional, já no sexto e último ciclo avaliado, converteu-se cerca de 20% de lactose. A glicose, no sexto ciclo, foi sintetizada em 32% em relação ao ciclo inicial. E em relação a lactulose, nota-se que no terceiro ciclo foi sintetizado 62,8% em relação ao ciclo inicial. Já no sexto ciclo de reuso a síntese de lactulose atingiu 24,7%.

Figura 4.25. Estabilidade operacional do derivado obtido a partir de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada, em catálise do soro de leite tratado para a síntese de lactulose, utilizando as condições de 50 °C, pH 7 e 150 rpm. Barras pretas: lactose; barras vermelhas: lactulose; barras azuis: glicose.



A atividade enzimática do derivado (Figura 4.26) manteve-se acima de 50% até o sexto ciclo de reuso, por outro lado, como observado anteriormente, nesse ponto a produção de lactulose já havia sido muito reduzida (cerca de 25% do primeiro uso). Os resultados evidenciam que o derivado produzido possui uma elevada estabilidade operacional, uma vez que foi possível converter altas taxas de lactose a lactulose, mesmo em até 6 ciclos de reuso. Esse aspecto proporciona uma redução dos custos operacionais devido a um aumento das taxas de conversão de lactose. Existem poucos estudos na literatura mostrando bons resultados com a utilização de  $\beta$ -galactosidase para a produção de lactulose e, até o momento da produção desse trabalho, não foram encontrados resultados com o reuso dessa enzima para produção de lactulose a partir do soro de leite. Em trabalho realizado por Wu *et al.* (2017), por exemplo, avaliou-se o reuso da celobiose-2-epimerase de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, enzima que também catalisa a síntese de lactulose, em um reator de membranas para produzi-la a partir de soro de leite e obtiveram resultados que alcançaram uma conversão de 42,4% de lactose em lactulose após 10 ciclos reacionais.

Figura 4.26. Atividade relativa (%) da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* immobilizada em quitosana.



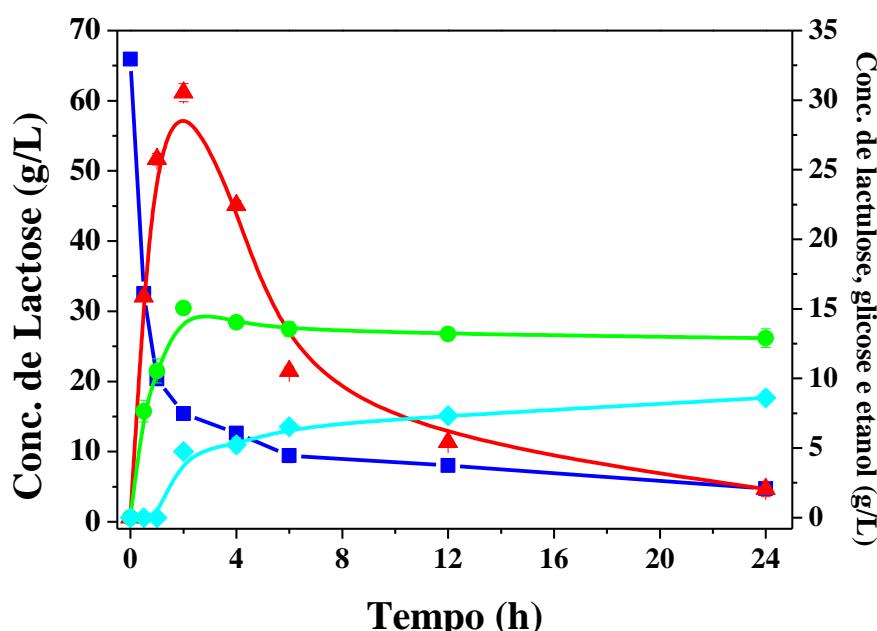
#### 4.4. Produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro de leite

Após o estabelecimento das melhores condições para a produção de lactulose a partir do soro de leite por via enzimática, avaliou-se a possibilidade da utilização da glicose produzida na reação para a produção simultânea de lactulose e etanol a partir do soro de leite utilizando a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, o que incrementaria e completaria o processo de reaproveitamento desses resíduos com a obtenção de produtos de maior valor agregado.

Para tais experimentos utilizou-se uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para utilizar a glicose sintetizada durante a reação como substrato para a produção de etanol via processo fermentativo. Para efeitos de comparação, realizou-se o experimento tanto com a enzima livre como com a enzima immobilizada nas condições citadas anteriormente. A Figura 4.27 mostra a reação completa para a produção de lactulose e etanol utilizando a enzima livre. Como a adição da cultura microbiana só foi realizada após 2 h do início de reação de síntese de lactulose, só foi possível observar a produção de etanol a partir de 3 h, como mostrado na Figura 4.27. Pode-se verificar que a lactose foi convertida em cerca de 88% em 2 h de reação e em 24 h alcançou-se conversão de aproximadamente 96%. No momento em que se adicionou o micro-organismo ao meio reacional para a produção de etanol, a concentração de glicose correspondia a cerca de  $29,45 \pm 0,17$  g/L e a concentração máxima de etanol produzida foi de  $8,42 \pm 0,13$  g/L. A concentração máxima de lactulose nesse ensaio foi de  $17,04 \pm 0,22$  g/L, no entanto ao

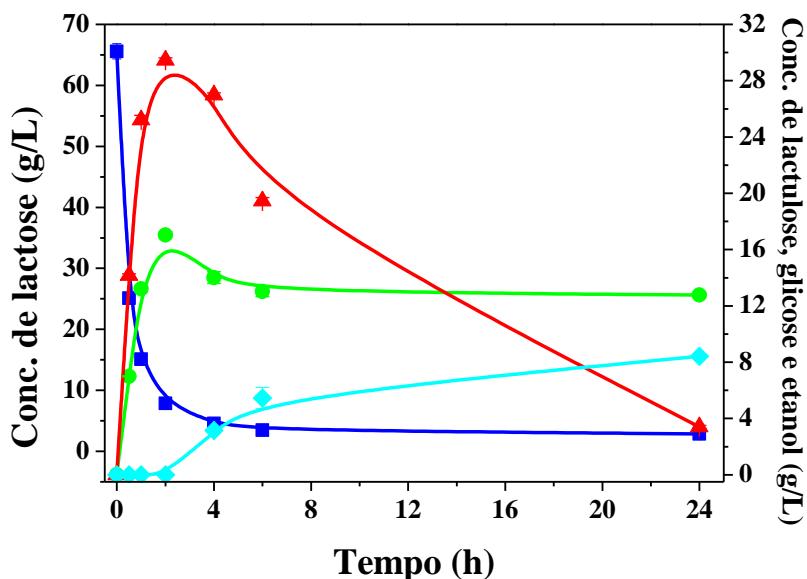
final de 24 h de fermentação, observou-se uma redução do conteúdo de lactulose em 25%, o que corresponde a uma concentração final de  $12,77 \pm 0,18$  g/L. Esse fato se deve, provavelmente, a utilização de parte da lactulose sintetizada como substrato para manutenção celular do micro-organismo após a redução da concentração de glicose no meio.

Figura 4.27. Produção enzimática de lactulose por  $\beta$ -galacatosidase de *Kluyveromyces lactis* solúvel e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de soro de leite. (■): lactose; (▲) glicose; (●) lactulose e (◆) etanol.



Os perfis de síntese de lactulose e etanol utilizando a enzima na forma imobilizada podem ser visualizados na Figura 4.28. Nesse caso, pode-se observar que cerca de 93% da lactose foi consumida em até 24 h de reação. Em 2 h observou-se que  $28,94 \pm 0,76$  g/L de glicose foi liberada e a concentração máxima de etanol atingida foi de  $8,79 \pm 0,65$  g/L, valor muito próximo ao encontrado nos experimentos com a enzima solúvel. Já a concentração máxima de lactulose sintetizada foi  $17,50 \pm 0,76$  g/L.

Figura 4.28. Produção enzimática de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* immobilizada e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de soro de leite. (■): lactose; (▲) glicose; (●) lactulose e (◆) etanol.



Na Tabela 4.9 estão apresentados os valores de produção máxima, produtividade e rendimento de lactulose e etanol nos experimentos realizados com o soro de leite e com a enzima livre e immobilizada. A produtividade de lactulose foi muito aproximada usando a enzima livre ou a immobilizada. Da mesma forma o rendimento, que se mostrou muito próximo nas duas preparações. A produtividade de etanol alcançou seu máximo no experimento com a enzima immobilizada, de 2,16 g/L.h, com rendimento (g de etanol/ g de glicose) de 30,37. A concentração residual de glicose em relação a inicial foi de apenas 11,6% utilizando a enzima livre e de 9,55% usando a immobilizada. Dessa forma, os resultados obtidos para a produção conjunta de lactulose e etanol são promissores, uma vez que se pode aproveitar, via processo biotecnológico, tanto a lactose presente no soro de leite, como também a glicose formada durante o processo enzimático. Por meio de teste Tukey ( $p<0,05$ ), constatou-se que não houve diferença significativa ao se utilizar a enzima solúvel e a immobilizada para a produção de lactulose a partir do soro de leite.

Tabela 4.9. Produção máxima (g/L), produtividade (g/L.h) e rendimento (%) de lactulose usando a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, solúvel e imobilizada, e etanol, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir do soro de leite tratado.

| <b>Lactulose</b> |                           |                              |                       |
|------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|
| <b>Enzima</b>    | <b>Produção (g/L)</b>     | <b>Produtividade (g/L.h)</b> | <b>Rendimento (%)</b> |
| Livre            | 17,04 ± 0,13 <sup>a</sup> | 13,98                        | 25,98                 |
| Imobilizada      | 17,50 ± 0,76 <sup>a</sup> | 12,90                        | 26,68                 |
| <b>Etanol</b>    |                           |                              |                       |
| <b>Enzima</b>    | <b>Produção (g/L)</b>     | <b>Produtividade (g/L.h)</b> | <b>Rendimento (%)</b> |
| Livre            | 8,42 ± 0,13 <sup>b</sup>  | 1,58                         | 28,59                 |
| Imobilizada      | 8,79 ± 0,65 <sup>b</sup>  | 2,16                         | 30,37                 |

## 5. CONCLUSÕES

A máxima concentração de lactulose produzida foi de  $22,59 \pm 0,11$  g/L e as condições ótimas foram: razão lactose/frutose de 15%:30% (m/v), concentração inicial de substrato de 200 g/L, temperatura de 50 °C, carga enzimática de 7 U/mL, pH 7 e adição de 0,01% do cátion Mg<sup>2+</sup>.

A maior produção observada foi no soro de leite tratado, atingindo-se uma concentração total de  $17,32 \pm 0,88$  g/L de lactulose. A preparação enzimática obtida também foi avaliada quanto aos ciclos de reuso, e observou-se que possui uma promissora estabilidade operacional, chegando a sintetizar 63% da concentração incial de lactulose produzida no terceiro ciclo de uso. No entanto, ressalta-se que, devido a eficiência mostrada anteriormente quando se emprega a enzima imobilizada (que pode ser reutilizada em até 6 ciclos de reuso mantendo a produção de lactulose em até 25%) e a maior facilidade para separação desta do produto final a partir do meio reacional, o seu uso pode ser de grande vantagem no processo de síntese de lactulose.

Utilizando a enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi possível produzir lactulose e etanol em uma mesma batelada de experimentos, com concentrações máximas de  $17,50 \pm 0,76$  g/L e  $8,79 \pm 0,65$  g/L, respectivamente.

Conclui-se, portanto, que é possível produzir lactulose por via enzimática utilizando a enzima β-galactosidase de *K. lactis* a partir de soro de leite, o que traria benefícios ambientais consideráveis em processos industriais, visto a redução de resíduos prejudiciais, como a lactose, no meio ambiente e possivelmente tornará o processo de produção deste prebiótico menos oneroso. Os resultados aqui são promissores, uma vez que foi possível determinar as condições ótimas para a síntese de lactulose, uma substância com alto valor agregado com utilização alimentícia e farmacêutica, empregada inclusive no tratamento de alguns quadros patológicos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, M.; CHARUBIN, D.; BEDNARSKI, W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. **Chemical Papers**, v. 63, p. 111-116, 2009.
- AGUIRRE-EZKAURIATZA, E. J.; AGUILAR-YÁÑEZ, J. M.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2837-2844, 2010.
- AIDER, M.; HALLEUX, D. D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 356-364, 2007.
- AISSA, A. A.; AÏDER, M. Lactose isomerization into lactulose in an electro-activation reactor and high-performance liquid chromatography (HPLC) monitoring of the process. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 115-124, 2013.
- AÏT-AISSA, A.; AÏDER, M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1245-1253, 2014.
- AJISAKA K, NISHIDA H, FUJIMOTO H. Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of  $\beta$ -galactosidase. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 387-392, 1987.
- ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCCELLA, A.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange of  $\beta$ -galactosidase: the effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry (1991)**, v. 51, p. 875-880, 2016.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 314-323, 2015.

AMADO, I. R., VÁZQUEZ, J. A., PASTRANA, L., TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54-61, 2016.

ANGYAL, S. J. The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation and related reactions. **Glycoscience**, v.215, p. 1-14, 2001.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W.-D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 865, p. 129-144, 1999.

ASHRAF, S., SOUDI, M. R., SADEGHIZADEH, M. Isolation of a novel mutated strain of *Xanthomonas campestris* for xanthan production using whey as the sole substrate. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 438-442, 2008.

AUDIC, J. L.; CHAUFER, B.; DAUFIN, G. Non-food applications of milk components and dairy co- products: a review. **Lait**, v. 83, p. 417-438, 2003.

AVCI, A.; ÇAĞRI-MEHMETOĞLU, A.; ARSLAN, D. Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella Typhimurium*. **LWT - Food Science and Technology**. v. 80, p. 265-270, 2017.

AYDINER, C., TOPCU, S., TORTOP, C., KUVVET, F., EKINCI, D., DIZGE, N., KESKINLER, B. A novel implementation on water recovery from whey: “Forward-reverse osmosis” integrated membrane system. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, p. 786-799, 2013.

AYDINER, C.; SEN, U.; KOSEOGLU-IMER, D. Y.; DOGAN, E. C. Hierarchical prioritization of innovative treatment systems for sustainable dairy wastewater management. **Journal of cleaner production**, v. 112, p. 4605-4617, 2016.

BARBOSA, J. B.; GENTIL, N. O.; LADEIRA, S. A.; MARTINS, M. L. L. Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 244-250, 2014.

BARBOSA-POVOA, A. P. A critical review on the design and retrofit of batch plants. **Computers & Chemical Engineering**, v. 31, p. 833-855, 2007.

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

BHAVSAR, K., GUJAR, P., SHAH, P., KUMAR, V. R., KHIRE, J. M. Combinatorial approach of statistical optimization and mutagenesis for improved production of acidic phytase by NCIM *Aspergillus niger* 563 under submerged fermentation condition. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, p. 673-679, 2013.

BIMBI, G. INALCO S.P.A, Process for the preparation of crystalline lactulose from commercial syrups, United States patent 5480491A, 1996.

BRADY, D.; JORDaan, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.

BRICZINSKI, E. P.; ROBERTS, R. F. Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3189-3197, 2002.

BRUZZESE, E.; VOLPICELLI, M.; SQUAGLIA, M.; TARTAGLIONE, A.; GUARINO, A. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 283-287, 2006.

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, p.95-105. 2005.

CABRAL, J. M. S.; KENNEDY, J. F. Protein Immobilization—Fundamentals and Applications. Marcel Dekker Inc., New York, 1991.

CAPÓN-GARCÍA, E.; PAPADOKONSTANTAKIS, S.; HUNGERBÜHLER, K. Multi-objective optimization of industrial waste management in chemical sites

coupled with heat integration issues. **Computers and Chemical Engineering**, v. 62, p. 21-36, 2014.

CARDOSO, B. B.; SILVÉRIO, S. C.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R.  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67-74, 2017.

CAROBBI, R.; INNOCENTI, F.; RIPOLI, B. A. 1990. Process for preparing lactulose from lactose by epimerization with sodium aluminate. Patente dos EUA n. 4957564.

CAROTA, E.; CROGNALE, S.; D'ANNIBALE, A.; GALLO, A. M.; STAIZI, S. R.; PETRUCCIOLI, M. A sustainable use of ricotta cheese whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 584-585, p. 554-560, 2017.

CHAO, C. C., SHERMAN J. D. Union Carbide Corporation. Bulk lactulose/lactose separation by selective adsorption on zeolitic molecular sieves, Unites States patent 4394178A, 1983.

CHEN, Q.; LEVIN, R.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; JIANG, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; MU, W. Characterisation of a novel cellobiose 2-epimerase from thermophilic *Caldicellulosiruptor obsidiansis* for lactulose production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3095-3105, 2016.

CHENG, C. C.; YU, M. C.; CHENG, T. C.; SHEU, D. C.; DUAN, K. J., TAI, W. L. Production of high- content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 793-797, 2006.

CHIBATA, I. TOSA, T. Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. **Advances in Applied Microbiology**, v. 22, p. 1-27, 1977.

CLAEYS, W. L.; LUDIKHUYZE, L. R.; HENDRICKX, M. E. Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk heated under isothermal

and non-isothermal conditions. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 287-301, 2001.

CONDE-BÁEZ, L., CASTRO-ROSAS, J., VILLAGÓMEZ-IBARRA, J. R. PÁEZ-LERMA, J. B. GÓMEZ-ALDAPA, C. Evaluation of waste of the cheese industry for the production of aroma of roses (Phenylethyl Alcohol). **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1343-1350, 2 017.

CORZO-MARTINEZ, M.; GARCÍA-CAMPOS, G.; MONTILLA, A.; MORENO, F. J. Tofu whey permeate is an efficient source to enzymatically produce prebiotic fructooligosaccharides and novel fructosylated  $\alpha$ -galactosides, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4346-4352, 2016.

DEMIR, M.; TURHAN, I.; KUCUKCETIN, A.; ALPKENT, Z. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 365-369, 2013.

DENDENE K, GUIHARD L, BALANNEC B, BARIOU B. Study of the separation of lactose, lactulose and galactose by liquid chromatography using cationic ion-exchange resin columns. **Chromatographia**, v. 41, p. 561-567, 1995.

DEPLANCHE, K.; BENNETT, J. A.; MIKHEENKO, I. P.; OMAJALI, J.; WELLS, A. S.; MEADOWS, R. E.; WOOD, J.; MACASKIE, L. E. Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in 'green' synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 147, p. 651-665, 2014.

DÍEZ-MUNICIO, M.; MONTILLA, A.; JIMENO, M. L.; CORZO, N.; OLANO, A.; MORENO, F. J. Synthesis and characterization of a potential prebiotic trisaccharide from cheese whey permeate and sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1945-1953, 2012.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles, 2nd ed. [s l.]: Academic Press, 2012.

- EL-GINDY, A. Production, partial purification and some properties of beta-galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. **Folia Microbiologica**, v. 48, p. 581-584, 2003.
- FENG, Y. M.; CHANG, X. L.; WANG, W. H.; MA, R. Y. Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 326-332, 2009.
- FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, D.; VEILLETTE, M.; GIROIR-FENDLER, A.; RAMIREZ, A. A.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M. Biovalorization of saccharides derived from industrial wastes such as whey: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 1, p. 147-174, 2017.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, C. M.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 405-418, 2009.
- FOWLER, A.; ZABIN, I. Amino acid sequence of beta-galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and the complete sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 1978, 253, 5521-5525, 1978.
- FREITAS, M. F. M. Produção de  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana / Maria de Fátima Matos de Freitas. – 2013. 99 f.: il. color., enc.; 30 cm. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
- GÄNZLE M.G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 685-694, 2008.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 35, p. 2885-2904, 2011.

GARMAN, J., COOLBEAR, T., SMART, J. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by  $\beta$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 22-27, 1996.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GOUVEIA, A. R.; FREITAS, E. B.; GALINHA, C. F.; CARVALHO, G.; DUQUE, A. F.; REIS, M. A. M. Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. **New Biotechnology**, v. 37, p. 108-116, 2017.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry: a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v.26, p. 1-14, 2008.

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

GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with  $\beta$ -galactosidases of different origin. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2225-2232, 2013.

GUERRERO, C.; VERA, C.; PLOU, F.; ILLANES, A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial  $\beta$ -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 206-212, 2011.

- GUIMARAES, P. M., TEIXEIRA J. A., DOMINGUES, L. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnolgy Letters**, v. 30, p. 1953-1958, 2008.
- HAJEK, J.; MURZIN, D. Y.; SALMI, T.; MIKKOLA J-P. Interconversion of lactose to lactulose in alkaline environment: comparison of different catalysis concepts. **Topics Catalysis**, v. 56, p. 839-45, 2013.
- HARTMEIER, W. Immobilized Biocatalysts: sn Introduction, 1st ed.: Springer, Heidelberg, 1986.
- HASHEM, A. M.; ISMAIL, S. A. E.; HELMY, W. A.; EL-MOHAMADY, Y.; ABOU-ROMIA, R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495  $\beta$ -galactosidase and its biological activity. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 9, p. 1-6, 2013.
- HEO, J.-Y., KIM, S., KANG, J.-H.; MOON, B. Determination of lutein from green tea and green tea by-products using accelerated solvent extraction and UPLC. **Journal of Food Science**, v.79, p.816-821, 2014.
- HERNÁNDEZ, O.; RUIZ-MATUTE, A. I.; OLANO, A., MORENO, F.J., SANZ, M.L. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 531-536, 2009.
- HERNANDEZ-HERNANDEZ, O., MUTHAIYAN, A., MORENO, F. J., MONTILLA, A., SANZ, M.L; RICKE, S.C. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, 355-361, 2012.
- HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. **Food Chemistry**, v. 137, p. 1-7, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_05\\_04\\_17\\_33\\_34\\_leite\\_abril\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf). Acesso em: 06 de abril de 2017.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; A. S. BAWA, A.S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 278-293, 2012.

JĘDRZEJEWSKA, M.; KOZAK, K. Ethanol production from whey permeate in a continuous anaerobic bioreactor by *Kluyveromyces marxianus*. **Environmental Technology**, v. 32, p. 37-41, 2011.

JEZOWSKI, J. Review and analysis of approaches for designing optimum industrial water networks. **Chemical and Process Engineering-Inzynieria Chemiczna I Procesowa**, v. 29, p. 663-681, 2008.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.

KARTHIKA; C.; SHARMILA, G.; MUTHUKUMARAN, C.; MANIKANDAN, K. Utilization of whey powder as an alternate carbon source for production of hypocholesterolemic drug by *Aspergillus terreus* MTCC 1281. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 1335-1341, 2013.

KHATAMI, S.; ASHTIANI, F. Z.; BONAKDARPOUR, B.; MEHRDAD, M. The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. **International Dairy Journal**, v.34, p.74-79, 2014.

KHATRI, V., HÉBERT-OUELLET, Y., MEDDEB-MOUELHI F., BEAUREGARD, M. Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module as molecular probe. **Biotechnology Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016.

KHODAIYAN, F.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M. Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 415-422, 2008.

KIM, Y. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 668-72, 2012.

KIM, Y. S.; PARK, C. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 903-908, 2006.

KIRAN E. U., TRZCINSKI P, NG WJ; LIU Y, Bioconversion of food waste to energy: a review. **Fuel**, v. 134, p. 389-399. 2014a.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, P.; LIU, Y. Platform chemical production from food wastes using a biorefinery concept. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, p. 1364-1379, 2014b.

KOKKE, F. T.; SCHOLTENS, P. A.; ALLES, M. S.; DECATES, T. S.; FISELIER, T. J. W.; TOLBOOM, J. J. M.; KIMPEN, J. L. L.; BENNINGA, M. A. A dietary fiber mixture versus lactulose in the treatment of childhood constipation: a double-blind randomized controlled trial. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 47, p. 592-597, 2008.

KOOLIVAND, A.; MAZANDARANIZADEH, H.; BINAVAPOOR, M. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management Hazardous and industrial waste composition and associated management activities in Caspian industrial park, Iran. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 7, p. 9-14, 2017.

KOSSEVA, M. R. Processing of Food Wastes, 1st ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2009.

KOUTELIDAKIS, I.; PAPAZIOGAS, B.; GIAMARELOS-BOURBOULIS, E.J.; MAKRIS, J.; PAVLIDIS, T.; GIAMARELLOU, H.; PAPAZIOGAS, T. Systemic endotoxaemia following obstructive jaundice: the role of lactulose. **Journal of Surgical Research**, v. 113, p. 243-247, 2003.

KOUTINAS, M.; MENELAOU, M.; NICOLAOU, E. N. Development of a hybrid fermentation: enzymatic bioprocess for the production of ethyl lactate from dairy waste. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 343-349, 2014.

- KUMAR, A.; GALAEV, I. Y.; B. MATTIASSON, B. Polymer displacement/shielding in protein chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 741, p. 103-113 2000.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.
- LAMSAL, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2020-2028, 2012.
- LEE; Y. J; KIM, C. S.; OH, D. K. Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 787-793, 2004.
- LI, X.; ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Pilot-scale lactose hydrolysis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, p. 497-500, 2007.
- LI, Z.; XIAO, M.; LU, L.; LI, Y. Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 896-899, 2008.
- LIAO W.; FLORIN, C. H. Endotoxin, cytokines and hyperlipidemia. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 97-103, 1995.
- LIAO, W.; CUI, X. S.; JIN, X. Y., FLORÉN, C. H. Lactulose, a potential drug for the treatment of inflammatory bowel disease. **Medical Hypotheses**, v. 43, p. 234-238, 1994.
- LIAO, X. Y. ZHENG, Q. W.; QIAN-LING ZHOU, Q. L.; LINA, J. F.; GUO, L. Q.; YUN, F. Enzymatic characterization of recombinant - galactosidase and its use in enzymatic synthesis of lactulose from lactose and fructose. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 134, p. 253-260, 2016.

LIEVORE, P.; SIMÕES, D. R.; SILVA, K. M.; DRUNKLER, N. L.; BARANA, A. C.; NOGUEIRA, A., Demiate, I. M. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2083-2092, 2015.

LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M; RODRIGUES, T. H. S; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry** (1991), v. 48, p. 443-452, 2013.

LIU, C.; LIU, Y.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN, S. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 877-882, 2003.

LIU, Z., ZHAO, C., DENG, Y., HUANG, Y., LIU, B. Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from thermophilic anaerobic bacterial consortium YTY-70. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 547-554, 2015.

LO, S.; DUGDALE, M. L.; JEERH, N.; KU, T.; ROTH, N. J.; HUBER, R. E. Studies of Glu-416 variants of beta-galactosidase (*E. coli*) show that the active site Mg (2+) is not important for structure and indicate that the main role of Mg (2+) is to mediate optimization of active site chemistry. **The Protein Journal**, v. 29, p. 26-3, 2010.

LUNA, F. J. Modificação de zeólicas para uso em catálise. **Química. Nova**, v. 24, p. 885-892, 2001.

LYDDIATT, A. Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 95-103, 2002.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v 104, p. 305-344, 2008.

MACK, D. R., FLICK, J. A., DURIE, P. R., ROSENTEIN, B. J., ELLIS, L. E., PERMAN, J. A. Correlation of intestinal lactulose permeability with exocrine pancreatic dysfunction. **Journal of Pediatrics**, v. 120, p. 696-701, 1992.

MACKENZIE A. K.; NAAS, A. E.; KRACUN, S. K.; SCHÜCKEL, J.; FANGEL, J. U.; AGGER, J. W.; WILLATSB, W. G. T.; EIJSINKA, V. G. H.; POPE, P. B. A polysaccharide utilization locus from an uncultured bacteroidetes phylotype suggests ecological adaptation and substrate versatility. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p. 187-195, 2015.

MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1304-1313, 2017.

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

MARCONI, E.; MESSIA, M. C.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; VERNAZZA, F., STOCCHI, F.; PALLESCHI, G. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. **Food Chemistry**, v. 84, p. 447-50, 2004.

MARCONI, W.; MORISI, F. Industrial application of fiber-entrapped enzymes. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 20, p. 219-258, 1978.

MARWAHA, S. S., KENNEDY, J. F. Whey pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 23, p. 323-336, 1998.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Ethanol production from whey permeate by immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**. v. 19, p. 79-84, 1984.

MATVIEVSKY, V. Y. Investigation of process for lactose/lactulose syrup production for infantile food. 252 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Uglich Institute (Russia) 1979.

MAYER, J., CONRAD, J., KLAIBER, I., LUTZ-WAHL, S., BEIFUSS, U., FISCHER, L. Enzymatic produc- tion and complete nuclear magnetic resonance

assignment of the sugar lactulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6983-6990, 2004.

MAYER, J.; KRANZ, B.; FISCHER, L. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable beta-glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 145, p. 387-93, 2010.

MENESES, Y. E.; FLORES, R. A. Feasibility, safety, and economic implications of whey-recovered water in cleaning-in-place systems: A case study on water conservation for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3396-3407, 2016.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MLICOVÁ, Z., ROSENBERG, M. Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, p. 47-54, 2006.

MONTAÑÉS, F.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data. **Thermodynamics**, v. 53, p. 2411-2418, 2007.

MONTGOMERY, E. M.; HUDSON, C. S. Relations between rotatory power and structure in the sugar group XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 52, p; 2101-2106, 1930.

MOORE, W. E.; MOORE, L. H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3202-3207, 1995.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Resources, Conservation and Recycling Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012.

NADAL, I.; RICO, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; YEBRA, M. J.; MONEDERO, V. Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1233-1237, 2009.

NASRABADI, M. R. N.; RAZAVI, S. H. Optimization of  $\beta$ -Carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 445-454, 2011.

NASRULLAH, M., VAINIKKA, P., HANNULA, J., HURME, M., KÄRKI, J. Mass, energy and material balances of SRF production process Part 1: SRF produced from commercial and industrial waste. **Waste Manage**, v. 34, p. 1398-1407, 2014.

NATH; A.; MONDAL, S.; KANJILAL, T.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; BHATTACHARJEE, C. Chemical engineering research and design synthesis and functionality of proteinaceous nutraceuticals from casein whey - A clean and safe route of valorization of dairy waste. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 97, p. 192-207, 2015.

NIKNEZHAD, S. V.; ASADOLLAHI, M. A.; ZAMANI, A.; BIRIA, D.; DOOSTMOHAMMADI, M. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. **Food and Scince Biotechnology**, v. 24, p. 453-460, 2015.

OLANO, A.; CORZO, N. Lactulose as a food ingredient. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1987-1990, 2009.

ÖZER, D., AKIN, S. ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in *Acidophilus-bifidus* yoghurt. **Food Science and Technology International**, v. 11, p. 19-24, 2005.

PADILLA, B.; FRAU F.; RUIZ-MATUTE, A. I.; MONTILLA, A.; BELLOCH. C., MANZANARES, P.; CORZO, N. Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by  $\beta$ -

galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. **Journal of Dairy Research**, v.82, p. 356-364, 2015.

PAGE; M. J.; CERA, E. D. Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in enzyme function. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 1049-1092, 2006.

PANESAR, P. S.; KENNEDY J. F; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANESAR, P. S., KUMARI, S. Lactulose: production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**. 29, 940-948, 2011.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of immobilized β-galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v. 3, p. 473137-473153, 2010.

PARASHAR, A.; JIN, Y.; MASON, B.; CHAE, M.; BRESSLER, D. C. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1859-1867, 2016.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, p. 327-348, 2012.

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

PASEEPHOL, T.; SMALL, D. M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Study**, v. 39, 617-634, 2008.

PATEL, S. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6847-6858, 2015.

PATTNAIK, R., YOST, R. S., PORTER, G., MASUNAGA, T., ATTANANDANA, T. Improving multi-soil-layer (MSL) system remediation of dairy effluent. **Ecological Engineering**, v. 32, p. 1-10, 2008.

PAUL, J.; VERMA, A. K., VERMA, R. Role of gut flora in inflammatory bowel disease – a state of art. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v.1, p.705-718, 2007.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v. 70, p. 1-11, 2009.

PLAGEMANN, I., ZELENA, K., ARENDT, P., RINGEL, P. D., KRINGS, U., BERGER, R. G. LOX (Psa)1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 99-104, 2013.

PLOU, F. J.; SEGURA, A. G.; BALLESTEROS, A. Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. New York: Springer Science+Business Media; 2007.

POWELL, N.; BROUGHTON, A., PRATT, C., SHILTON, A. Effect of whey storage on biogas produced by co-digestion of sewage sludge and whey. **Environmental Technology**, v. 34, p. 2743-2748, 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RABIU, B. A.; JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2526-2530, 2001.

RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; CHOURASIA, R.; BHAT, I.; BHARDWAJ, P. K.; SAHOO, D. Production of bioactive hydrolysate using protease,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ - amylase of *Bacillus* spp. isolated from kinema. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 358-365, 2017.

REBELLO, S., JOSE, L., SINDHU, R., ANEESH, E. M. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 2677-2689, 2017.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

REJIKUMAR, S.; DEVI, S. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing  $\beta$ -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly (vinyl alcohol). **International Journal Food Science Technology**, v.36, p. 91-98, 2001.

RIVAS, J., PRAZERES, A. R., CARVALHO, F. Aerobic biodegradation of precoagulated cheese whey wastewater. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2511-2517, 2011.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

RUIZ-MATUTE, A. I., SANZ, M. L., CORZO, N., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., IBÁÑEZ, E., MARTÍNEZ-CASTRO, I.; OLANO, A. Purification of lactulose from mixtures with lactose using pressurized liquid extraction with ethanol–water at different temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3346-3350, 2007.

SADDOUD, A., HASSAÏRI, I., SAYADI, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2102-2108, 2007.

SALTIKA, M. B.; ÖZKANA, L.; JACOBS, M.; PADT, A. Dynamic modeling of ultrafiltration membranes for whey separation processes. **Computers & Chemical Engineering**, v. 99, p. 280-295, 2017.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 444-452, 2012.

SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **ChemCatChem**, v. 7, p. 2413-2432, 2015.

SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 1-6, 2005.

SCHUMANN, C. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. an update. **European Journal of Nutrition**, v. 41, p. 17-25, 2002.

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

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6250-6261, 2013.

SEKI, N.; HAMANO, H.; IIAYAMA, Y.; ASANO, Y.; KOKUBO S.; YAMAUCHI, K.; TAMURA, Y.; UENISHI, K.; KUDOU, H. Effect of lactulose on calcium and magnesium absorption: a study using stable isotopes in adult men. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 53, p. 5-12, 2007.

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1938-1953, 2012.

SEO, Y. H.; PARK, G. W.; HAN, J. Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1167-1171, 2015.

SHELDON, R. A.; S. VAN PELT, S. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.

- SHEN, Q.; ZHANG, Y.; YANG, R.; PAN, S.; DONG, J.; FAN, Y.; HAN, L. Enhancement of isomerization activity and lactulose production of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Food Chemistry**, v. 207, p. 60-67, 2016.
- SHIPRAH, V. H.; SAHU, S.; THAKUR, A. R.; CHAUDHURI, S. R. Screening of bacteria for lactic acid production from whey water. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 9, p. 118-123, 2013.
- SHORTT, C. AND O'BRIEN, J. Handbook of Dairy Products, 1st ed., CRC, Taylor & Francis, London, UK, 2003.
- SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C. L. Whey and whey utilization: possibilities for utilization in agriculture and foodstuffs production, 2nd ed.; Th. Mann Gelsenkirchen-Buer: Berlin, Germany, 1990.
- SILVA, M. A.; SILVA, T. A. L.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Stability of lipases produced by *Yarrowytica lipolytica* in the presence of cheese whey. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 703-708, 2014.
- SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biocatalytic approaches using lactulose: end product compared with substrate. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 878-896, 2016.
- SITANGGANG, A.; DREWS, A.; KRAUME, M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. **Journal of Biotechnology**, v. 203, p. 89-96, 2015.
- SONG, Y. S.; LEE, H. U.; PARK, C.; KIM, S. W. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 136, p. 689-694, 2013.
- SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. **Innovative Roman Food Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2012.

SPLECHTNA, B., PETZELBAUER, I., BAMINGER, U., HALTRICH, D., KULBE, K. D., NIDETZKY, B. Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 434-440, 2001.

TABATABAIE, T., KOTAKE, Y., WALLIS, G., JACOB, J. M., FLOYD, R. A. Spin trapping agent phenyl-N- tertbutylnitrone protects against the onset of drug-induced insulin-dependent diabetes mellitus. **FEBS Letters**, v. 407, p. 148-152, 1997.

TAKENISHI, S.; WATANABE, Y., MIWA, T.; KOBAYASHIA, R. Purification and some properties of beta-galactosidase from *Penicillium multicolor*. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 47, p. 2533-2540, 1983.

TALLEY, N. J.; ABREU, M. T.; ACHKAR, J. P.; BERNSTEIN, C. N.; DUBINSKY, M. C.; HANAUER, S. B., KANE, S. V.; SANDBORN, W. J.; ULLMAN, T. A.; MOAYYEDI, P. An evidence- based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, p. 2-25, 2011.

TANG, L.; LI, Z. A.; YANG, R. J.; DONG, X. X.; ZHANG, J. H.; MAO, Z. G. Lactulose biosynthesis by  $\beta$ -galactosidase from a newly isolated. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 471-476, 2011.

TONG, X. D.; DONG, X. Y.; SUN, Y., **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

UDIC, J. A.; CHAUFER, B.; AUFIN, G. D. Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 83, p. 417-438, 2003.

VAHERI, M.; KAUPPINEN, V. The formation of lactulose (4-O- $\beta$ -galactopyranosylfructose) by  $\beta$ -galactosidase. **Acta Pharm Fennicae**, v. 87, p. 75-83, 1978.

VAMVAKAKI, A. N.; KANDARAKIS, I.; KAMINARIDES, S.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and

biomass production by *Zygomycetes*. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, p. 348-360, 2010.

VANNESTE, J., DE RON, S., VANDECRIES, S., SOARE, S. A.; DARVISHMANESH, S.; VAN DER BRUGGEN, B. Techno-economic evaluation of membrane cascades relative to simulated moving bed chromatography for the purification of mono- and oligosaccharides. **Separation and Purification Technology**, v. 80, p. 600-609, 2011.

VERA, C., GUERRERO, C., ILLANES, A., CONEJEROS, R. A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 2270-2279, 2011.

VERA, C., GUERRERO, C., ILLANES, A., CONEJEROS, R. Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase using optimal control strategy. **Biotechnology Progress**, v. 30, p. 59-67, 2013.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 745-752, 2011.

VERMA, A.; SHUKLA, G. Administration of prebiotic inulin suppresses 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 991-996, 2013.

VILLAMIEL, M.; CORZO, N.; FODA, M. I.; MONTES, F.; OLANO, A. Lactulose formation catalysed by alkaline-substituted sepiolites in milk permeate. **Food Chemistry**, v. 76, p. 7-11, 2002.

WAN, C.; LI, Y.; SHAHBAZI, A.; XIU, S. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130 Z. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 145, p. 111-119, 2008.

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

WANG, M.; YANG, R.; HUA, X.; SHEN, Q.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2-epimerase in permeabilised *Escherichia coli* cells. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1625-1631, 2015.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8-12, 2009.

WANG. M.; HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A568. **Food Bioscience**, v. 14, p. 47-53, 2016.

WHEATLEY, R. W.; JUERS, D. H.; LEV, B. B.; HUBERA, R. E.; NOSKOV, S. Y. Elucidating factors important for monovalent cation selectivity in enzymes: *E. coli*  $\beta$ -galactosidase as a model. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, p. 10899-10909, 2015.

WRIGHT, G.; CHATTREE, A.; JALAN, R. Management of hepatic encephalopathy. **International Journal of Hepatology**, v. 1, p. 1–10, 2011.

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

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, 756-774, 2015.

YAKOVLEVA, O. N. Method for carbohydrate production for infantile food. Master of Science thesis. State University of Kiev: Ukraine; 1963.

YANG, H. Q.; LIU, L.; LI, J. H.; DU, G. C.; CHEN, J. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline alpha amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-9, 2011.

YOON, S. H.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1127-1132, 2003.

ZAAK, H.; PEIRCE, SARA; ALBUQUERQUE, T. L.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Exploiting the Versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysts**, v. 7, p. 1-14, 2017.

ZHANG, Z.; YANG, R.; ZHANG, S.; ZHAO, H.; HUA, X. Purification of lactulose syrup by using nanofiltration in a diafiltration mode. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 112-118, 2011.

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

## ANEXOS

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA TESE

#### Artigos Publicados:

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCCHELLA, A.; GONÇALVES, L.R.B.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange of  $\beta$ -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. *Process Biochemistry* (1991), v. 51, p. 875-880, 2016.

#### Artigo em fase de finalização:

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; D'ALMEIDA, A. P.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enzymatic production of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using whey cheese as substrate.

#### Trabalhos completos publicados em anais de congressos:

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; Gonçalves, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Production of lactulose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: the effect of the substrate concentration and the temperature. In: XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - Sinaferm, 2017, Aracaju.

#### Resumos em anais de congressos:

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; Gonçalves, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Production of lactulose by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* aiming to reuse whey residual from dairy industry. In: 10th World Congress of Chemical Engineering, 2017, Barcelona.

D'ALMEIDA, A. P.; ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Avaliação da produção de lactulose a partir de resíduos. In: Encontros Universitários da UFC - XXXVI Encontro de Iniciação Científica, 2017, Fortaleza.

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S; RUEDA, N.; MARZOCCHELLA, A.; Gonçalves, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the immobilization pH on stability of the immobilized enzyme. In: 11th International Conference on Protein Stabilisation - ProtStab 2016, 2016, Istambul.

GOMES, S. D. L.; ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Produção de lactulose por utlizando via enzimática objetivando a reutilização do soro de leite residual da indústria alimentícia. In: Encontros Universitários da UFC - XXXV Encontro de Iniciação Científica, 2016, Fortaleza.