



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO*
SENSU MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ATRAVÉS DE
LIGAÇÕES COVALENTES MULTIPONTUAIS EM SUPORTE
CONTENDO GRUPAMENTOS EPOXI**

Ruan da Silva Rafael

Lajeado, março de 2014

Ruan da Silva Rafael

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ATRAVÉS DE LIGAÇÃO COVALENTE MULTIPONTUAL EM SUPORTE CONTENDO GRUPAMENTO EPOXI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Centro Universitário UNIVATES como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia na Área de Concentração Agroalimentar na linha de pesquisa Biotecnologia na Produção Industrial de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claucia Fernanda Volken de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto

Lajeado, março de 2014

Ruan da Silva Rafael

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ATRAVÉS DE LIGAÇÃO COVALENTE MULTIPONTUAL EM SUPORTE CONTENDO GRUPAMENTO EPOXI

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Agroalimentar:

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza - orientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto - coorientador
Centro Universitário UNIVATES

Profa. Dra. Márcia Inês Goettert
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Maurício Hilgemann
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lajeado, março de 2014

Agradecimentos

Agradeço à professora Claucia pelos ensinamentos, conselhos e amizade. Sua dedicação e paixão pela ciência serviram de inspiração em minha busca por respostas.

Ao meu coorientador, professor Raul, paciente e solícito, esteve sempre à disposição.

Aos amigos da UFRGS, Plinho, Carla e André, os quais proporcionaram uma semana de treinamentos de inestimável valia. Obrigado!

Ao professor Rafael, sempre prestativo, contribuiu com excelentes ideias para o desenvolvimento deste trabalho. Sou grato pela troca de experiências e amizade.

Ao meu estagiário Adriano, meu braço direito neste projeto e a quem posso chamar de amigo.

Sou profundamente grato aos meus pais, Rafael e Gisélia, minhas referências de vida. Agradeço ao meu irmão, Vini, pela nossa amizade sincera e eterna.

Agradeço à Lidi, minha vida. Suas palavras de motivação me trouxeram firme até aqui.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar algum”.

Frank Clark

RESUMO

A enzima β – galactosidase é reconhecida por catalisar a hidrólise da lactose e possibilitar a formação de galactooligossacarídeos. O objetivo do presente trabalho foi estudar diferentes condições de imobilização de β – galactosidases de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* utilizando suporte comercial Immobead. Ambas as enzimas foram imobilizadas nos suportes tratados e não tratados com etilenodiamina e submetidas a processos de imobilização uni e multipontual. Os derivados também foram avaliados quanto ao bloqueio dos grupamentos epóxi com glicina. As análises de estabilidade ao armazenamento sob refrigeração, estabilidade térmica, ciclos de reuso para hidrólise da lactose, determinação das propriedades cinéticas e determinação de pH e temperatura ótimos foram realizadas nos derivados obtidos. Os resultados de eficiência de imobilização variaram de 30 a 50% e os valores de rendimento variaram entre 80 e 90%. Modificações químicas no suporte foram realizadas utilizando etilenodiamina com o objetivo de gerar modificações químicas no suporte, causando a rápida adsorção de enzimas e favorecendo a formação de ligações covalentes multipontuais em tempo reduzido. Verificou-se que suportes modificados com etilenodiamina imobilizaram a mesma carga de enzimas em menor tempo, quando comparados a suportes sem modificação. Entretanto, a significativa perda de atividade verificada nesses suportes durante os ciclos de reuso sugere que a superfície do suporte possa ter sido modificada em sua totalidade, dificultando a formação de ligações covalentes e permitindo a lixiviação de enzimas para o meio reacional. Derivados não bloqueados apresentaram perda considerável de atividade enzimática durante a armazenagem, indicando a ocorrência de possíveis distorções da enzima, ocasionadas pela interação de grupamentos epóxi livres. Ensaio submetidos à imobilização multipontual apresentaram melhorias em sua estabilidade térmica. Os valores de Km para as enzimas imobilizadas de *K. lactis* e *A. oryzae* foram 49,69 e 55,29 mM, valores superiores àqueles verificados para as enzimas livres (19,11 e 17,37 mM, respectivamente), indicando possíveis alterações conformacionais na estrutura da proteína, resultantes do processo de imobilização. Os resultados indicaram que derivados não tratados com etilenodiamina, submetidos à imobilização covalente multipontual e bloqueio com glicina apresentaram os resultados mais expressivos para as condições estudadas de estabilidade ao armazenamento, estabilidade térmica e ciclos de reuso para hidrólise de lactose. Esses derivados não apresentaram distorções em relação às condições ótimas de temperatura e pH quando comparadas com as respectivas enzimas livres. As β – galactosidases de *A. oryzae* e *K. lactis* submetidas à imobilização covalente multipontual no suporte Immobead posteriormente bloqueado com glicina apresentaram as melhores propriedades para futura aplicação industrial.

Palavras-chave: β -galactosidase. Immobead 150. Imobilização enzimática. Lactose

ABSTRACT

The enzyme β - galactosidase is known to catalyze the hydrolysis of lactose and enable the formation of galactooligosaccharides. The main objective of this work was to study different immobilization conditions of β - galactosidase from *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces lactis* using Immobead commercial support. Both enzymes were immobilized in the support treated and not treated with ethylene diamine and submitted to uni and multipoint immobilization process. The derivatives were also evaluated about the blockage of the epoxy groups with glycine. The stability analysis under refrigeration storage, thermal stability, reuse cycles for lactose hydrolysis, determination of kinetic properties and determination of optimum pH and temperature were performed on derivatives obtained. The results of immobilization efficiency ranged from 30 to 50% and yield values ranged between 80 and 90%. Chemical modifications of support were performed using ethylenediamine in order to generate chemical modification of support, causing rapid adsorption of enzymes and favoring the formation of multipoint covalent attachment in lower time. It was found that support modified with ethylenediamine immobilized enzymes in shorter time, comparing to supports without modification. However, significant loss of activity observed for these supports during recycles suggests that the surface of the carrier may have been completely changed, hinder the formation of covalent bonds and allowing the leaching of enzymes to reaction medium. Non-blocked derivatives showed considerable loss of enzymatic activity during storage, indicating the occurrence of possible distortions of the enzyme caused by the interaction of free epoxy groups. Trials subjected to post-immobilization in alkaline pH showed improvements in their thermal stability. The K_m values for immobilized enzymes from *K. lactis* and *A. oryzae* were 49.69 mM and 55.29 mM, higher than those recorded for the free enzymes (19.11 mM and 17.37 mM, respectively), indicating possible conformational changes in the protein structure resulting caused by immobilization process. The results indicated that derivatives not treated with ethylenediamine, submitted to multipoint covalent immobilization and blocking with glycine showed the most significant results for the studied conditions of storage stability, thermal stability and reuse cycles for hydrolysis of lactose. These derivatives showed no distortions in relation to the optimal temperature and pH compared to the corresponding free enzymes. β - galactosidase from *A. oryzae* and *K. lactis* subjected to multipoint covalent immobilization on Immobead support subsequently blocked with glycine exhibited the best properties for future industrial application.

Keywords: β -galactosidase. Immobead 150. Enzymatic immobilization. Lactose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β – galactosidase ..	17
Figura 2. Propriedades da enzima e do suporte determinam as propriedades da enzima imobilizada.....	23
Figura 3. Técnicas de imobilização enzimática	23
Figura 4. Cinética de imobilização a 25°C.....	43
Figura 5. Cinética de armazenagem de β – galactosidase imobilizada em suporte	46
Figura 6. Cinética de inativação térmica de β – galactosidase imobilizada em suporte comercial Immobead.....	47
Figura 7. Ciclos de reúso para hidrólise de lactose.....	48
Figura 8 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima livre de <i>A. oryzae</i>	50

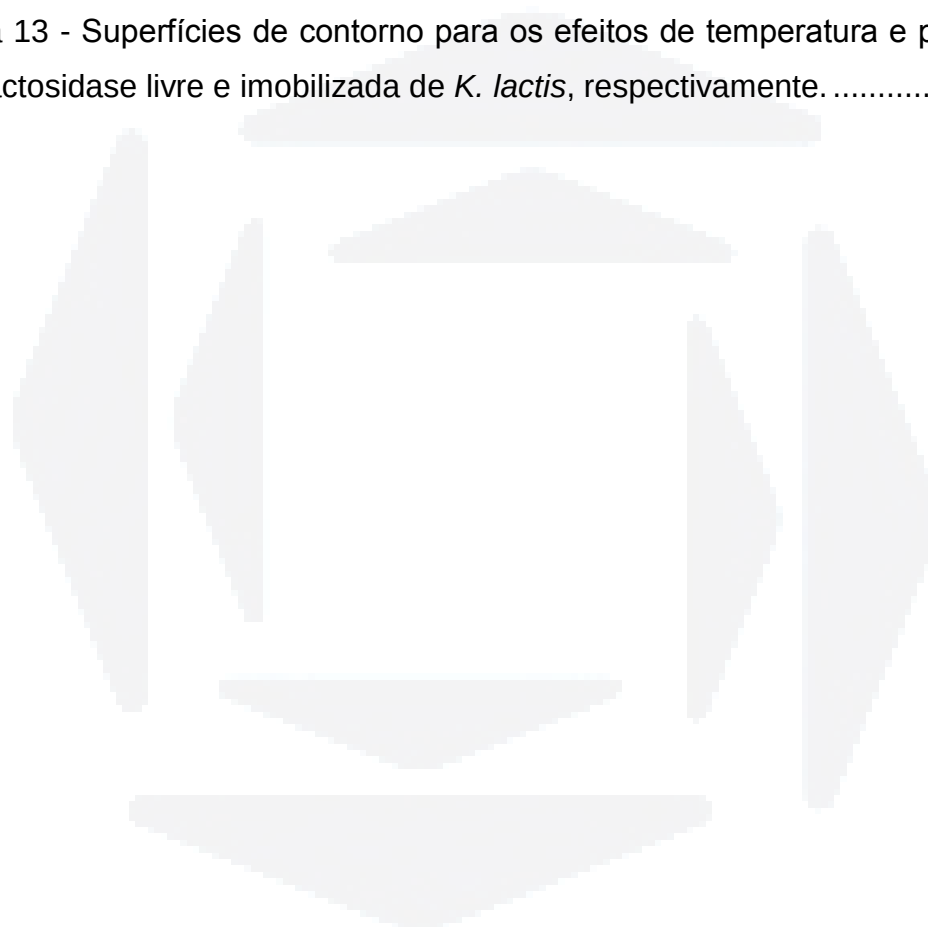
Figura 9 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima imobilizada de *A. oryzae* 51

Figura 10 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima livre de *K. lactis*..... 51

Figura 11 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima imobilizada de *K. lactis*..... 52

Figura 12 - Superfícies de contorno para os efeitos de temperatura e pH de β -galactosidase livre e imobilizada de *A. oryzae*, respectivamente 59

Figura 13 - Superfícies de contorno para os efeitos de temperatura e pH de β -galactosidase livre e imobilizada de *K. lactis*, respectivamente. 60



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de β -galactosidades de diferentes origens microbianas	20
Tabela 2. Classificação de suportes de acordo com sua composição	31
Tabela 3. Matriz do planejamento experimental para β -galactosidase de <i>A. oryzae</i> e <i>K. lactis</i> livre e imobilizada.	40
Tabela 4. Eficiência e rendimento de imobilização	44
Tabela 5. Determinação de parâmetros cinéticos para a enzima livre e imobilizada.	51
Tabela 6. Respostas do planejamento experimental para β -galactosidase de <i>A. oryzae</i> livre e imobilizada.	52
Tabela 7. Respostas do planejamento experimental para β -galactosidase de <i>K. lactis</i> livre e imobilizada.	53
Tabela 8. Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade de <i>A. oryzae</i> livre	54
Tabela 9. Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade imobilizada de <i>A. oryzae</i>	55
Tabela 10. Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade de <i>K. lactis</i> livre.....	55

Tabela 11. Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade imobilizada de <i>K. lactis</i>	56
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Lactose	16
2.2 Enzima β – galactosidase	17
2.3 Imobilização de enzimas	21
2.4 Técnicas de imobilização enzimática	23
2.4.1 Ligação a um suporte	24
2.4.2 Adsorção	24
2.4.3 Ligações covalentes	25
2.4.4 Ligações iônicas	27
2.4.5 Entrecruzamento	28
2.4.6 Inclusão	28
2.5 Suportes empregados em imobilização de enzimas	29
2.6 Imobilização de β – galactosidases	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Material	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Imobilização	35
3.2.1.1 Imobilização de β -galactosidase de <i>K. lactis</i>	36
3.2.1.2 Imobilização de β -galactosidase de <i>A. oryzae</i>	37

3.2.1.3 Modificação do suporte.....	37
3.2.1.4 Imobilização covalente multipontual	37
3.2.1.5 Bloqueio de grupamentos epóxi	38
3.2.2 Determinação da atividade enzimática e teor de proteína	38
3.2.3 Estabilidade ao armazenamento	38
3.2.4 Estabilidade térmica	39
3.2.5 Ciclos de reuso para hidrólise de lactose	39
3.2.6 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada	40
3.2.7 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Cinética de Imobilização	42
4.2 Ensaio de imobilização em condições diversas	43
4.3 Estabilidade durante o armazenamento	45
4.4 Estabilidade térmica	47
4.5 Ciclos de reuso para hidrólise de lactose	48
4.6 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada....	49
4.7 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH da enzimas livre e imobilizada	52
5 CONCLUSÃO.....	60
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICES.....	70
Apêndice A - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade de <i>Aspergillus oryzae</i> ^a	70
Apêndice B - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade imobilizada de <i>Aspergillus oryzae</i> ^a	70
Apêndice C - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade de <i>Kluyveromyces lactis</i> ^a	71
Apêndice D - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade imobilizada de <i>Kluyveromyces lactis</i> ^a	71

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são consideradas uma grande descoberta na área de processos biotecnológicos, sendo amplamente empregadas em diversos setores devido à sua facilidade de produção, especificidade ao substrato e caráter sustentável (DATTA et al., 2013). Uma vasta gama de enzimas atua em condições brandas de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação consideravelmente superiores às aquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais. Sua elevada especificidade permite reduzir a quantidade de resíduos gerados, garantindo maior rendimento de processo e consequente vantagem econômica (MENDES et al., 2011).

Para uma ampla aplicação, a possibilidade de reuso de enzimas se torna mandatório, por restrições econômicas relacionadas com seu processo de obtenção (DATTA et al., 2013). A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes podem ser superadas por meio da imobilização (MENDES et al., 2011).

Em geral, as técnicas de imobilização enzimática visam permitir processos contínuos, reuso de enzima, aumento de estabilidade enzimática,

resistência a condições extremas de pH, temperatura e força iônica. Em diversos casos, a perda de atividade enzimática é compensada pela possibilidade de reuso da enzima (JOCHEMS, 2011).

Lactases ou β -galactosidases catalisam a hidrólise da lactose e são amplamente aplicadas na indústria de alimentos com o intuito de promover dulçor, solubilidade, sabor, além de sua aplicação em produtos lácteos, no desenvolvimento de alimentos com teor de lactose reduzido ou como coadjuvante de tecnologia na produção de doce de leite, por exemplo (VASILEVA, 2012). Em geral, lactases fúngicas possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Dessa forma, é possível selecionar a enzima mais adequada para determinada aplicação (KLEIN, 2010).

Suportes epóxi são reconhecidos por permitirem a estabilização de proteínas por meio da formação de ligações covalentes multipontuais. Immobead 150[®] é um novo suporte comercial formado de polímeros de metacrilato e contendo grupos epóxi em sua região superficial. Até o desenvolvimento do presente trabalho não foram identificados estudos voltados para a aplicação desse suporte na imobilização de β -galactosidases.

Com base no exposto, o trabalho teve como objetivo geral imobilizar a enzima β – galactosidase em suporte comercial Immobead 150[®]. Para tanto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar diferentes condições de imobilização de β – galactosidases obtidas de duas fontes microbianas distintas: A levedura *Kluyveromyces lactis* e o fungo *Aspergillus oryzae*;
- Verificar os efeitos da modificação química do suporte nos parâmetros de imobilização;
- Avaliar a estabilidade ao armazenamento refrigerado e a estabilidade térmica dos derivados;
- Determinar os ciclos de reuso da enzima imobilizada para hidrólise de lactose;
- Comparar os parâmetros cinéticos dos derivados obtidos de cada fonte microbiana;

- Determinar condições de pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima livre e imobilizada utilizando a ferramenta de planejamento experimental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lactases ou β -galactosidases catalisam a hidrólise da lactose e são amplamente aplicadas na indústria de alimentos com o intuito de promover dulçor, solubilidade, sabor, além de sua aplicação em produtos lácteos, no desenvolvimento de alimentos com teor de lactose reduzido ou como coadjuvante de tecnologia na produção de doce de leite, por exemplo (VASILEVA et al., 2012). Em geral, lactases fúngicas possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Dessa forma, é possível selecionar a enzima mais adequada para determinada aplicação (KLEIN, 2010).

A seguir, serão abordados aspectos relacionados à diferentes técnicas de imobilização enzimática, com destaque para estudos focados na imobilização de β – galactosidases e sua aplicação na hidrólise de lactose e síntese de galactooligossacarídeos.

2.1 Lactose

A lactose (β -D-galactopiranosil- α -D-glucopiranoose) é um dissacarídeo com leve dulçor, significativamente menos solúvel em relação aos seus monossacarídeos constituintes e está presente no leite de todos os mamíferos, sendo sua única fonte natural. Inicialmente, a lactose provê energia ao filhote (cerca de 17 kJ por grama de lactose). A lactose não pode ser absorvida diretamente na corrente sanguínea, sendo primeiramente hidrolisada por β -galactosidases endógenas em glicose e galactose. Naturalmente, jovens mamíferos precisam dessa enzima, porém, após a amamentação, a quantidade de enzima produzida decai para um nível insignificante (WALSTRA et al., 2006).

A intolerância à lactose é provocada pela má digestão e consequente má absorção de lactose. Está associada à deficiência do organismo de alguns indivíduos em sintetizar a enzima β -galactosidase (KOCIÁN, 1988). Esse

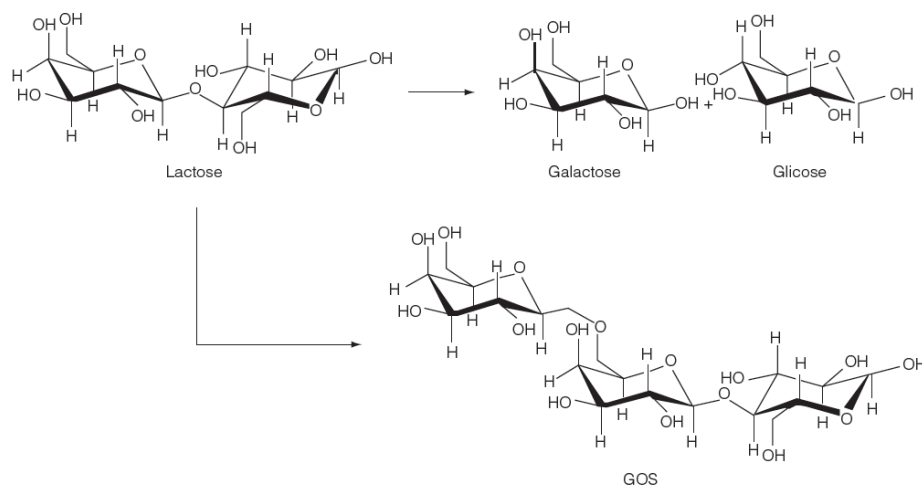
problema afeta cerca de 70% da população adulta mundial, com impactos significativos na África, Ásia, América e povos nativos da Oceania e seus descendentes, nos quais a incidência pode ser superior a 90% (MARTINS et al., 2011). Essas pessoas, ao beberem leite, aumentam consideravelmente a atividade da flora intestinal. Como consequência, observa-se o desenvolvimento de dores abdominais, flatulência e diarreia (WALSTRA et al., 2006).

A lactose pode ser hidrolisada por meio de processos ácidos ou enzimáticos (FREITAS et al., 2011). A hidrólise ácida requer uso de reagentes em altas concentrações e a reação ocorre em temperaturas elevadas. Como consequência, são verificadas alterações sensoriais intensas associadas à reação de Maillard promovida nessas condições. Dessa forma, a hidrólise enzimática da lactose é a opção comumente empregada na indústria de alimentos (HATZINIKOLAOU et al., 2005).

Tecnologicamente, a lactose cristaliza facilmente, o que limita sua aplicação na indústria de laticínios. A hidrólise da lactose promove dulçor, permite o consumo de derivados lácteos por pessoas com restrições de dieta relacionadas com a intolerância à lactose e aumenta a qualidade do produto e a eficiência do processo na indústria de laticínios (HARJU et al., 2012).

2.2 Enzima β – galactosidase

Atribui-se à enzima β -galactosidase (ou lactase) a propriedade de catalisar a reação de hidrólise de resíduos terminais não redutores de β -D-galactose em β -D-galactosídios (OLIVEIRA et al., 2011). Em condições específicas de processamento, β -galactosidases são capazes de catalisar a reação de formação de galactooligossacarídeos (GOS), carboidratos considerados prebióticos e que apresentam propriedades tecnológicas e nutricionais reconhecidas (LISBOA, 2012; MARTINS et al., 2011). As rotas enzimáticas de hidrólise e transgalactosilação são representadas na Figura 1.

Figura 1 - Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β – galactosidase

Fonte: MARTINS e BURKERT, 2009

Lactases podem ser obtidas através de micro-organismos, plantas e animais, apresentando propriedades distintas de acordo com sua origem. A obtenção de enzimas a partir de micro-organismos possui diversas vantagens frente às demais fontes, como facilidade de manuseio, alta taxa de multiplicação e rendimentos elevados. A Tabela 1 resume as principais fontes microbianas de β -galactosidase e suas propriedades (PANESAR et al., 2010).

As leveduras constituem uma importante fonte de β -galactosidase do ponto de vista industrial. Apresentam atividade ótima em pH neutro, facilitando sua aplicação na hidrólise de lactose em leites e seus derivados e são amplamente aceitas para aplicação em alimentos (PANESAR et al., 2010). A enzima β -galactosidase produzida pela levedura *Kluyveromyces lactis* é homodimérica e 45% glicosilada, com peso molecular estimado em 228 kDa. As condições ótimas de atividade hidrolítica ocorrem em pH 7,0 e temperatura de 37 °C (ANSARI e HUSAIN, 2011; HARJU et al., 2012).

Lactases fúngicas são comumente empregadas na hidrólise de soro ácido por apresentarem atividade ótima em pH inferior a 6,0, apesar de apresentarem maior suscetibilidade à inibição causada pelos produtos da reação, sobretudo galactose (FREITAS et al., 2011). De acordo com Tello Solís et al. (2005), a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* possui estrutura monomérica, apresentando peso molecular de aproximadamente 90 kDa. As

condições ótimas de atividade ocorrem em pH 4,5 e temperatura de 50 °C (GROSOVA et al. 2008, HUSAIN, 2010).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de β -galactosidases de diferentes origens microbianas

Fonte	Peso molecular (kDa)	pH ótimo ¹	Temperatura de operação (° C)	Ativadores	Inibidores iônicos ²
<i>Aspergillus niger</i>	124	3,0-4,0	55-60	desnecessário	Nenhum
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5,0-6,2	50-55	desnecessário	Nenhum
<i>Kluyveromyces lactis</i>	228	6,5-7,3	35	K, Mg, Mn	Ca, Na
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	201	6,6	37	K, Mg, Mn	Ca, Na
<i>Escherichia coli</i>	464	7,2	40	Na, K, Mg	-
<i>Bacillus circulans</i>	240	6,0	60	desnecessário	-
<i>Bacillus subtilis</i>	88	6,5-7,0	50	desnecessário	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	116	5,8-6,4	65	Mg	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	540	6,2-6,6	55	Mg	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	464	7,1	55	Na, K, Mg	Ca

1. Dependente da fonte/cepa

2. Espécies iônicas comumente encontradas em produtos lácteos; hífen indica dado indisponível

Fonte: HARJU et al., 2012

O uso de β -galactosidase na hidrólise da lactose presente no leite e em seus derivados pode promover uma série de benefícios: Aliviar sintomas de intolerância à lactose; Promover melhorias tecnológicas no processo, minimizando ou eliminando problemas relacionados com a baixa solubilidade e baixo dulçor da lactose. Além disso, a hidrólise da lactose pode gerar uma redução significativa no tempo de processos fermentativos, na fabricação de iogurtes e queijos, por exemplo. Outro benefício de grande importância é a possibilidade de agregar valor ao soro de queijo, cujo descarte inadequado constitui um grave problema ambiental (PANESAR et al., 2010; PRAZERES et al., 2012).

Há duas abordagens para a aplicação industrial de β -galactosidases: o uso da enzima livre, em solução, ou imobilizada em suportes. Sua aplicação na forma livre é tecnicamente simples, porém limita sua reutilização e representa um impacto econômico significativo devido ao alto custo de obtenção e purificação de enzimas (OLIVEIRA et al., 2011).

A legislação brasileira estabelece, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes micro-organismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces* sp. (BRASIL, 2006). Tais espécies são classificadas como “geralmente reconhecidos como seguros” (*Generally Recognized as Safe* – GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias. Atualmente, as principais fontes comerciais aplicadas na indústria de alimentos são obtidas de diferentes espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Kluyveromyces* (HUSAIN, 2010).

2.3 Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas foram primeiramente definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser utilizadas repetitiva e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

Possivelmente, a primeira referência sobre imobilização de enzimas foi o estudo publicado por Nelson e Griffin (1916), o qual descreve a conservação da atividade catalítica de invertase adsorvida em carvão ativado e alumina.

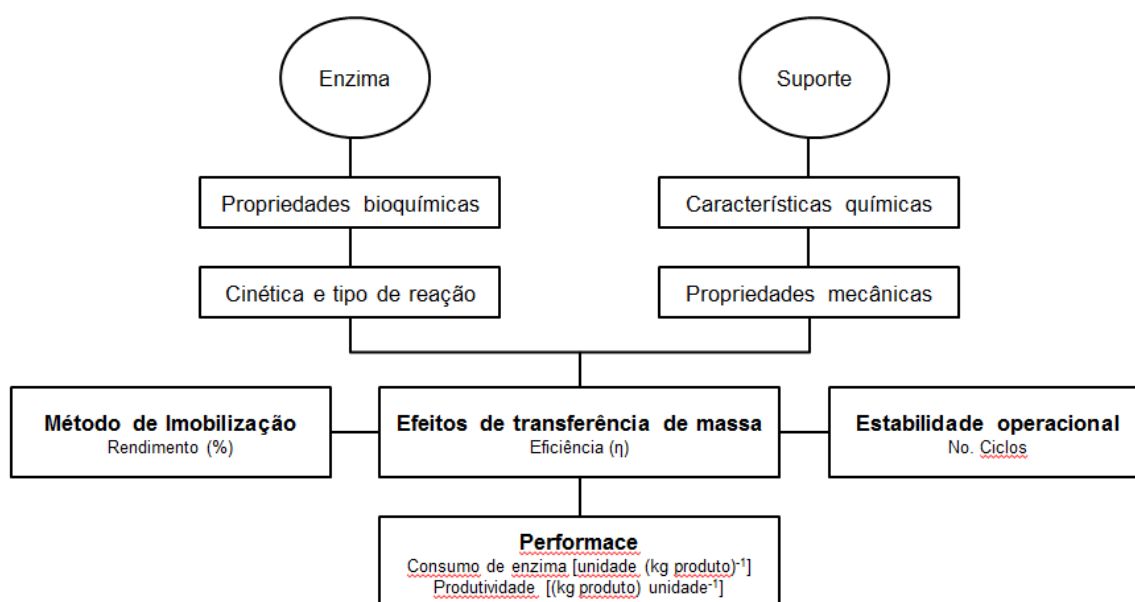
A primeira aplicação industrial de enzimas imobilizadas foi reportada por Tosa et al. (1969), na qual a empresa Tababe (Seiyaku, Japão) desenvolveu colunas de aminoacilase imobilizada de *Aspergillus oryzae* para a síntese de enantiômeros de aminoácidos opticamente ativos, a partir de sua forma racêmica sintética. Por volta de 1970, outros dois sistemas imobilizados foram lançados em escala piloto. Na Inglaterra, utilizou-se penicilina amidase para preparar ácido amino penicílico e nos Estados Unidos, glicose isomerase imobilizada foi empregada para converter glicose em frutose (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000)

Avanços recentes na área de biotecnologia têm promovido o uso de enzimas imobilizadas em um vasto campo de aplicação. Merecem destaque pesquisas voltadas para o melhoramento de técnicas de imobilização enzimática, novos métodos para a produção de compostos de interesse por meio de biocatalisadores, transporte de princípios ativos e identificação de tumores, uso de enzimas como biossensores, assim como o desenvolvimento de biorreatores de alta eficiência para a aplicação dessas enzimas (SPAHN e MINTEER, 2008).

A imobilização de enzimas possibilita catálises heterogêneas de reações enzimáticas. Vantagens ecológicas, econômicas e toxicológicas também são de igual importância. Ainda, a separação de produtos se torna fácil e, em muitos casos, traz reduções econômicas e gera menos efluentes, reduzindo assim os impactos ambientais (MILETIC et al., 2012).

As propriedades verificadas em enzimas imobilizadas estão relacionadas com propriedades da própria enzima e características do suporte utilizado. Sua combinação confere uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. A Figura 2 apresenta um modelo esquemático que estabelece as relações entre enzima e suporte e sua influência nas propriedades da enzima imobilizada.

Figura 2 - Propriedades da enzima e do suporte determinam as propriedades da enzima imobilizada



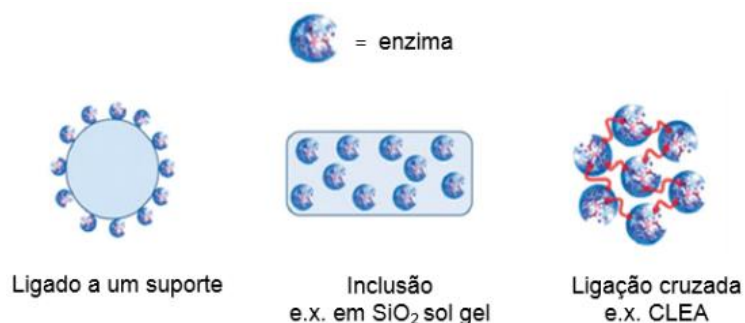
Fonte: MILETIC et al., 2012

2.4 Técnicas de imobilização enzimática

De acordo com Sheldon e Van Pelt (2013), o processo de imobilização enzimática deve atender a dois requisitos: a reação deve ocorrer de forma que a perda de atividade enzimática não seja elevada e um número relativamente alto de grupos reativos da enzima deve estar envolvido na reação. Além disso, diferentes regiões da superfície da enzima possuem relevância distinta para sua estabilidade.

Basicamente, os métodos para imobilização de enzimas podem ser divididos em três categorias: ligação à um suporte, intercruzamento e inclusão, conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Técnicas de imobilização enzimática



Fonte: SHELDON e VAN PELT, 2013

2.4.1 Ligação a um suporte

A ligação a um suporte pode ser física (método comumente descrito como adsorção, obtido por meio de ligações hidrofóbicas e de Van der Waals), de natureza covalente ou iônica. Interações físicas são geralmente muito fracas para manter a enzima fixada ao suporte sob condições severas de processamento industrial, onde são empregados produtos e reagentes concentrados, com força iônica elevada (SHELDON e VAN PELT, 2013).

2.4.2 Adsorção

A adsorção física de enzimas é a abordagem mais simples (SHELDON e VAN PELT, 2013). Esse método causa pouca influência na conformação da enzima. Além disso, enzimas adsorvidas são protegidas de agregação, proteólise e interação com interfaces hidrofóbicas (DATTA et al., 2013). Por outro lado, enzimas imobilizadas por essa técnica são facilmente lixiviadas, contaminando o substrato. A adsorção física também pode causar desnaturação, de acordo com a natureza química da superfície do suporte (SPAHN e MINTEER, 2008).

Métodos de adsorção usam suportes insolúveis em água como derivados de polissacarídeos, polímeros sintéticos, vidros, alumina, bentonite, amberlite CG-50, entre outros (HUSAIN, 2010; DATTA et al., 2013). Resinas acrílicas porosas como Amberlite XAD-7 também são utilizadas para imobilizar enzimas via adsorção. Por exemplo, lipase B, obtida de *Candida antarctica* é comercialmente disponibilizada na forma imobilizada como Novozym[®] 435, o qual consiste na enzima adsorvida em uma resina acrílica porosa (ZHAO, 2010).

2.4.3 Ligações covalentes

Ligações covalentes entre enzimas e suportes ocorrem devido a sua cadeia lateral de aminoácidos como lisina, arginina, ácido aspártico, histidina, com base no grau de reatividade de diferentes grupos funcionais como imidazol, indol, fenólico, hidroxil (COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). De acordo com Tran e Balkus (2012), o emprego de ligações covalentes entre enzimas e suportes sólidos é a forma mais efetiva de prevenir sua dessorção.

A desvantagem associada a ligações covalentes é o uso de elementos orgânicos, com a finalidade de ativar grupamentos funcionais presentes no suporte e que podem causar desnaturação proteica. Ligações próximas ao sítio ativo da enzima ou a resíduos de aminoácidos, vitais para sua adequada imobilização, podem causar inativação enzimática. É recomendado que o processo de imobilização ocorra na presença do substrato ou de um inibidor competitivo de forma a proteger grupamentos funcionais do sítio ativo na matriz do suporte, geralmente ativados por meio de reagentes químicos como brometo de cianogênio, carbodimida e glutaraldeído (PANESAR et al., 2010).

Em alguns casos, a atividade relativa de uma enzima imobilizada por meio de ligações covalentes é consideravelmente baixa devido à restrição de mobilidade entre moléculas da proteína, comprometendo alterações conformacionais essenciais durante a catálise. Entretanto, a possibilidade de redução de custos de produção por meio da recuperação e reuso de enzimas imobilizadas covalentemente potencializa sua aplicação (MILETIC et al., 2012).

Fernandez-Lorente et al. (2001) verificaram aumento na enantioseletividade de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em glicil-agarose por meio da técnica de ligação covalente multipontual. De acordo com os autores, esse aumento pode estar associado a distorções na estrutura da enzima o que explica a perda de atividade enzimática verificada.

Dentre uma série de suportes disponíveis para a ligação covalente de enzimas, merecem destaque os suportes contendo grupamentos epóxi em sua superfície. De acordo com Mateo et al. (2007), suportes epóxi apresentam espaçadores curtos e possuem elevada estabilidade em pH neutro. São reconhecidos por sua capacidade de promover ligações covalentes multipontuais intensas com diferentes nucleófilos presentes na superfície de enzimas (amino, tiol, hidroxil, etc.). Variáveis como tempo de reação, pH do tampão utilizado, temperatura, presença de inibidores influenciam diretamente na formação de ligações covalentes multipontuais (MATEO et al., 2002).

Suportes comerciais Sepabeads EC – EP, contendo grupamentos epóxi e Sepabeads EC – HFA, contendo grupamentos amino, foram empregados na imobilização de β -galactosidase de *Bacillus circulans*. Para a imobilização em Sepabeads EC – EP, a melhor condição de imobilização verificada empregou tampão fosfato de potássio 1,4 M pH 8,5 por um período de 48 h. Para a enzima imobilizada em Sepabeads EC – HFA, as condições pré-selecionadas consistiram em incubar o sistema enzima-suporte em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,5 ou 8,5 por um período de 24 h. Outro protocolo para esse suporte avaliou a incubação em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,5 por 6 h seguido de incubação em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,5 por 18 horas. Para avaliar a formação de ligações covalentes multipontuais, os derivados obtidos foram incubados por um período adicional de 8 ou 24 h em tampão fosfato de potássio 1,4 M (Sepabeads EC – EP) ou 20 mM (Sepabeads EC – HFA) pH 8,5 antes do bloqueio com glicina 3,0 M. Os autores atingiram as condições ótimas de rendimento, eficiência e termo-estabilidade em experimentos submetidos à pós-imobilização em pH alcalino. Os resultados sustentam as vantagens de se promover a ligação multipontual de enzimas multiméricas em protocolos de imobilização covalente que empreguem suportes contendo grupamentos epóxi (TORRES e BATISTA-VIEIRA, 2012A).

Alguns estudos apontaram a baixa reatividade de proteínas solúveis à suportes epóxi-ativados mesmo em condições alcalinas (MATEO et al., 2007). Tais resultados motivaram estudos voltados para a modificações desses suportes a partir da introdução de grupamentos reativos diversos, como etilenodiamina, por exemplo (KHAN et al., 2012). A partir dessa abordagem, surge o conceito de imobilização covalente em duas etapas. O mecanismo inicia em pH neutro em elevada concentração iônica, com o intuito de promover uma rápida adsorção do maior número de enzimas envolvidas no processo. Em seguida, o sistema é submetido à imobilização em pH alcalino em condições de baixa força iônica. Nessas condições, a imobilização ocorre através da formação de ligações covalentes multipontuais através de grupamentos amino, fenol ou tiol presentes na superfície da enzima (MATEO et al., 2007; TORRES-SALAS et al., 2011).

2.4.4 Ligações iônicas

A adsorção de proteínas em resinas iônicas é uma das técnicas mais simples para purificação e imobilização de proteínas. A adsorção de proteínas nessas matrizes requer a formação de ligações multipontuais envolvendo diversos grupos presentes na superfície da proteína. As principais vantagens dessa técnica são a simplicidade, rapidez do processo de imobilização e a possibilidade de reuso do suporte após a remoção da enzima (HUSAIN, 2010).

Em um estudo publicado por Pessela et al. (2003), duas resinas iônicas foram empregadas para a imobilização de uma β -galactosidase termofílica de *Thermus* sp.: Sepabeads revestido com polímeros de polietilenoimina ou DEAE – agarose. O processo de imobilização ocorreu rapidamente em ambos os suportes, porém o suporte Sepabeads modificado minimizou a inibição pelos produtos formados, permitindo a hidrólise completa em produtos lácteos.

Guidini et al. (2010) estudaram a cinética da reação de hidrólise de lactose a partir de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A568, utilizando glutaraldeído como agente entrecruzante. Os parâmetros cinéticos indicaram que a enzima imobilizada apresentou maior termo-estabilidade quando comparada com a enzima livre.

Além disso, o derivado obtido conservou 90% de sua atividade inicial após 30 ciclos de hidrólise e não houve perda de atividade após 3 meses de estocagem em pH 4,5 e 4 °C.

2.4.5 Entrecruzamento

A técnica de entrecruzamento foi apresentada por Quioco e Richards (1964) por meio da reação de grupamentos amina presentes na superfície da enzima e agentes químicos bifuncionais. No mesmo ano, os autores publicaram um estudo voltado para entrecruzamento de carboxipeptidase-A cristalizada, utilizando glutaraldeído como agente entrecruzante.

Técnicas que dispensam o uso de suportes, como o entrecruzamento de enzimas solubilizadas, cristalizadas, atomizadas e agregados enzimáticos, são diferenciadas entre si pelas etapas empregadas para obtenção do intercruzamento (MILETIC et al., 2012).

O entrecruzamento de agregados de enzima ou cristais utilizando um reagente bifuncional é usado para preparar macropartículas livres de suportes. Suportes inevitavelmente geram diluição da atividade devido à introdução de uma grande porção de material não catalítico, representando incrementos de massa de, no mínimo, 90% (SHELDON e VAN PELT, 2013). A técnica de intercruzamento é empregada, sobretudo, em conjunto com outras técnicas de imobilização com o objetivo de promover estabilidade à enzimas adsorvidas, prevenindo a lixiviação da enzima (HUSAIN, 2010).

2.4.6 Inclusão

A técnica de inclusão corresponde ao confinamento físico de enzimas em um espaço restrito. Trata-se de uma técnica de fácil aplicação na qual partículas esféricas podem ser obtidas gotejando-se uma suspensão de polímero em um meio contendo íons positivamente carregados ou por meio de polimerização térmica. A principal limitação dessa técnica reside na possibilidade de lixiviação lenta de enzima ao longo de sua utilização.

Entretanto, a técnica pode ser melhorada com o uso de agentes ligantes. As matrizes utilizadas para imobilização são constituídas geralmente de materiais poliméricos com alginato de cálcio, ágar, κ – carragena, poliacrilamida e colágeno. Algumas matrizes sólidas com carbono ativado, cerâmica porosa e terra diatomácea também podem ser aplicadas. As membranas comumente usadas nessa técnica são constituídas de náilon, celulose, polisulfona e poliacrilamida (PANESAR et al., 2010).

A inclusão de enzimas em membranas poliméricas constitui um método rápido e simples. A maior limitação é a impossibilidade de interação entre a enzima imobilizada e substratos de alto peso molecular que são incapazes de permear a matriz (HUSAIN, 2010). Membranas de polipropileno podem ser empregadas na imobilização de enzimas pela técnica de inclusão. Entretanto, a ausência de grupos funcionais torna sua modificação química mandatória. Valiseva et al. (2012) estudaram a modificação de membranas de polipropileno a partir de sete reagentes químicos com o intuito de introduzir grupamentos amina, permitindo a imobilização de β – galactosidase de *Escherichia coli*. Glutaraldeído foi utilizado como agente entrecruzante e a membrana modificada com hexametilenodiamina (HMDA) reteve a maior atividade relativa (92,8%). A mesma membrana gerou o derivado mais estável frente a diferentes condições de pH, temperatura e estocagem sob refrigeração. Os autores concluíram que o agente HMDA, contendo longas cadeias alifáticas, evitou a influência de cargas superficiais da membrana na atividade enzimática.

Mammarella e Rubiolo (2005) demonstraram a imobilização de β – galactosidase de *K. fragilis* através da técnica de inclusão utilizando um gel híbrido de alginato e carragena. A presença de carragena causou impacto positivo na reação catalisada pela enzima por apresentar íons de potássio em sua composição, os quais promovem aumento da atividade enzimática de β – galactosidasas.

2.5 Suportes empregados em imobilização de enzimas

De acordo com Galvão (2004), os suportes utilizados para imobilização de enzimas incluem uma grande variedade de materiais, como matrizes

inorgânicas (sílica, vidro de porosidade controlada, celite), polissacarídeos (agarose, alginato, quitosana, celulose) e polímeros sintéticos (resinas de acrílico). A Tabela 2 apresenta a classificação de suportes de imobilização de acordo com sua composição.

Os suportes podem ainda ser classificados como porosos ou não-porosos. Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protegem a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas eliminam o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido (GALVÃO, 2004).

Tabela 2 - Classificação de suportes de acordo com sua composição

Suportes				
Orgânicos			Inorgânicos	
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro (PC)
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)
Ágar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliâmidas		Óxido de Ferro
Amido		Vinil		
		Poliacrilamidas		

Fonte: GALVÃO, 2004

Segundo Miletic et al. (2012), as características do suporte são fundamentais no processo de imobilização enzimática. Suas características físicas irão determinar o tipo de sistema mais adequado ao processo de imobilização (tanque em agitação, fluidização, leito fixo, etc.). Embora não exista um suporte universal, certas características devem ser consideradas em sua escolha:

1. Estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano;

2. Funcionalidade química;
3. Durabilidade e capacidade de reutilização;
4. Elevada área superficial e alta porosidade;
5. Compatibilidade aceitável com a enzima e substrato;
6. Tamanho e forma adequados;
7. Custo;
8. Facilidade de manuseio.

Para se obter uma imobilização eficiente é indispensável conhecer previamente as características da enzima, do suporte e das possíveis interações entre eles. Se a interação da enzima com o suporte não for estável o suficiente, pode vir a ocorrer, por exemplo, perda de enzima para o meio ao longo do processo. Além disso, se a afinidade da enzima com o suporte for maior do que com o substrato, a eficiência do processo estará comprometida (LASKIN, 1985).

2.6 Imobilização de β – galactosidases

Com o objetivo de promover aumento de estabilidade, possibilidade de reuso e sua aplicação em processos contínuos, a enzima β – galactosidase tem sido imobilizada em suportes orgânicos e inorgânicos via adsorção, ligações covalentes, agregação química, microencapsulação e inclusão (HUSAIN, 2010). A seguir serão relatados estudos voltados para a imobilização de β – galactosidase utilizando diversas técnicas de imobilização e sua aplicação na hidrólise de lactose e síntese de GOS.

Szczodrak (2000) estudou a imobilização de β – galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em vidro poroso silanizado modificado com glutaraldeído. O derivado obtido reteve mais de 90% de sua atividade inicial e foi utilizado na hidrólise de permeado de soro a 50 °C, pH 6,0. O percentual de conversão de lactose variou de 86 a 90% no processo contínuo e em batelada.

Rejikumar e Surekha (2001) avaliaram o processo de hidrólise de lactose e soro de queijo a partir de β – galactosidase imobilizada em quitosana.

As condições de processo foram 50 °C, pH 5,0, atingindo um percentual de conversão de lactose de 95%.

Ebrahimi et al. (2010) estudaram a síntese de GOS a partir de lactose utilizando β – galactosidase (*K. lactis*) imobilizada em membrana de cerâmica, resultando em uma concentração de 38% (m/m) de oligossacarídeos quando o tempo médio de residência da solução de lactose foi de 24 minutos, com uma concentração inicial de lactose de 30% (m/m).

Tecido de algodão foi utilizado como suporte de imobilização para um agregado formado por polietilenoimina (PEI) e β – galactosidase de *A. oryzae*. A partir dessa técnica, foi possível imobilizar cerca de 250 mg/g de suporte e o derivado obtido apresentou cerca de 95% de eficiência. A síntese de GOS foi estudada em processo contínuo e foi observada uma produção máxima de 26% (m/m) de GOS a partir de uma solução de lactose de 400 mg/L em pH 4,5 e 40° C, obtendo um conversão de lactose de 50% (ALBAYRAK e YANG, 2002).

Ansari e Husain (2011) estudaram a imobilização de β – galactosidase de amêndoa (*Amygdalus communis*) em alginato de cálcio-celulose revestido com Concanavalina A, empregando glutaraldeído como agente inter cruzante. O derivado obtido reteve 72% de sua atividade inicial e as condições ótimas de pH e temperatura não sofreram alterações em relação à enzima livre e houve promoção da estabilidade térmica no derivado (60° C). Por outro lado, o derivado obtido sofreu maior inibição aos produtos formados e taxa de conversão de lactose foi menor em relação à enzima livre.

Vasileva et al. (2012) estudaram a imobilização de lactase em membrana de polipropileno modificada por 13 agentes químicos distintos. Nesse estudo, a membrana modificada com solução alcoólica (10%) de hexametilenodiamina apresentou os melhores resultados para os parâmetros estudados quando comparado com os demais derivados: pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH, estabilidade térmica e estabilidade em álcoois. Além disso, o derivado obtido manteve 90% da sua atividade inicial por 300 dias.

Torres e Batista-Vieira (2012B) otimizaram as condições de imobilização de β – galactosidase de *Bacillus circulans* em suportes acrílicos comerciais contendo grupamentos epóxi: Eupergit C, Eupergit C 250 L e Sepabeads EC – EP. Nesse estudo, foi verificado aumento da estabilidade térmica em derivados

submetidos à pós-incubação em pH alcalino. Esse efeito foi aumentado em derivados bloqueados com glicina. Esse efeito foi mais pronunciado quando foram utilizados suportes Eupergit. O tempo de meia vida verificado em derivados de Eupergit foi 10 vezes superior em relação aos derivados obtidos de Sepabeads. O grau de hidrólise obtido em processo contínuo variou de 80 a 90% após 2 horas de incubação a 50° C e foi similar entre os derivados de Eupergit C e Eupergit C 250 L. Para o processo em batelada, os derivados foram reutilizados em até 6 ciclos de hidrólise de soro de queijo.



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os ensaios de imobilização enzimática utilizaram enzimas β -galactosidase comerciais de *Kluyveromyces lactis* (enzima líquida, Lactomax Pure) e *Aspergillus oryzae* (enzima sólida, Lactomax F30), gentilmente cedidas pela empresa Prozyn (Butantã, São Paulo, Brasil). O suporte comercial Immobead 150[®], um copolímero de metacrilato contendo grupamento epóxi, cujo tamanho de partícula varia de 0,15 a 0,30 mm, foi adquirido da empresa Sigma – Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil, bem como os reagentes *o*-NPG (*o*-nitrofenil- β -galactopiranosídeo) e etilenodiamina (EDA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Imobilização

Foram selecionados 8 derivados de cada uma das enzimas estudadas a partir de condições de pH, força iônica e carga enzimática previamente definidas. Avaliou-se a influência do bloqueio de grupamentos epóxi presentes no suporte utilizando glicina. Além disso, estudou-se os efeitos da imobilização em pH alcalino (pH 10,0; 0,1 M; 48 h) na formação de ligações covalentes multipontuais entre enzima e suporte. As condições de imobilização estudadas para as enzimas estão representadas no Quadro 1. O tempo de imobilização foi definido a partir do acompanhamento prévio da curva de imobilização dos testes K1 e K2, A1 e A2.

O rendimento foi calculado através da relação percentual entre o teor de proteína cedido e o teor de proteína imobilizado ao final do processo. A eficiência do processo de imobilização foi definida como a relação percentual entre as atividades específicas (U/mg) verificadas na enzima solúvel e na enzima imobilizada.

Quadro 1 - Condições de imobilização estudadas para a enzima de *K. lactis* e *A. oryzae*.

Codificação do Teste	Força iônica	Tempo de imobilização
K1 K1G K1M K1MG	0,75 M	48 h
K2 K2G K2M K2MG	50 mM	72 h
A1 A1G A1M A1MG	0,75 M	24 h
A2 A2G A2M A2MG	50 mM	48 h

K: origem da enzima (*K. lactis*)

A: origem da enzima (*A. oryzae*)

1: Suporte Immobead

2: Suporte Immobead modificado com EDA

G: teste bloqueado com glicina

M: imobilização multipontual

3.2.1.1 Imobilização de β -galactosidase de *K. lactis*

Um total de 0,5 g de suporte foram suspendidos em 5 mL de solução enzimática contendo carga proteica de 5 mg em tampão fosfato de sódio pH 7,0 com forças iônicas de 0,75 M ou 50 mM. O sistema foi mantido em agitação branda a 10° C em banho termo-estabilizado durante 48 ou 72 horas. Amostras periódicas de sobrenadante e suspensão enzimática foram coletadas para quantificação da atividade enzimática, determinada através de

acompanhamento espectrofotométrico (415 nm) da taxa de formação de orto-nitrofenol a 37° C.

3.2.1.2 Imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae*

Um total de 0,5 g de suporte foram suspensos em 5,0 mL de solução enzimática contendo carga proteica de 5,0 mg em tampão acetato de sódio pH 4,5 com forças iônicas de 0,75 M ou 50 mM. O sistema foi mantido em agitação branda a 10° C em banho termo-estabilizado durante 24 ou 48 horas. Amostras periódicas de sobrenadante e suspensão enzimática foram coletadas para quantificação da atividade enzimática, determinada através de acompanhamento espectrofotométrico (415 nm) da taxa de formação de orto-nitrofenol a 55° C.

3.2.1.3 Modificação do suporte

O suporte foi modificado com EDA de acordo com o método proposto por Mateo et al. (2007). Incubou-se 1,0 g de suporte em 10,0 mL de solução de EDA 0,3 M, pH 8,5 à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, o suporte foi filtrado, lavado com água destilada sucessivas vezes até atingir pH 7,0 e acondicionado a 10° C durante 24 horas.

3.2.1.4 Imobilização covalente multipontual

Os ensaios selecionados foram incubados em pH alcalino com o intuito de promover a formação de ligações multipontuais entre enzima e suporte. Os derivados previamente filtrados foram incubados com 10,0 mL de solução de fosfato de potássio 0,1 M, pH 10,0; permaneceram em repouso durante 48 horas a 10,0° C e foram submetidos à filtração após esse período.

3.2.1.5 Bloqueio de grupamentos epóxi

O bloqueio do suporte foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Mateo et al. (2007). Adicionou-se 6,0 mL de Glicina 3,0 M, pH 8,5 ao derivado previamente filtrado e o sistema manteve-se em agitação branda durante 08 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o derivado foi filtrado e lavado com 20,0 mL de água destilada. Por fim, a enzima imobilizada ao suporte foi estocada a 10° C durante 24 horas.

3.2.2 Determinação da atividade enzimática e teor de proteína

Os ensaios de atividade de β – galactosidase foram realizados em temperaturas de 37° C e 55° C em banho termo-estatizado para as enzimas obtidas de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente, utilizando o cromatogênio o-NPG como substrato. Uma alíquota de 50 μ L solução enzimática ou derivado foi adicionada a 180 μ L de o-NPG (concentração final de o-NPG de 28 mM) e a reação ocorreu durante 2 minutos, sendo interrompida mediante adição de 1,5 mL de tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,8. A absorbância foi lida a 415 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio. A eficiência de imobilização foi definida como a razão (percentual) entre a atividade enzimática no derivativo e a atividade enzimática presente na enzima livre.

O teor de proteína foi determinado pelo método proposto por Bradford (1976).

3.2.3 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade dos derivados ao armazenamento foi avaliada através da determinação da atividade da enzima imobilizada previamente desidratada a 10° C e mantida em condições de estocagem à seco a 10° C. Alíquotas de cada derivado foram analisadas em triplicata em intervalos de 24 horas em um

período total de 7 dias. A análise de atividade (conforme item 3.2.2) foi realizada em triplicata e foi procedida em alíquotas de 50 µg de suspensão enzimática obtidas a partir de 0,1 g do respectivo derivado ressuspendido em 1,0 mL de tampão de atividade. A atividade determinada nas primeiras 24 horas de armazenagem foi definida como controle (100%) para o cálculo da atividade relativa.

3.2.4 Estabilidade térmica

Com o objetivo de estudar a cinética de inativação da enzima β -galactosidase imobilizada e na forma solúvel, 1,0 g de cada um dos derivados obtidos (Quadro 1, item 3.2.1) foi diluído em 10,0 mL de tampão de atividade e incubado em banho termo-estático sob agitação branda. Alíquotas distintas de cada derivado foram incubadas a 20° C, 37° C, 44° C e 50° C para a enzima de *K. lactis* e 40° C, 50° C, 55° C e 60° C para a enzima de *A. oryzae*. Utilizou-se uma concentração de 1,0 mg de proteína por mL de tampão de atividade para as enzimas solúveis. A atividade relativa foi determinada através da relação percentual entre a atividade específica remanescente após 24 horas e aquela verificada previamente ao início dos ensaios (tempo zero). As amostras foram resfriadas em banho de gelo imediatamente após a coleta para posterior análise da atividade enzimática.

3.2.5 Ciclos de reuso para hidrólise de lactose

Alíquotas de enzima livre e suspensões enzimáticas (39 a 40 U) foram incubadas em 20 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão atividade sob agitação branda em banho termo-estático a 37° C ou 55° C para as enzimas de *K. lactis* ou *A. oryzae*, respectivamente. Os derivados foram lavados, filtrados e secos a 4° C por 24 horas ao final de cada ciclo de reuso. Alíquotas foram coletadas periodicamente para determinação do tempo de hidrólise referente ao primeiro ciclo e o percentual de conversão de lactose foi monitorado através do monitoramento da concentração de glicose no meio

utilizando um Kit de Glicose (Glicose PP, Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil) baseado no método proposto por Trinder (1969). A atividade determinada no primeiro dia foi considerada como controle (100%) para o cálculo da atividade enzimática remanescente a cada ciclo de reuso.

3.2.6 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada

Os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada foram determinados com base no modelo de Michaelis-Menten, utilizando a linearização de Lineweaver Burk. Foram adicionados aproximadamente 40 U de enzima livre ou imobilizada a 10 mL de tampão de atividade contendo lactose em concentrações de 0 – 150 mM (variando em intervalos de 15 mM). As amostras foram mantidas sob leve agitação em banho termo-estabilizado a 37° C ou 55° C para as enzimas livres e derivados de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente. A taxa inicial de conversão de lactose foi monitorada através do monitoramento da concentração de glicose no meio utilizando um Kit de Glicose (Glicose PP, Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil) baseado no método proposto por Trinder (1969).

3.2.7 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH

As condições ótimas de temperatura e pH para β -galactosidases livre e imobilizada foram avaliadas através de um planejamento experimental fatorial 2^2 (CCD) e análise da superfície de resposta. Um total de 11 experimentos foram realizados com o objetivo de determinar a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática da enzima (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental para β -galactosidase de *A. oryzae* e *K. lactis* livre e imobilizada

Teste	Variáveis codificadas		<i>A. oryzae</i>		<i>K. lactis</i>	
	pH	T	pH real	T real (°C)	pH real	T real (°C)
1	-1,00000	-1,00000	3,8	44,0	4,9	17,0
2	-1,00000	1,00000	3,8	66,0	4,9	57,0
3	1,00000	-1,00000	5,2	44,0	9,1	17,0
4	1,00000	1,00000	5,2	66,0	9,1	57,0
5	-1,41421	0,00000	2,5	55,0	4,0	37,0
6	1,41421	0,00000	6,5	55,0	10,0	37,0
7	0,00000	-1,41421	4,5	40,0	7,0	9,0
8	0,00000	1,41421	4,5	70,0	7,0	65,0
9	0,00000	0,00000	4,5	55,0	7,0	37,0
10	0,00000	0,00000	4,5	55,0	7,0	37,0
11	0,00000	0,00000	4,5	55,0	7,0	37,0

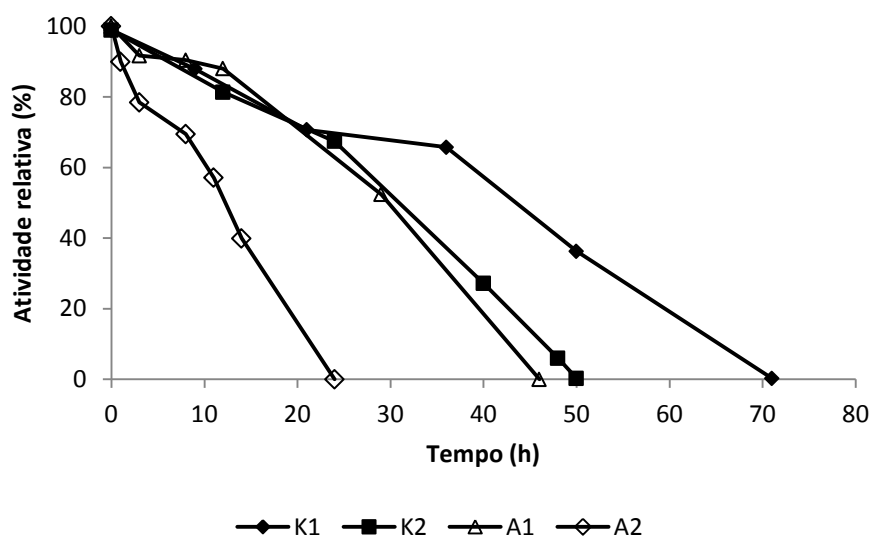
Todos os delineamentos estatísticos e e resultados de análise foram conduzidos utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, Estados Unidos). As análises estatísticas do modelo foram realizados de acordo com a análises de variância (ANOVA), incluindo teste F de Fisher (signficância média do modelo), sua propabilidade associada $P(F)$, coeficiente de correlação R, e coeficiente de correlação R^2 , os quais medem a aderência do modelo de regressão. Também inclui teste t de Student para avaliar os coeficientes estimados e as probabilidades associadas, $P(t)$. Para cada variável, o modelo quadrático foi representado como curvas de contorno. O erro foi calculado com base nas triplicatas do ponto central.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cinética de Imobilização

O processo de imobilização deve possibilitar a formação de ligações entre proteína e suporte no menor espaço de tempo possível. Ao mesmo tempo, a natureza da ligação formada irá influenciar no número de ciclos de reúso do respectivo derivativo, bem como em propriedades catalíticas e termodinâmicas. O tempo de imobilização determinado para cada ensaio é representado na Figura 4 através do acompanhamento da curva de atividade do sobrenante para cada ensaio.

Figura 4 - Cinética de imobilização a 25 °C



K: origem da enzima (*K. lactis*); A: origem da enzima (*A. oryzae*); 1: Suporte Immobead; 2: Suporte Immobead modificado com EDA

O processo de imobilização a partir de suportes modificados com EDA ocorreu em um espaço de tempo menor para ambas as enzimas testadas. O efeito esperado ao se alterar a estrutura do suporte com EDA é permitir a

rápida adsorção da enzima, possibilitando que a formação de ligações covalentes ocorra mais rapidamente. A imobilização de β - galactosidase proveniente de *K. lactis* ocorreu em um período prolongado, de 48 e 72 horas para os testes K2 e K1, respectivamente. Esse comportamento pode estar associado ao fato da enzima de *A. oryzae* apresentar estrutura monomérica com reduzida massa molecular. Os tempos de imobilização verificados para os ensaios K1, K2, A1 e A2 foram utilizados como referência para as demais condições de imobilização estudadas.

4.2 Ensaios de imobilização em condições diversas

Suportes convencionais contendo grupamentos epóxi são capazes de promover a formação de ligações covalentes com nucleófilos variados presentes nas estruturas terciárias e quaternárias de enzimas. Entretanto, a eficiência e o rendimento de imobilização serão fortemente influenciados pelas condições de processo empregadas (GUISAN, 2006). A Tabela 4 apresenta a eficiência de imobilização e o rendimento verificado para cada ensaio proposto.

Tabela 4 - Eficiência e rendimento de imobilização

Quadrante	Ensaio	Eficiência (%)	Rendimento (%)
1°	K1	36,0 ± 3	82,2 ± 6
	K1G	34,3 ± 5	80,3 ± 1
	K1M	32,5 ± 5	89,1 ± 1
	K1MG	37,9 ± 3	87,3 ± 3
2°	K2	50,5 ± 6	89,3 ± 4
	K2G	45,8 ± 3	84,1 ± 6
	K2M	34,6 ± 1	88,2 ± 1
	K2MG	29,2 ± 3	84,4 ± 3
3°	A1	48,4 ± 6	80,2 ± 1
	A1G	39,7 ± 1	81,4 ± 6
	A1M	42,5 ± 3	90,1 ± 2
	A1MG	34,6 ± 1	87,3 ± 3
4°	A2	47,9 ± 6	85,0 ± 4
	A2G	41,7 ± 1	88,7 ± 1
	A2M	33,5 ± 3	83,6 ± 2
	A2MG	30,6 ± 3	86,1 ± 1

K: origem da enzima (*K. lactis*); A: origem da enzima (*A. oryzae*); 1: Suporte Immobead; 2: Suporte Immobead modificado com EDA; G: teste bloqueado com glicina; M: imobilização multipontual

De modo geral, os resultados de rendimento variaram de 80 a 90% enquanto que a eficiência de imobilização variou de 30 a 50%. Resultados expressivos de rendimento e eficiência de imobilização foram reportados por Bernal et al. (2012), cujo trabalho visou a imobilização de β -galactosidases em sílica porosa por meio de formação de ligações covalentes multipontuais.

No 1° quadrante (Tabela 4), a imobilização foi conduzida em condições de força iônica elevada (0,75 M), de forma a tornar os nucleófilos presentes na superfície da enzima mais ativos. Os ensaios submetidos a uma pós-imobilização em pH alcalino apresentaram melhores resultados de rendimento e o mesmo comportamento foi verificado nos ensaios apresentados no 3° quadrante, onde condições de imobilização similares foram utilizadas para a

enzima de *A. oryzae*. Por outro lado, observa-se uma perda de eficiência, a qual pode ser atribuída às alterações conformacionais na estrutura da proteína. Resultados similares foram verificados por Torres e Batista-Vieira (2012). Os autores concluíram que os resultados estavam associados à formação de ligações covalentes multipontuais.

No 2º quadrante, o suporte foi submetido à tratamento com EDA com o objetivo de introduzir grupamentos amino e possibilitar a rápida adsorção da enzima. Os resultados verificados foram similares àqueles apresentados no 4º quadrante, onde se observou uma redução da atividade recuperada ao submeter o derivado a uma condição de pós-imobilização em pH alcalino. Esse comportamento pode estar associado ao procedimento de modificação do suporte, o qual pode ter indisponibilizado grande parte dos grupamentos epóxi, possibilitando a formação de ligações por adsorção em sua maioria. Nessas condições, é possível que parte das enzimas tenha sido lixiviada ao submeter o derivado às condições de pós-imobilização. O procedimento de bloqueio ocasionou ligeira perda de atividade enzimática em todos os derivados submetidos à esse tratamento.

4.3 Estabilidade durante o armazenamento

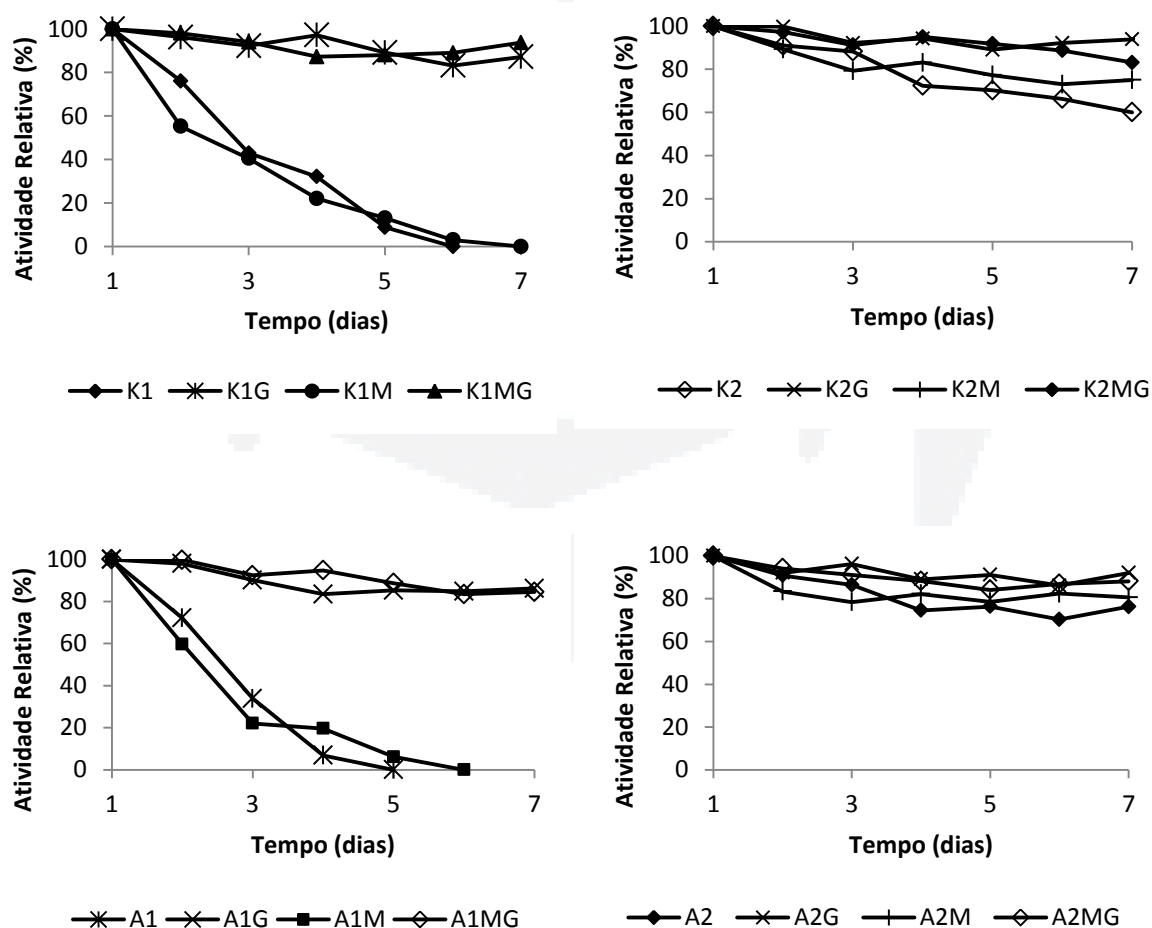
Os derivados obtidos nos ensaios de imobilização foram previamente desidratados e submetidos à armazenagem a 4°C por um período de 7 dias. A cinética de armazenagem está representada na Figura 5. Os ensaios bloqueados com glicina e/ou modificados com EDA apresentaram leve queda de atividade ao longo do período de acompanhamento e esse comportamento foi verificado para ambas as enzimas estudadas. Por outro lado, os demais ensaios perderam cerca de 60% de sua atividade inicial já no terceiro dia de acompanhamento. Possivelmente, grande parte dos grupamentos epóxi foram quimicamente modificados mediante o tratamento com EDA, evitando a ocorrência de distorções conformacionais na estrutura da proteína.

O caráter hidrofóbico de suportes acrílicos determina a ocorrência de interações hidrofóbicas entre o suporte e a superfície da proteína, podendo afetar as propriedades da enzima. Mateo et al. (2007) sugerem que o bloqueio

com glicina cria um micro-ambiente hidrofílico que favorece a estabilidade da enzima prevenindo interações hidrofóbicas com o suporte. O mesmo efeito de incremento na estabilidade do derivado foi reportado por outros autores (TORRES e BATISTA-VIEIRA, 2012A; BERNAL et al., 2012).

Com base nos resultados obtidos, foi definido dar sequência ao estudo de estabilidade térmica utilizando apenas ensaios cujo procedimento de bloqueio tenha sido empregado (K1MG, K1G, A1MG, A1G).

Figura 5 - Cinética de armazenagem de β – galactosidase imobilizada em suporte comercial Immobead

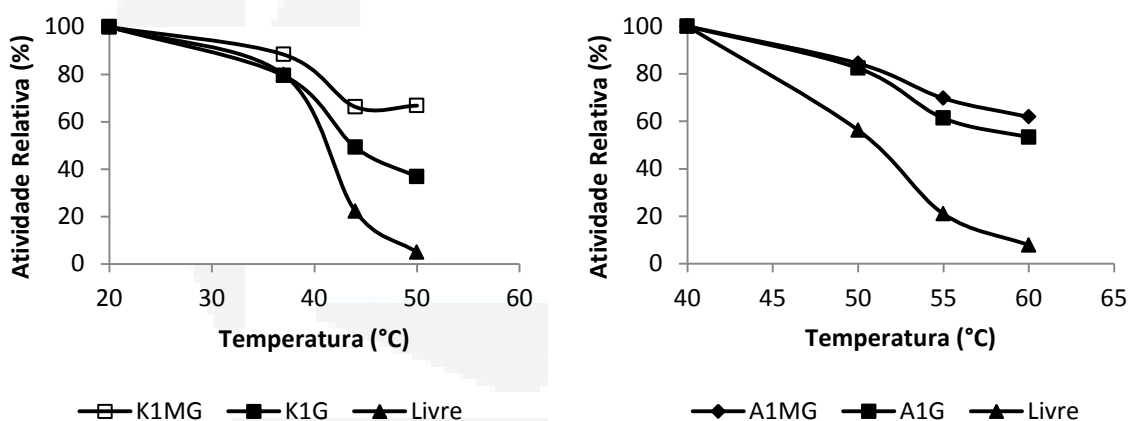


K: origem da enzima (*K. lactis*); A: origem da enzima (*A. oryzae*); 1: Suporte Immobead; 2: Suporte Immobead modificado com EDA; G: teste bloqueado com glicina; M: imobilização multipontual

4.4 Estabilidade térmica

O processo de imobilização de enzimas frequentemente permite prolongar o tempo de armazenagem, além de promover resistência ao cisalhamento e maior resistência térmica, o que se traduz em uma maior eficiência de processo (FREITAS et al., 2011). Os derivados selecionados no item 4.3 foram submetidos ao processo de inativação térmica e comparados com a estabilidade térmica da enzima livre nas mesmas condições (FIGURA 6).

Figura 6 - Cinética de inativação térmica de β – galactosidase livre e imobilizada em suporte comercial Immobead



K: origem da enzima (*K. lactis*); A: origem da enzima (*A. oryzae*); 1: Suporte Immobead; G: teste bloqueado com glicina; M: imobilização multipontual

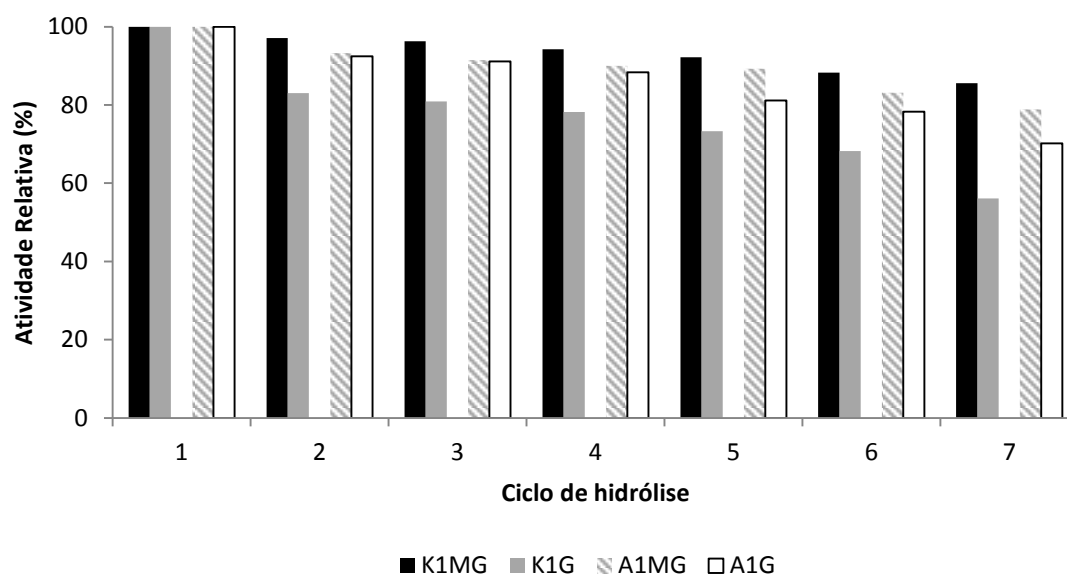
Em relação aos ensaios conduzidos com ambas as enzimas, é possível observar que o bloqueio de grupamentos epóxi contribuiu para um aumento na estabilidade térmica. Resultados similares foram reportados por Grazu et al. (2010) em um estudo voltado para imobilização covalente multipontual de Penicilina G Acilase em suporte contendo grupamentos epóxi. Nota-se que os ensaios submetidos a uma pós imobilização em pH alcalino apresentaram maior estabilidade aos efeitos de inativação causados pela exposição

prolongada às temperaturas estudadas. O estudo publicado por Bernal et al. (2012) revelou que a imobilização covalente multipontual de β -galactosidase de *B. circulans* em sílica quimicamente modificada promoveu aumento de 370 vezes na estabilidade térmica do derivado em comparação com a enzima solúvel em pH 6,0 e 55° C.

4.5 Ciclos de reúso para hidrólise de lactose

A possibilidade de reúso de enzimas constitui uma das maiores vantagens da imobilização. Os ensaios submetidos à bloqueio e/ou pós-imobilização em pH alcalino foram avaliados em relação à performance de hidrólise de lactose em bateladas sucessivas (Figura 7).

Figura 7 - Ciclos de reúso para hidrólise de lactose



K: origem da enzima (*K. lactis*); A: origem da enzima (*A. oryzae*); 1: Suporte Immobead; G: teste bloqueado com glicina; M: imobilização multipontual

Ensaio submetidos à pós-imobilização em pH alcalino (K1MG, A1MG) apresentaram menores perdas de atividade a cada novo ciclo de reuso e obtiveram maiores percentuais de atividade relativa no 7º ciclo em relação aos derivados que não foram submetidos à esse tratamento (K1G, A1G). A formação de ligações covalentes multipontuais pode causar alterações na estrutura da enzima, tornando-a mais rígida e estável às condições variáveis de processo (MATEO et al., 2006; KHAN et al., 2012).

A queda sucessiva no percentual de conversão de lactose verificada no ensaio K1G pode ser explicada pela dissociação de parte da estrutura quaternária da enzima. Sua estrutura multimérica permite a exposição de subunidades as quais eventualmente não formaram ligações covalentes com o suporte, expondo-as às condições do ambiente, como temperatura e força iônica (GUISAN, 2006).

Ao final de 7 ciclos de hidrólise, os derivados submetidos à pós-imobilização mantiveram cerca de 80% de sua atividade inicial. Resultados similares foram publicados por Ansari e Husain (2012). Nesse estudo, a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada por adsorção no sistema concanavalin A – Celite 545 e apresentou cerca de 71% de sua atividade inicial após o 7º ciclo de hidrólise.

Com base nos resultados verificados nessa etapa, os ensaios submetidos à pós-imobilização em pH alcalino e posterior bloqueio em solução de glicina 3,0 M foram selecionados para as próximas etapas do estudo.

4.6 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada

O estudo de parâmetros cinéticos é importante tanto do ponto de vista teórico quanto prático. De acordo com Vasileva et al. (2012), cada derivado possui parâmetros cinéticos específicos, os quais podem sofrer influência de diversos fatores como o tipo de suporte empregado, a concentração de substrato, temperatura, pH e presença de inibidores ou ativadores, entre outros. As figuras 8, 9, 10 e 11 apresentam as curvas de linearização de Lineweaver-Burk e a Tabela 5 resume os parâmetros cinéticos obtidos para a

enzima livre e ensaios submetidos à imobilização multipontual e bloqueio com glicina.

Figura 8 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima livre de *A. oryzae*

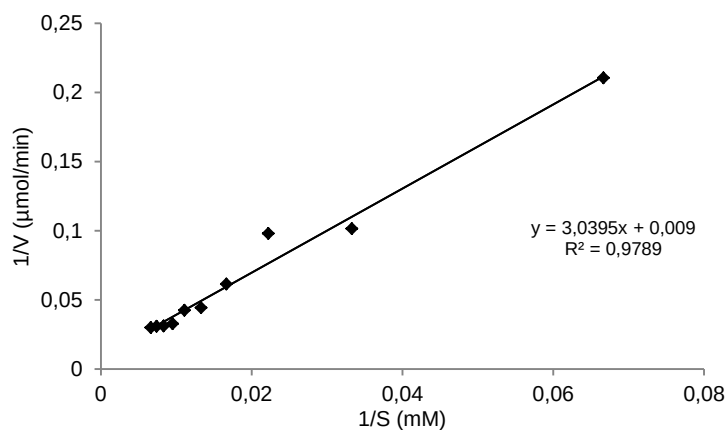


Figura 9 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima imobilizada de *A. oryzae*

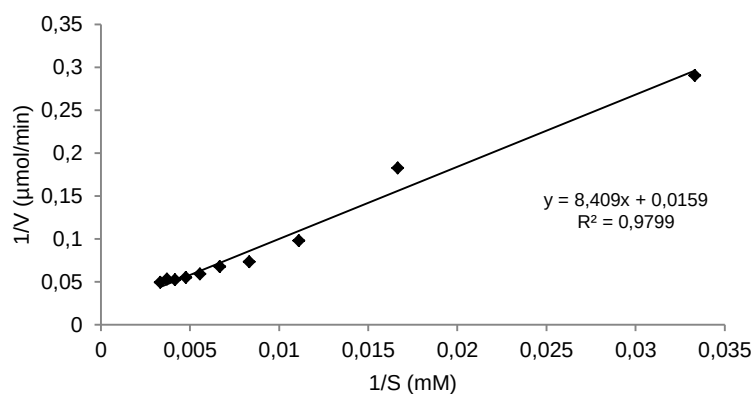


Figura 10 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima livre de *K. lactis*

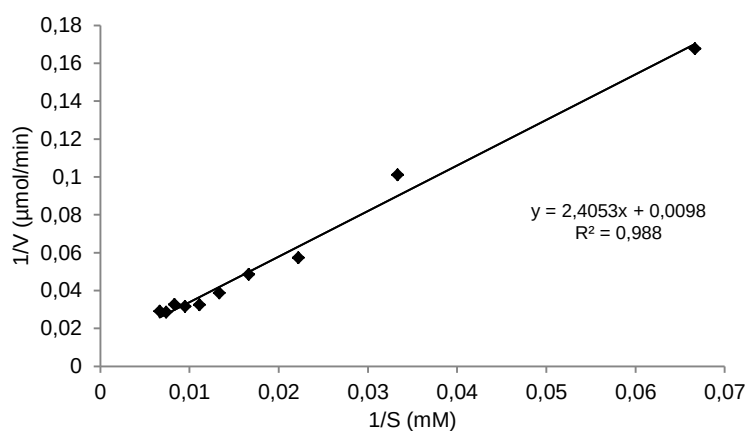


Figura 11 - Curva de linearização de Lineweaver-Burk para a enzima imobilizada de *K. lactis*

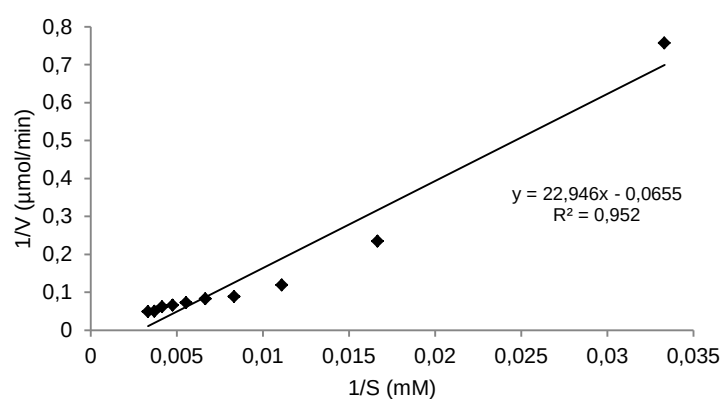


Tabela 5 - Determinação de parâmetros cinéticos para a enzima livre e imobilizada.

Parâmetros cinéticos	KL	K1MG	AO	A1MG
K_m^a	19,11	49,69	17,37	55,29
$V_{\max}^b$	0,87	0,35	1,09	0,53

KL: enzima livre de *K. lactis*

AO: enzima livre de *A. oryzae*

a: mM de lactose

b: μmol de glicose. min^{-1} .mg de enzima $^{-1}$

Os valores apresentados para os parâmetros cinéticos calculados de acordo com o modelo de Michaelis-Menten podem ser explicados pela ocorrência de possíveis interações proteína-proteína e/ou difusão de substratos e produtos no interior da matriz porosa, os quais podem ter contribuído para o aumento no valor de K_m e consequente diminuição de V_{max} . No estudo publicado por Haider e Husain (2009), a enzima β -galactosidase de *A. oryzae* foi imobilizada utilizando a técnica de inclusão em alginato de cálcio. Os derivados obtidos foram submetidos à hidrólise de lactose e os parâmetros cinéticos verificados para a enzima imobilizada indicaram que o derivado apresentou menos afinidade ao substrato em relação à enzima livre.

Diversos trabalhos reportam resultados similares àqueles apresentados no presente estudo, os quais são constantemente associados a alterações conformacionais na estrutura da proteína e resultantes do processo de imobilização (FREITAS et al., 2011; ANSARI e HUSAIN, 2012; PARLAK, et al., 2013). Obviamente tais alterações não significam necessariamente um insucesso tendo em vista a possibilidade de reuso do derivado em diversos ciclos de hidrólise. Além disso, as alterações em parâmetros cinéticos podem ser menos impactantes nos casos onde o processo de imobilização promove melhorias na estabilidade do derivado.

4.7 Determinação das condições ótimas de temperatura e pH da enzimas livre e imobilizada

A importância das variáveis em um processo pode ser determinada por meio da adoção da técnica de planejamento experimental, o qual possibilita o planejamento e a execução de forma organizada, com um número de ensaios reduzido ao mínimo necessário. Este método permite, ainda, a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados, em função das variáveis escolhidas, usando-se programas estatísticos de regressão.

As condições ótimas de temperatura e pH foram definidas para as enzimas livres e imobilizadas de β – galactosidase de *A. oryzae* e *K. lactis*. O planejamento experimental e os resultados de atividade enzimática estão representados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Respostas do planejamento experimental para β -galactosidase de *A. oryzae* livre e imobilizada.

Teste	Variáveis codificadas		Níveis reais		Atividade ¹	
	pH	T	pH	T (°C)	Livre	Imobilizada
1	-1,00000	-1,00000	3,8	44,0	4,83	1,12
2	-1,00000	1,00000	3,8	66,0	21,21	4,54
3	1,00000	-1,00000	5,2	44,0	9,92	1,92
4	1,00000	1,00000	5,2	66,0	12,46	2,49
5	-1,41421	0,00000	2,5	55,0	0,00	0,00
6	1,41421	0,00000	6,5	55,0	0,00	0,00
7	0,00000	-1,41421	4,5	40,0	11,79	2,42
8	0,00000	1,41421	4,5	70,0	15,81	8,52
9	0,00000	0,00000	4,5	55,0	30,42	20,60
10	0,00000	0,00000	4,5	55,0	30,87	20,60
11	0,00000	0,00000	4,5	55,0	30,93	20,61

1 U.mg de proteína⁻¹

Tabela 7 - Respostas do planejamento experimental para β -galactosidase de *K. lactis* livre e imobilizada.

Teste	Variáveis codificadas		Níveis reais		Atividade ¹	
	pH	pH	T (°C)	pH	Livre	Imobilizada
1	-1,00000	4,9	4,9	17,0	0,00	0,00
2	-1,00000	4,9	4,9	57,0	0,00	0,00
3	1,00000	9,1	9,1	17,0	0,05	0,38
4	1,00000	9,1	9,1	57,0	0,27	0,29
5	-1,41421	4,0	4,0	37,0	0,00	0,00
6	1,41421	10,0	10,0	37,0	0,00	0,00
7	0,00000	7,0	7,0	9,0	1,84	1,04
8	0,00000	7,0	7,0	65,0	2,21	0,72
9	0,00000	7,0	7,0	37,0	7,11	4,05
10	0,00000	7,0	7,0	37,0	7,11	4,04
11	0,00000	7,0	7,0	37,0	7,13	4,03

¹ U.mg de proteína⁻¹

A atividade específica variou de 4,87 U.mg⁻¹ a 30,87 U.mg⁻¹ e 1,12 U.mg⁻¹ a 20,61 U.mg⁻¹ nos planejamentos de β -galactosidases livre e imobilizada de *A. oryzae* e 0,05 U.mg⁻¹ a 7,13 U.mg⁻¹ e 0,29 U.mg⁻¹ a 4,05 U.mg⁻¹ nos planejamentos de β -galactosidases livre e imobilizada de *K. lactis*, respectivamente. Os resultados extremos indicam a relevância da otimização com o objetivo de obter elevadas atividades enzimáticas. Os pontos centrais apresentaram os resultados de atividade mais expressivos em temperaturas e faixas de pH indicados na literatura como ótimos para as enzimas estudadas (SHUKLA e WIERZBICKI, 1975; GEKAS E LÓPEZ-LEIVA, 1985; HARJU, 2012).

A significância de cada coeficiente de regressão foi determinado pelos valores de *t* e *P*, representados nas Tabelas 8 e 9 para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* e nas Tabelas 10 e 11 para as enzimas livre e imobilizada de *K. lactis*. Todas as interações estudadas entre as variáveis causaram efeitos significativos na atividade das enzimas livre e imobilizada de ambas as origens.

Os valores de *P* sugerem que a temperatura possui efeito promotor enquanto que o pH influencia negativamente na atividade das enzimas de *A. oryzae* em estudo. Os dados indicam que o incremento na temperatura e a diminuição do pH causam aumento na atividade enzimática dessas enzimas.

Em relação à enzima livre de *K. lactis*, foi verificado que o pH e a temperatura causam efeito positivo e negativo, respectivamente. O incremento da temperatura influenciou negativamente na atividade da enzima imobilizada.

Tabela 8 - Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade de *A. oryzae* livre

Variáveis Independentes	Efeito	Coeficiente de Regressão	Valor-t	Valor-P
Intersecção	30,7398	30,7398	193,18	0,0000
<i>pH</i> **	-0,9149	-0,4575	-4,69	0,0425
<i>pH.pH</i> *	-28,1382	-14,0691	-121,30	0,0001
<i>T</i> *	6,1534	3,0767	31,57	0,0010
<i>T.T</i> *	-14,3374	-7,1687	-61,81	0,0003
<i>pH.T</i> *	-6,9199	-3,4600	-25,11	0,0016

* Estatisticamente significativa a 99% de confiança;

** Estatisticamente significativa a 95% de confiança;

pH e T: valores codificados das variáveis pH e temperatura (°C), respectivamente.

Tabela 9 - Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade imobilizada de *A. oryzae*

Variáveis Independentes	Efeito	Coeficiente de Regressão	Valor-t	Valor-P
Intersecção	20,6035	20,6035	4.069,92	0,0000
<i>pH</i> *	-0,3143	-0,1571	-50,69	0,0004
<i>pH.pH</i> *	-20,7132	-10,3566	-2.806,82	0,0000
<i>T</i> *	3,1527	1,5763	508,48	0,0000
<i>T.T</i> *	-15,2428	-7,6214	-2.065,53	0,0000
<i>pH.T</i> *	-1,4264	-0,7132	-162,68	0,0000

* Estatisticamente significativa a 99% de confiança;

pH e T: valores codificados das variáveis pH e temperatura (°C), respectivamente.

Tabela 10 - Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade de *K. lactis* livre

Variáveis Independentes	Efeito	Coeficiente de Regressão	Valor-t	Valor-P
Intersecção	7,1158	7,1158	1099,36	0,0000
pH^*	0,0807	0,0404	10,18	0,0095
$pH.pH^*$	-7,5812	-3,7906	-803,48	0,0000
T^*	0,1828	0,0914	23,06	0,0019
$T.T^*$	-5,5582	-2,7791	-589,07	0,0000
$pH.T^{**}$	0,1080	0,0540	9,64	0,0106

* Estatisticamente significativa a 99% de confiança;

** Estatisticamente significativa a 95% de confiança;

pH e T os valores codificados das variáveis pH e temperatura (°C), respectivamente.

Tabela 11 - Efeitos e coeficientes estimados pelo modelo de regressão para otimização da atividade de β -galactosidade imobilizada de *K. lactis*

Variáveis Independentes	Efeito	Coeficiente de Regressão	Valor-t	Valor-P
Intersecção	4,0385	4,0385	702,70	0,0000
pH^*	0,1660	0,0830	23,59	0,0018
$pH.pH^*$	-4,1753	-2,0877	-498,38	0,0000
T^*	-0,1369	-0,0685	-19,46	0,0026
$T.T^*$	-3,2961	-1,6481	-393,44	0,0000
$pH.T^{**}$	-0,0442	-0,0221	-4,44	0,0471

* Estatisticamente significativa a 99% de confiança;

** Estatisticamente significativa a 95% de confiança;

pH e T os valores codificados das variáveis pH e temperatura (°C), respectivamente.

Efeitos significativos de segunda ordem de temperatura ($P_{T,T}$) e pH ($P_{pH,pH}$) indicam que esses parâmetros podem agir como fatores limitantes e mesmo pequenas variações em seus valores irão alterar os resultados de atividade enzimática de forma significativa. Os modelos revelam claramente interações significativas entre temperatura e pH ($P_{T,pH}$) e sugerem que o estudo de uma variável por vez acarretará em resultados imprecisos acerca de sua

real influência sobre a atividade da enzima livre ou imobilizada de ambas as origens.

Os modelos quadráticos propostos para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* e *K. lactis* estão representados nas equações 1 a 4, respectivamente. A variável y é a resposta predita para a atividade enzimática de cada um dos estudos.

$$y = - 14,0691 pH.pH - 7,1687 T.T - 0,4575 pH + 3,0767 T - 3,46 pH.T + 30,7398 \quad (1)$$

$$y = - 10,3566 pH.pH - 7,6214 T.T - 0,1571 pH + 1,5763 T - 0,7132 pH.T + 20,6035 \quad (2)$$

$$y = - 3,7906 pH.pH - 2,7791 T.T + 0,0404 pH + 0,0914 T + 0,054 pH.T + 7,1158 \quad (3)$$

$$y = - 2,0877 pH.pH - 1,6481 T.T - 0,083 pH - 0,0685 T - 0,0221 pH.T + 4,03854 \quad (4)$$

A análise estatística dos modelos gerados foi avaliada através do teste F de Fisher e Análise de Variância (ANOVA). O valor de F para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* e *K. lactis* foi altamente significativo a níveis de confiança de 95% para a enzima livre de *A. oryzae* e 99% para as demais enzimas.

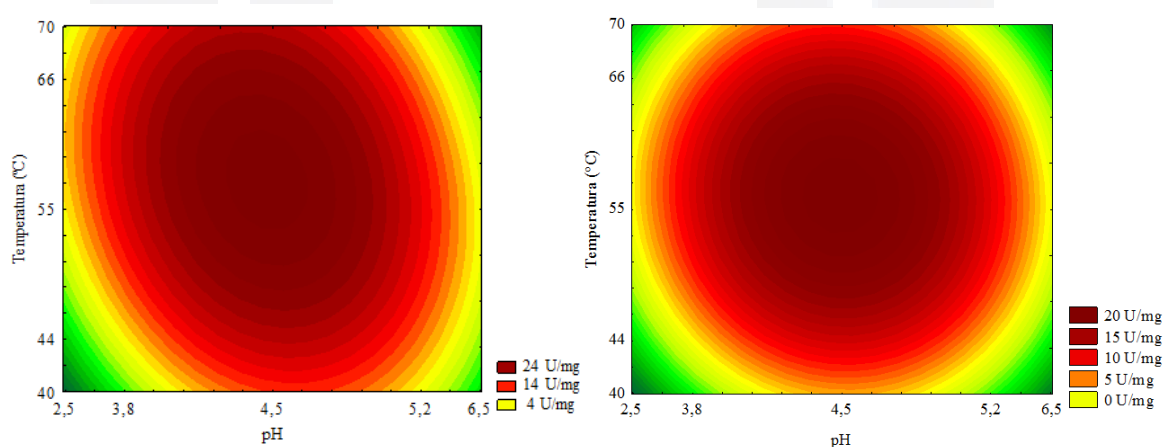
O coeficiente de determinação R^2 para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* (0,94 e 0,99; respectivamente) indica que a variação de 94,0% e 99,0% da atividade enzimática é atribuída às variáveis independentes e que pode ser explicada pelos respectivos modelos. O valor de R atribuído aos modelos gerados para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* (0,97 e 0,99; respectivamente) sugere que os modelos apresentam alta representatividade e possuem excelente correlação entre resultados experimentais e teóricos.

As enzimas livre e imobilizada de *K. lactis* apresentaram coeficiente de determinação R^2 de 0,98 e 0,99; respectivamente. Os resultados indicam que a variação de 98,0% e 99,0% da atividade enzimática é atribuída às variáveis independentes e que pode ser explicada pelos respectivos modelos. O valor de R atribuído aos modelos gerados para as enzimas livre e imobilizada de *K.*

lactis (0,99 para ambas) sugere que os modelos apresentam alta representatividade e possuem excelente correlação entre resultados experimentais e teóricos.

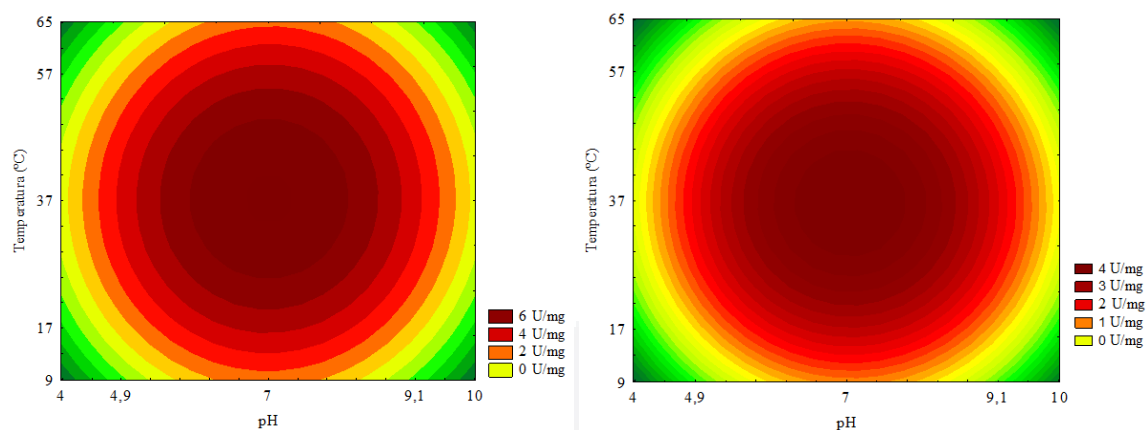
As curvas de contorno apresentadas na Figura 8 indicam que atividade enzimática ótima para as enzimas livre e imobilizada de *A. oryzae* ocorreu na faixa de pH entre 4,2 e 4,7 e temperaturas entre de 55 e 60°C. Os dados confirmam sua melhor aplicabilidade na hidrólise lactose em soro de queijo e outros derivados lácteos que apresentem pH ácido. As condições ótimas de pH e temperatura verificadas são similares àquelas reportadas por Husain (2010). Não foram verificadas alterações nas condições ótimas de atividade para a enzima imobilizada de forma similar ao estudo publicado por Freitas et al. (2011).

Figura 12 - Superfícies de contorno para os efeitos de temperatura e pH de β -galactosidase livre e imobilizada de *A. oryzae*, respectivamente.



De acordo com as curvas de contorno representadas na Figura 9, as enzimas livre e imobilizada de *K. lactis* apresentaram atividade enzimática ótima em pH 7,0 temperatura de 37°C. As condições ótimas de temperatura e pH para β -galactosidase de *K. lactis* é bem documentada em literatura e condizem com os resultados verificados no presente estudo (ANSARI e HUSAIN, 2011; HARJU et al., 2012).

Figura 13 - Superfícies de contorno para os efeitos de temperatura e pH de β -galactosidase livre e imobilizada de *K. lactis*, respectivamente.



5 CONCLUSÃO

Foram estudadas diferentes condições de imobilização de β – galactosidases obtidas de *K. lactis* e *A. oryzae* em suporte epóxi Immobead®. A eficiência de imobilização variou aproximadamente de 30% a 50%, enquanto que o rendimento apresentou valores entre 80% e 90%. Etilenodiamina foi utilizada no intuito de promover modificações químicas no suporte e possibilitar a rápida adsorção de enzimas, favorecendo a formação de ligações covalentes multipontuais em tempo reduzido. De fato, suportes modificados com etilenodiamina imobilizaram a mesma carga de enzimas em menor espaço de tempo, se comparados a suportes sem modificação. Por outro lado, os mesmos suportes apresentaram considerável perda de atividade durante os ciclos de reuso para hidrólise de lactose, sugerindo que a superfície do suporte possa ter sido modificada em sua totalidade, dificultando a formação de ligações covalentes e permitindo a lixiviação de enzimas para o meio reacional. Todos os derivados bloqueados com solução de glicina apresentaram melhores resultados de resistência durante a armazenagem, indicando que o procedimento impede futuras distorções da enzima, ocasionadas pela interação de grupamentos epóxi livres. Os ensaios submetidos a pós-imobilização em pH alcalino apresentaram leve perda de atividade enzimática, porém foram verificadas melhorias em sua estabilidade térmica. O estudo de parâmetros cinéticos de ambas as enzimas indicou a ocorrência de possíveis alterações

conformacionais na estrutura da proteína, resultantes do processo de imobilização. Foram definidas as condições ótimas de temperatura e pH para enzimas livres e imobilizadas de ambas as origens. Verificou-se que os resultados estão de acordo com aqueles citados em literatura, não havendo alterações nas condições ótimas de temperatura e pH para as enzimas após o processo de imobilização. Conclui-se que as β – galactosidases de *A. oryzae* e *K. lactis* submetidas à imobilização covalente multipontual em suporte Immobead posteriormente bloqueado com glicina apresentaram as melhores propriedades de pós-imobilização, permitindo futuras aplicações industriais.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar novas condições de modificação de suporte com etilenodiamina e outros agentes químicos;
- Avaliar a influência da carga proteica nos parâmetros de rendimento e eficiência de imobilização;
- Conduzir estudos de hidrólise de lactose em diferentes derivados lácteos a partir dos melhores derivados obtidos;
- Otimizar as condições de hidrólise de lactose em reatores em batelada e contínuos;
- Desenvolver suportes de baixo custo para imobilização de enzimas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAYRAK, N.; YANG, S. T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 31, p. 371-383, 2002.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Bioaffinity based immobilization of almond (*Amygdalus communis*) β - galactosidase on Con A-layered calcium alginate-cellulose beads: Its application in lactose hydrolysis in batch and continuous mode. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 290-301, 2011.

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

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β - galactosidase. **Food and Bioproducts processing**, v. 90, p. 351-359, 2012.

BERNAL , C.; SIERRA, L.; MESA, M. Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in

hierarchical macro-mesoporous silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 166– 172, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov. 2006.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 326-346, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1-9, 2013.

EBRAHIMI, M.; PLACIDO, L.; ENGEL, L.; ASHAGHI, K. S.; CZERMAK, P. A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Desalination**, v. 250, p.1105-1108, 2010.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; TERRENI, M.; MATEO, C.; BASTIDA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; DALMASES, P.; HUGUET, J.; GUISAN, J.M. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas lipase*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 28, p. 389-396, 2001.

FREEDONIA GROUP. **World Enzymes**, Cleveland, Ohio, United States of America, p. 12 - 26, 2011.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. São Carlos, 2004. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade de São Carlos.

GRAZU, V.; LOPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; ABIAN, O.; GONZALEZ, R.; HERMOSO, J. A. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 390–398, 2010.

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, n. 1, v. 26, p. 1-14, 2010.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUISAN, M. J. **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology 2**. Humana Press, New Jersey, p. 15, 2006.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, p.104-109, 2012.

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

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p.41-62, 2010.

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

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28– 38, 2012.

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

KOCIÁN, J. Lactose intolerance. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 1988.

LASKIN, A. I. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. Biotechnology Series, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California, p. 312, 1985.

LISBOA, C. R. Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2012.

MAMMARELLA, E. J.; RUBIOLO, A. C. Study of the deactivation of β galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 7-13, 2005.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MARTINS, A. R.; MANERA, A. P.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Lactose conversion and the synthesis of galactooligosaccharides in a simultaneous lagged bioprocess using β -galactosidases and probiotic microorganisms. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 130-136, 2011.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Epoxy Sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629-634, 2002.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J. M.; LOPEZ-GALLEGU, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022-1033, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, F. C.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, p. 1109-1115, 1916.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β - galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 600-609, 2011.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, p. 1-16, 2010.

PARLAK, M.; USTEK, D.; TANRISEVEN, A. A novel method for covalent immobilization of dextranucrase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p.52– 60, 2013.

PESELA, B. C. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCIA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β - galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 199-205, 2003.

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

QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-a. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 52, p. 833-839, 1964.

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

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.

SHUKLA, T. P.; WIERZBICKI, L. E. Beta-galactosidase technology: a solution to the lactose problem. **Food Science and Nutrition**, v. 25, p. 325–356, 1975.

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

SPAHN, C.; MINTEER, S. D. Enzyme Immobilization in Biotechnology. **Recent Patent in Engineering**, v. 2, p. 195-200, 2008.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 631-637, 2000.

TELLO-SOLÍS, S. R.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; SARABIA-LEOS, C.; GÓMEZ-RUÍZ, L.; CRUZ-GUERRERO, A. E.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G. M.; GARCÍA-GARIBAY, M. Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* betagalactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10200-10204, 2005.

TORRES, P.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 230 - 235, 2012B.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β - galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 57-64, 2012A.

TORRES-SALAS, P.; DEL MONTE-MARTINEZ, A.; CUTINO-AVILA, B.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A.O.; PLOU, F.J. Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports. **Advanced Materials**, v. 23, p. 5275–5282, 2011.

TOSA, T.; MORI, T.; FUSE, N.; CHIBATA, I. Studies on continuous enzyme reactions. Part V. Kinetics and industrial application of aminoacylase column for continuous optical resolution of acyl-DL-amino acids. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 1047-1052, 1969.

TRAN, D. N.;BALKUS, K. J. **Topics** Enzyme Immobilization via Electrospinning. **in Catalysis**, v. 55, p.1057–1069, 2012.

VASILEVA, N.; IOTOVA, V.; IVANOV, Y.; GODJEVARGOV, T.; KOTI, N. Immobilization of β - galactosidase on modified polypropylene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 710-719, 2012.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2nd ed., Ed. CRC PRESS, p. 341-354, Florida, 2006.

ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 891-907, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade de *Aspergillus oryzae*^a

Fonte	SQ	Gl	MQ	Valor-F	Valor-P
Modelo	1.299,84	5	259,97	16,69	0,0039
Resíduo	77,87	5	15,57		
Total	1.377,71	10			

^a R = 0,97; R² = 0,94.

SQ, soma dos quadrados; Gl, graus de liberdade; MQ, média dos quadrados.

Apêndice B - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade imobilizada de *Aspergillus oryzae*^a

Fonte	SQ	Gl	MQ	Valor-F	Valor-P
Modelo	757,22	5	151,44	254,47	0,000005
Resíduo	2,97	5	0,59		
Total	760,19	10			

^a R = 0,99; R² = 0,99.

SQ, soma dos quadrados; Gl, graus de liberdade; MQ, média dos quadrados.

Apêndice C - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade de *Kluyveromyces lactis*^a

Fonte	SQ	GI	MQ	Valor-F	Valor-P
Modelo	98,35	5	19,67	55,97	0,0002
Resíduo	1,76	5	0,35		
Total	100,11	10			

^a R = 0,99; R² = 0,98.

SQ, soma dos quadrados; GI, graus de liberdade; MQ, média dos quadrados.

Apêndice D - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de regressão da atividade da β -galactosidade imobilizada de *Kluyveromyces lactis*^a

Fonte	SQ	GI	MQ	Valor-F	Valor-P
Modelo	31,32	5	6,26	140,95	0,00002
Resíduo	0,22	5	0,04		
Total	31,54	10			

^a R = 0,99; R² = 0,99.

SQ, soma dos quadrados; GI, graus de liberdade; MQ, média dos quadrados.