

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Brenda Isadora Soares Damin**

**Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suporte de quitosana**

**Passo Fundo**

**2022**

**Brenda Isadora Soares Damin**  
**Engenheira Química**

**Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suporte de quitosana**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jeferson Steffanello Piccin

Coorientador: Dra. Janaína Fischer

Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de Alimentos e Ingredientes

**Passo Fundo**

**2022**

CIP – Catalogação na Publicação

---

D159i Damin, Brenda Isadora Soares  
Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suporte  
de quitosana [recurso eletrônico] / Brenda Isadora Soares  
Damin. – 2022.  
1 MB ; PDF.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Steffanello Piccin  
Coorientadora: Profa. Dra. Janaína Fischer.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2022.

1. Quitosana. 2. Lactose. 3. Xerogel. 4. Hidrólise.  
I. Piccin, Jeferson Steffanello, orientador. II. Fischer,  
Janaína, coorientadora. III. Título.

CDU: 664

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**


A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

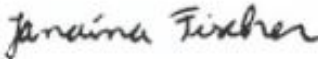
**“Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suportes a base de quitosana”**

Elaborada por  
**Brenda Isadora Soares Damin**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Comissão Examinadora**

  
**Prof. Dr. Jefferson Steffanello Piccin**  
Orientador e Presidente – UPF

  
**Profa. Dra. Janaína Fischer**  
Coorientadora  
Comissão examinadora - UPF

  
**Profa. Dra. Aline Dettmer**  
Comissão examinadora – UPF

  
**Profa. Dra. Carla Zanella Guidini**  
Membro externo – UFU

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2022**

*Dedico às minhas avós, Ercília e Madalena,  
pois nenhuma árvore alcança os céus sem a força de suas raízes.  
Dedico aos meus pais, Silvana e Olivar,  
pelo apoio e amor incondicional de sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha maior inspiração, minha mãe Silvana, por ser uma mulher forte, determinada, alto astral e por sempre me apoiar e sonhar junto comigo. Agradeço ao meu pai Olivar e aos meus irmãos por todo apoio, suporte e diversão de sempre. Agradeço ao Luan pela paciência e companheirismo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jeferson Steffanello Piccin por todo o auxílio, contribuições, ensinamentos e por ter me concebido autonomia para realização deste trabalho.

Agradeço à minha coorientadora Prof. Dra. Janaína Fischer por todos os ensinamentos, disponibilidade e por ter sido sempre muito prestativa comigo.

Agradeço à Prof. Dra. Aline Dettmer por ter me concebido a oportunidade de trabalhar com iniciação científica durante a graduação. Sou imensamente grata por isso.

Agradeço à bolsista de iniciação científica Giovana e à doutoranda Thaís, que não mediram esforços durante as etapas deste projeto, por toda ajuda, parceria, disponibilidade e amizade. Em nome delas, agradeço aos demais bolsistas e alunos que me auxiliaram durante este período, em especial, a Fernanda e os integrantes do grupo de pesquisa do professor Jeferson.

Aos meus colegas e amigos, em especial, a Verônica e a Lara que estiveram do meu lado em todos os momentos, tornando-os mais leve.

Agradeço a Universidade de Passo Fundo, o Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, o curso de Engenharia Química, professores, alunos e funcionários, por todo o suporte fornecido para a realização deste trabalho.

*“A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar  
e humilde o bastante para aprender”  
Clarice Lispector*

## RESUMO

A enzima  $\beta$ -galactosidase apresenta grande potencial de aplicação nas indústrias alimentícias, em decorrência de sua capacidade de realizar a hidrólise da lactose, dissacarídeo presente no leite, soro de leite e derivados lácteos. A enzima pode ser utilizada na forma livre, em processos em batelada, ou então na forma imobilizada, que permite operação contínua e proporciona maior estabilidade enzimática. A escolha do método e do suporte para imobilização da enzima é fundamental, pois o desempenho do biocatalisador é fortemente influenciado pelas propriedades do material empregado e pelos mecanismos de interação entre suporte e enzima. A adsorção física é um método de imobilização simples e mais comumente empregado, e pode ser conciliado com o *cross-linking*. Aliado a isso, os biopolímeros são materiais promissores para a imobilização enzimática, principalmente pela não toxicidade e disponibilidade de inúmeros locais reativos. A quitosana, pelos seus grupos amins, apresenta forte interação com a enzima e pode ser proposta para formar compósito com sílica, afim de combinar suas propriedades e aumentar a estabilidade da enzima imobilizada. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar os suportes de enzimas desenvolvidos a partir de quitosana para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase (*Kluyveromyces lactis*). Para isso, duas abordagens de desenvolvimento de suportes a base de quitosana foram avaliadas. A primeira consiste em suporte desenvolvido por gotejamento de uma solução de quitosana em uma solução de coagulação contendo hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e etanol 26% (v/v). A segunda consiste na síntese de compósitos adsorventes a base de quitosana e sílica obtida pela técnica de sol-gel (xerogéis). Os xerogéis foram desenvolvidos a partir de diferentes concentrações de glutaraldeído para verificar a influência da adição do agente reticulante. Em relação aos suportes de quitosana obtidos por coagulação, o pH de imobilização e a concentração enzimática foram otimizados para 6,0 e  $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ . Nestas condições a eficiência de imobilização e o grau de inativação da enzima foram 27% e 69%, respectivamente. Após seis ciclos de reuso o biocatalisador manteve 56% de eficiência de imobilização. O suporte produzido pela técnica sol-gel (xerogel) apresentou eficiência de imobilização entre 15,83% e 17,38%. A reticulação da quitosana com glutaraldeído provocou aumento o grau de inativação da enzima. Porém, até a concentração de 2:1 (glutaraldeído: unidades monoméricas de quitosana, mol: mol) a reticulação também aumentou a eficiência de imobilização. Diante disso, o suporte de quitosana obteve resultados mais promissores para imobilização da  $\beta$ -galactosidase em relação aos xerogéis de quitosana/sílica. Os resultados obtidos atribuem ao suporte de quitosana desenvolvido uma alternativa para viabilizar a utilização da enzima na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Quitosana. Xerogel. Lactose. Hidrólise.



## ABSTRACT

$\beta$ -galactosidase enzyme has a great potential for application in the food industry due to its ability to carry out the hydrolysis of lactose, a disaccharide present in milk, whey, and dairy products. The enzyme can be used in the free form, in batch processes, or immobilized, allowing continuous operation and providing greater enzymatic stability. The choice of the method and the support for enzyme immobilization is fundamental since the performance of the biocatalyst is strongly influenced by the properties of the material used and by the mechanisms of interaction between support and enzyme. Physical adsorption is a simple and most commonly used immobilization method, and it can be reconciled with cross-linking. Allied to this, biopolymers are promising materials for enzymatic immobilization, mainly due to the non-toxicity and the availability of numerous reactive sites. Chitosan, due to its amine groups presents a strong interaction with the enzyme and can be used to form a composite with silica, to combine its properties and increase the stability of the immobilized enzyme. In this sense, this work aimed to evaluate the enzyme supports developed from chitosan for the immobilization of the  $\beta$ -galactosidase enzyme (*Kluyveromyces lactis*). For this, two approaches of the development of chitosan-based supports were evaluated. The first consists of a support developed by dropping chitosan solution into a coagulation solution containing 1 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide and 26% ethanol (v/v). The second is the synthesis of adsorbent composites based on chitosan and silica obtained by the sol-gel technique (xerogels). The xerogels were developed from different concentrations of glutaraldehyde to verify the influence of the crosslinking agent addition. Regarding the chitosan supports obtained by coagulation, the immobilization pH and the enzyme concentration were optimized for 6.0 and 5.0 mL L<sup>-1</sup>. Under these conditions, the immobilization efficiency and the degree of enzyme inactivation were 27% and 69%, respectively. After six cycles of reuse, the biocatalyst maintained 56% of immobilization efficiency. The support produced by the sol-gel technique (xerogel) showed immobilization efficiency between 15.83% and 17.38%. The crosslinking of chitosan with glutaraldehyde increased the degree of enzyme inactivation. However, crosslinking increased the immobilization efficiency up to a concentration of 2:1 (glutaraldehyde: chitosan monomer units, mol: mol). Therefore, the chitosan support obtained more promising results for the immobilization of the  $\beta$ -galactosidase than chitosan/silica xerogels. The results obtained attribute to the chitosan support developed an alternative to enable the use of the enzyme in the food industry.

Keywords: Chitosan. Xerogel. Lactose. Hydrolysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da coluna de leito fixo para a imobilização da enzima (25°C, durante 7h; $C_0= 5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e hidrólise da lactose (37°C; $C_0= 50 \text{ g L}^{-1}$ ) com recirculação .....	24
Figura 2: Análise de microscopia eletrônica de varredura do suporte de quitosana (a: Chi) e do biocatalisador imobilizado (b: ChiEnz).....	25
Figura 3: Curva da análise termogravimétrica a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ do suporte de quitosana (Chi) e do suporte de quitosana após a imobilização (ChiEnz).....	26
Figura 4: Espectros da análise FTIR para o suporte de quitosana (Chi) e o biocatalisador imobilizado (ChiEnz) .....	27
Figura 5: Eficiência de imobilização (a) e índice de inativação (b) da enzima imobilizada (25°C, durante 24h; $C_0= 5 \text{ mL L}^{-1}$ ) em função do pH de imobilização .....	28
Figura 6: Atividade específica da enzima imobilizada (pH 6,0; 25°C durante 24 horas) em função das concentrações enzimáticas .....	29
Figura 7: Comportamento da enzima imobilizada (pH 6,0, $C_0=5 \text{ mL L}^{-1}$ durante 24 horas a 25°C) em função das temperaturas na reação de hidrólise ( $50 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, pH 6,8 durante 30 minutos).....	30
Figura 8: Efeito da temperatura sobre a desativação térmica da enzima imobilizada: a) Cinética de desativação térmica para a enzima imobilizada (pH 6,0, $5 \text{ mL L}^{-1}$ durante 24 horas a 25°C); b) Gráfico de Arrhenius da constante cinética da desativação térmica .....	32
Figura 9: Reuso da enzima imobilizada (pH 6,0, $5 \text{ mL L}^{-1}$ durante 24 horas a 25°C).....	34
Figura 10: Conversão de lactose ( $C_0: 50 \text{ g L}^{-1}$ ) em relação ao tempo de reação de hidrólise (T: 37°C; pH 6,8) utilizando enzima imobilizada em coluna ( $C_0: 5 \text{ mL L}^{-1}$ ; pH 6,0) a) conversão instantânea na saída da coluna; b) conversão total do meio reacional .....	35
Figura 11: Imagens dos xerogéis desenvolvidos (conforme Tabela 2) .....	40
Figura 12: Índice de inativação e eficiência de imobilização da enzima imobilizada a 25°C durante 1 hora na concentração enzimática de $5 \text{ mL L}^{-1}$ em pH 6,8.....	42
Figura 13: Reuso da enzima imobilizada nos suportes XE 1:0, XE 1:1 e XE 1:2 na hidrólise da lactose com concentração de $50 \text{ g L}^{-1}$ e pH 6,8.....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 ARTIGO DE REVISÃO: CHALLENGES AND PERSPECTIVES OF THE B-GALACTOSIDASE ENZYME .....</b>	<b>16</b>
<b>3 ARTIGO EXPERIMENTAL: IMOBILIZAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Materiais.....	19
3.2.2 Desenvolvimento do suporte de quitosana.....	19
3.2.3 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase .....	20
3.2.4 Determinação da atividade enzimática.....	20
3.2.5 Caracterização do suporte antes e após a imobilização enzimática .....	21
3.2.6 Influência da temperatura sobre a atividade da $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	22
3.2.7 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	22
3.2.8 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	23
3.2.9 Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo	
23	
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Caracterização do suporte antes e após o processo de imobilização da $\beta$ -galactosidase .....	25
3.3.2 Otimização do processo de imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase .....	28
3.3.3 Influência da temperatura durante a reação de hidrólise.....	30
3.3.4 Cinética de desativação térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	31
3.3.5 Reuso da enzima $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	34
3.3.6 Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo	
35	
<b>3.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>4 <i>SHORT COMMUNICATION</i>: DESENVOLVIMENTO DE SUPORTE DE QUITOSANA-SÍLICA PARA IMOBILIZAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE</b>	
<b>37</b>	

<b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.2.1 Materiais.....	38
4.2.2 Síntese do suporte utilizando a técnica sol-gel.....	39
4.2.3 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase .....	40
4.2.4 Determinação da atividade enzimática.....	41
4.2.5 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	42
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.3.1 Influência do glutaraldeído na imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase .....	42
4.3.2 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	44
<b>4.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>46</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas com atividade catalítica que apresentam uma ampla gama de aplicações nas indústrias de processamento de alimentos e de fármacos (PUNEKAR, 2018). Segundo a *BCC Research*, em 2018, o mercado de enzimas industriais atingiu US \$ 5,5 bilhões podendo alcançar em 2026, US \$ 8,7 bilhões (MARKETSANDMARKETS, 2020). Esse crescimento se deve, principalmente, às progressivas preocupações ambientais, bem como pelos aspectos multifuncionais das enzimas que, aliados às inovações tecnológicas, permitem uma ampla gama de aplicações.

Dentre essas enzimas está a  $\beta$ -galactosidase, comumente referida como lactase, presente em plantas superiores, animais e microrganismos e a sua produção por tecnologias utilizando esses organismos é estimada em cerca de 5,75 milhões de toneladas métricas por ano (XAVIER et al., 2018). Dentre as principais aplicações, a  $\beta$ -galactosidase é utilizada para sintetizar produtos galactosilados e hidrolisar a lactose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) dos produtos lácteos, formando os monômeros, glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e galactose ( $C_6H_{12}O_6$ ) (HUSAIN et al., 2011). A lactose é um importante componente do leite e do soro de leite, mas sua presença em produtos lácteos apresenta algumas desvantagens relacionadas à sua baixa solubilidade, tendência a absorver odores e sabores e higroscopia. Outra restrição deve-se à intolerância a este dissacarídeo por aproximadamente 70% da população mundial (LIMA et al., 2021; XAVIER et al., 2018).

A utilização do soro lácteo para a geração de produtos de alto valor agregado, apresenta forte potencial econômico, visto que o soro lácteo quando comparado ao próprio leite contém maior concentração de lactose e, conseqüentemente, alto valor nutritivo. Portanto, a hidrólise da lactose não só permite o consumo pelos intolerantes a lactose, mas também pode intensificar a valorização do soro de leite (SAQIB et al., 2017; MATHIÚS et al., 2016)

Há dois métodos para a conversão de lactose, o método ácido e o método enzimático. O método enzimático possui vantagens em relação ao método ácido, pelas condições de operação moderadas, como temperatura e pH, e baseia-se na adição da  $\beta$ -galactosidase como o catalisador da reação (MATHIÚS et al., 2016). Entretanto, a aplicação da enzima em sua forma livre é bastante limitada por diversos fatores, principalmente pela a instabilidade operacional e térmica, possibilidade de contaminação do meio reacional e dificuldade recuperação da enzima no final do processo, impactando os custos operacionais (BEYLER-CIGIL et al., 2021; BILAL; IQBAL, 2019; ASGHER et al., 2014). Nesse sentido, a imobilização enzimática apresenta-se como uma técnica promissora.

Biocatalisadores imobilizados podem propiciar uma melhor estabilidade da enzima em relação a condições de reação adversas, como pH, temperatura e presença de solventes orgânicos, e uma menor ou nula contaminação do produto, fator crucial para aplicação nas indústrias alimentícias (GONÇALVES et al., 2018; PUNEKAR, 2018). Além disso, enzimas imobilizadas são passíveis de serem recuperadas ao final do processo, possibilitando o reuso, o que permite a redução de custos e de processos redundantes de purificação (GONÇALVES et al., 2018; DATTA et al., 2013). Entretanto, há no mercado poucas enzimas imobilizadas, sendo o desenvolvimento de suportes uma das fronteiras do conhecimento para a ampla aplicação desta tecnologia.

Nesse contexto, além de eficientes, é desejável que esses biocatalisadores sejam produzidos de maneira sustentável e que o processo de imobilização seja economicamente viável (BILAL; IQBAL, 2019; CANTONE et al., 2013). Os fatores que influenciam nessa produção são o método de imobilização e o suporte, que afetam diretamente as características e as propriedades finais do biocatalisador (DAMIN et al., 2021; BARBOSA et al., 2013). Dentre os métodos de imobilização a adsorção física é um dos métodos mais empregados e destaca-se por ser simples e reversível, o que permite a recuperação do suporte. Entretanto, apresenta como desvantagem a possível dessorção da enzima durante a sua utilização. Assim, a adsorção física, pode ser conciliada com o *cross-linking*, método realizado para reticular a enzima ao suporte e contribuir para sua estabilização (DAMIN et al., 2021; SHELDON, 2007).

A seleção do suporte apropriado é o desafio mais crucial, devido ao seu impacto considerável nas propriedades das biomoléculas e do sistema catalítico (BILAL et al., 2018). Dentre os suportes utilizados, os biopolímeros apresentam vantagens notáveis relacionadas ao desempenho e estabilidade biocatalítica (KAWAGUTI et al., 2006). Além disso, são suportes promissores na imobilização enzimática pelas suas propriedades versáteis, como não toxicidade, biodegradabilidade e disponibilidade de inúmeros locais reativos, fornecendo um microambiente ao redor da molécula que favorece as reações bioquímicas (BAKSHI et al., 2020). Entre os biopolímeros, a quitosana se destaca pelo seu custo reduzido, disponibilidade de seus grupos funcionais e grande quantidade de poros, o que proporcionam maior difusão do substrato no biocatalisador (BAKSHI et al., 2020; CHEBA, 2020). Diante desse contexto, a sílica pode ser proposta para formar um compósito com a quitosana, a fim de melhorar as características finais do suporte, por apresentar excelentes propriedades mecânicas (MACHADO et al., 2022; RICARDI et al., 2018).

Desta forma, objetiva-se avaliar se suportes de enzimas desenvolvidos a partir de quitosana são eficientes na imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase, verificando a sua eficácia na hidrólise da lactose. Os objetivos específicos são:

- a) desenvolver um suporte de quitosana para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase;
- b) otimizar o processo de imobilização frente ao pH do meio e a concentração de enzima;
- c) verificar o efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica da enzima imobilizada;
- d) avaliar a estabilidade operacional da enzima imobilizada frente a ciclos de reuso do suporte;
- e) testar a hidrólise da lactose em reator de leito fixo;
- f) avaliar a imobilização da  $\beta$ -galactosidase em um compósito de sílica e quitosana, verificando a influência da adição de glutaraldeído como agente reticulante.

Neste contexto, a pesquisa enquadra-se na linha de pesquisa de “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de Alimentos e Ingredientes”, dentro do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos”, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Universidade de Passo Fundo. Este trabalho está estruturado em 5 capítulos, conforme especificado a seguir: No Capítulo 1 está apresentada a introdução geral, que relaciona o trabalho com a Linha de Pesquisa do PPGCTA, apresenta objetivos e justificativas. O Capítulo 2 contempla uma revisão bibliográfica publicada na revista *Applied Microbiology and Biotechnology* sobre o assunto, envolvendo as principais técnicas de imobilização e os suportes, bem como os desafios e as perspectivas desse processo. O Capítulo 3 apresenta uma proposta para um artigo experimental sobre o suporte de quitosana para a imobilização da enzima. O Capítulo 4 apresenta uma proposta de *short communication* para os materiais xerogéis na imobilização da enzima. No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões gerais e as sugestões para trabalhos futuros. Por fim, os apêndices e anexos apresentam informações suplementares como curvas e métodos, bem como as produções científicas produzidas durante o período do mestrado, não diretamente ligadas com a dissertação.

## **2 ARTIGO DE REVISÃO: CHALLENGES AND PERSPECTIVES OF THE B-GALACTOSIDASE ENZYME**

Esta revisão bibliográfica evidenciou as principais técnicas de imobilização enzimática e os suportes mais utilizados para constituição dos biocatalisadores, além de indicar materiais alternativos com potencial para imobilização de  $\beta$ -galactosidase e a importância de sua aplicação biotecnológica. O desenvolvimento desse capítulo está apresentado em um artigo científico que está publicado na referência:

DAMIN, B. I. S.; KOVALSKI, F. C.; FISCHER, J.; PICCIN, J. S.; DETTMER, A. Challenges and perspectives of the  $\beta$ -galactosidase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, n. 13, p. 5281-5298, 2021. 10.1007/s00253-021-11423-7.



### 3 ARTIGO EXPERIMENTAL: IMOBILIZAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA

#### Resumo

A imobilização de enzimas possibilita o aumento da estabilidade térmica e operacional do biocatalisador. A técnica de imobilização e o suporte são os fatores intrínsecos desse processo e determinam a viabilidade econômica e industrial. O objetivo do trabalho foi desenvolver um suporte de quitosana para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase por meio da adsorção física. Os materiais foram caracterizados antes e após o processo de imobilização a partir do TGA, FTIR e MEV. Nesses ensaios foram observadas alterações físicas e químicas do material de quitosana para o biocatalisador imobilizado, sendo que o biocatalisador apresentou uma estabilidade térmica superior ao material de quitosana. O pH e a concentração enzimática foram otimizadas na imobilização para pH 6,0 e 5 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo obtida uma atividade enzimática de 507 U nessa condição. A estabilidade térmica foi avaliada na reação de hidrólise e na cinética de desativação. Uma redução na atividade enzimática da enzima tanto com o aumento, quanto com a redução da temperatura em relação à condição ótima (37°C) foi observado. A cinética de desativação térmica da enzima imobilizada resultou em uma energia de ativação de 49,34 kcal mol<sup>-1</sup>. Além disso, foi avaliada a estabilidade operacional da enzima imobilizada a partir de ensaios de reuso e de testes em reator de leito fixo. Após seis ciclos, a enzima imobilizada apresentou 56% da atividade residual inicial. Os testes em reator foram realizados com recirculação e demonstraram a possibilidade de realizar toda a conversão de lactose. Diante desse contexto, o suporte de quitosana desenvolvido possuiu potencial aplicação na imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase.

**Palavras-chaves:** Adsorção. Caracterização de biocatalisador. Estabilidade. Coluna de leito fixo.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A lactose é um dos principais componentes do leite, soro de leite e derivados lácteos (BRITO, 2007). A presença desse dissacarídeo nos produtos lácteos apresenta algumas desvantagens associadas à insolubilidade e fraco poder adoçante e à intolerância por parte da população (FREITAS et al., 2020). A incidência de intolerância à lactose em diferentes populações em todo o mundo varia de 5% a 100%, estimando-se que 75% das pessoas apresentam uma diminuição da atividade da lactase na idade adulta (FREITAS et al., 2020; HUSAIN, 2011).

Para atender, com produtos adequados, ao crescente número de indivíduos com intolerância à lactose, a indústria alimentícia tem buscado formas de beneficiar a saúde dos consumidores e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos (LIMA et al., 2021; BALTHAZAR et al., 2017). Diante disso, a hidrólise da lactose é um processo importante para

as indústrias de laticínios, pois possibilita a valorização e diversificação de produtos a partir da produção de lácteos zero lactose, ou com teor de lactose reduzido (XAVIER et al., 2018; MATHIÚS et al., 2016). Além de diminuir os problemas industriais associados à cristalização e aumentar o poder adoçante desses produtos (PANESAR; KUMARI, 2010).

A hidrólise pode ser realizada pelo método ácido ou pelo método enzimático, sendo que o método enzimático ocorre em condições operacionais mais brandas (MATHIÚS et al., 2016; FISHCER et al., 2013). Neste contexto, a  $\beta$ -galactosidase é utilizada para realizar hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica da lactose em glicose e galactose. Atualmente, esta enzima é obtida principalmente de alguns microrganismos com *Generally Recognized as Safe* (GRAS) como *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Kluyveromyces fragilis* e *K. lactis*. Sendo que a lactase de *Kluyveromyces lactis* apresenta um pH ótimo de 6,8 a 7,0 e atua de forma ótima a 35°C, sendo promissora para a aplicação no leite e no soro lácteo (XAVIER et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018; PUNEKAR, 2018).

A purificação e caracterização de enzimas é cara e demorada, não sendo econômico descartar (inativar) as enzimas após cada uso, quando na forma livre (solúvel) (BEYLER-CIGIL et al., 2021). Nesse sentido, a imobilização enzimática é um processo promissor para viabilizar a utilização da  $\beta$ -galactosidase na indústria de alimentos (DAMIN et al., 2021; XAVIER et al., 2018). A imobilização possibilita a reutilização do biocatalisador, devido a obtenção de um biocatalisador insolúvel no meio reacional, e facilita a sua separação do meio reacional, reduzindo custos de processo (URRUTIA et al., 2018). Além disso, com a imobilização é possível aumentar a estabilidade operacional e térmica da enzima, aspectos importantes para o processamento industrial (BEYLER-CIGIL et al., 2021; MATEO et al., 2007).

No processo de imobilização dois fatores afetam diretamente nas características e propriedades do biocatalisador: a técnica de imobilização e o suporte. Os métodos de imobilização mais comumente empregados são ligação covalente, adsorção física e o método de adsorção conciliado com o *cross-linking* (DAMIN et al., 2021). Dentre os métodos de imobilização a adsorção física destaca-se por ser simples e reversível, o que permite a recuperação do suporte (LIMA et al., 2021). Além disso, a seleção do suporte apropriado é o desafio mais crucial, devido ao seu impacto considerável nas propriedades das biomoléculas e do sistema catalítico (BILAL et al., 2018). Dentre os suportes utilizados, a quitosana se destaca pelo seu custo reduzido, disponibilidade de seus grupos funcionais e grande quantidade de poros, o que proporcionam maior difusão do substrato no biocatalisador (BAKSHI et al., 2020; CHEBA, 2020). A quitosana é um biopolímero normalmente obtido a partir

da desacetilação alcalina da quitina presente em carapaças de crustáceos, mas também está presente em exoesqueletos de insetos e na parede celular de microrganismos (MACHADO et al., 2022; LIU et al., 2019). A quitosana tem sido reconhecida como um suporte promissor de enzimas pelas suas propriedades versáteis, como não toxicidade, biodegradabilidade e disponibilidade de inúmeros locais reativos, fornecendo um microambiente ao redor da molécula que favorece a reação bioquímica (BAKSHI et al., 2020). Lima et al. (2021) avaliaram um suporte a base de quitosana para a imobilização da enzima e o biocatalisador desenvolvido apresentou maior estabilidade térmica do que a enzima livre. No estudo de Klein et al. (2016) foram realizadas análises similares para suportes a base de quitosana e após 60 minutos de incubação em condições não reativas as preparações imobilizadas foram mais estáveis que a enzima livre.

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver um suporte de quitosana e avaliar sua eficiência na imobilização da  $\beta$ -galactosidase (*K. lactis*) pelo método de adsorção, verificando sua eficácia na hidrólise da lactose. Além disso, o trabalho teve como objetivo avaliar o biocatalisador desenvolvido com relação a estabilidade térmica, a partir de diferentes temperaturas reacionais e de incubação, e a estabilidade operacional, a partir do reuso e da aplicação na hidrólise de lactose em reator de leito fixo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Materiais

A  $\beta$ -galactosidase de fonte *Kluyveromyces lactis* (concentração proteica de 54,9 mg mL<sup>-1</sup> de proteína) foi adquirida da Globalfood (Brasil). A lactose monohidratada (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) foi obtida da Nathupharma. A quitosana foi obtida de origem crustáceo seguindo a metodologia proposta por Weska et al. (2007) e adaptada por Moura et al. (2015). O método de produção é apresentado em material suplementar (ANEXO A). Os demais reagentes utilizados foram de padrão analítico.

### 3.2.2 Desenvolvimento do suporte de quitosana

Para a preparação das partículas de quitosana foi adaptado o método descrito por Klein et al. (2012). Quitosana 4% (m/v) foi preparada em ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2(aq)</sub>) 2% (v/v) à temperatura de 25°C. A solução foi gotejada em uma solução de coagulação 1:1 (v/v), composta

hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}_{(aq)}$ )  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e solução aquosa de etanol 26% (v/v). A quantidade de solução de quitosana na solução de coagulação foi na relação volumétrica de 1:2, a fim de evitar saturação de material na solução. O material foi mantido em contato com a solução de coagulação durante 24 horas. Após esse período, o material foi lavado com água destilada até a neutralização do pH.

### 3.2.3 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase

A imobilização enzimática foi realizada de acordo com o método proposto por Guidini et al. (2010), com adaptações. Um volume de 25 mL de solução enzimática em tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi incubado com 0,5 g de suporte de quitosana (b.s.), sob agitação de 50 rpm em incubadora rotativa (Tecnal, TE-421) a  $25^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, o suporte foi separado da solução residual e lavado com 75 mL de tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução de enzima livre, a enzima imobilizada, a solução residual e a solução de lavagem foram submetidas aos ensaios de determinação da atividade enzimática.

Para a otimização das melhores condições de imobilização foi avaliado o pH da solução enzimática mantendo-se fixa a concentração de  $5 \text{ mL L}^{-1}$ . O pH da solução enzimática foi variado em pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0 (em tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A partir dos resultados obtidos, foi avaliado o efeito da concentração enzimática para a enzima livre e imobilizada com o pH otimizado (em tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A concentração da solução enzimática foi variada em  $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $15,0 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $30,0 \text{ mL L}^{-1}$ ,  $60,0 \text{ mL L}^{-1}$ . Para todos os ensaios foi determinado a atividade enzimática específica da enzima imobilizada.

### 3.2.4 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada a partir da reação de hidrólise da lactose e determinação da concentração da glicose formada. As reações foram conduzidas com 0,5 gramas de biocatalisador imobilizado em um reator de mistura contendo 100 mL de solução de lactose na concentração de  $50 \text{ g L}^{-1}$  em pH 6,8 (em tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), sob agitação de 50 rpm e temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos (Fisatom, 711S). Aos 30 minutos foi retirado uma amostra e inserida em um banho de água em ebulição para a completa inativação da enzima. A concentração de glicose foi determinada pelo método glicose-oxidase, apresentado em material suplementar (ANEXO B). Sendo que a concentração de glicose foi

determinada por espectrofotometria a 505 nm (Tecnal, UV-5100), conforme a curva padrão ([Glicose]= 3.5024\*absorbância,  $R^2 > 0,99$ ). Para todos os ensaios foi determinado o índice de inativação e a eficiência de imobilização, conforme a Equação 1 e 2, respectivamente.

$$II = \frac{A_{EL} - (A_{SR} + A_{SL} + A_{EI})}{A_{EL}} \quad (1)$$

$$EI = \frac{A_{EI}}{A_{EL}} \quad (2)$$

sendo:

$II$ : índice de inativação (%);

$EI$ : eficiência de imobilização (%);

$A_{EL}$ : atividade residual da enzima livre (%);

$A_{EI}$ : atividade residual da enzima imobilizada (%);

$A_{SR}$ : atividade residual da solução residual (%);

$A_{SL}$ : atividade residual da solução de lavagem (%);

A unidade de atividade específica (U) foi definida como micro mol de glicose produzidos por grama de suporte por minuto ( $\mu\text{mol g}_{\text{suporte}} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e representados pela média.

### 3.2.5 Caracterização do suporte antes e após a imobilização enzimática

Após a otimização do processo de imobilização os suportes (esferas de quitosana) foram submetidos a caracterização físico e química antes (Chi) e após o processo de imobilização (ChiEnz). A análise de Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FTIR) (Agilent Technologies, Cary 630) foi realizada utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) com 1 g do material. A análise foi realizada entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$ , e cada espectro foi escaneado 48 vezes com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram processados usando o software MicroLab versão B.5 (Agilent Technologies). Para a realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (VEGA 3, Tescan) com uma tensão de aceleração de 10 a 15 kV. As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio usando fita de carbono, revestidas com uma fina camada de ouro usando o equipamento da Quorum (modelo Q150R ES).

As análises termogravimétricas (TG) foi executada usando *Netzsch* (modelo STA 449 F3) em atmosfera inerte de nitrogênio a uma vazão de 20 mL min<sup>-1</sup> com 10 mg de material. A temperatura foi variada de 20°C até 800°C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A variação da massa das amostras foi monitorada ao longo do aquecimento.

### 3.2.6 Influência da temperatura sobre a atividade da β-galactosidase imobilizada

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de temperatura na atividade da β-galactosidase imobilizada. Esse experimento foi realizado na condição de imobilização otimizada. Os experimentos foram realizados com concentração de lactose de 50 g L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8) e temperatura do meio reacional de 25°C, 37°C, 45°C, 60°C e 75°C. Para todos os ensaios foi determinada a atividade enzimática residual.

### 3.2.7 Estudo da estabilidade térmica da β-galactosidase imobilizada

O estudo da estabilidade térmica foi realizado de acordo com o método proposto por Guidini et al. (2011), com adaptações. As amostras foram colocadas em 25 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) pH otimizado e incubadas em banho termostático em diferentes temperaturas. Para cada temperatura de incubação, 0,5 gramas de biocatalisador imobilizado foram removidos em intervalos de tempo apropriados (2 em 2 min a 60 ± 1°C; 4 em 4 a 55 ± 1°C; 7 em 7 min a 50 ± 1°C; 13 em 13 min a 45 ± 1°C). Essas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e a atividade residual foi determinada com concentração inicial de lactose de 50 g L<sup>-1</sup>, pH 6,8 a 37 ± 1°C.

Os resultados da atividade enzimática residual em função do tempo de incubação para cada temperatura foram ajustados a modelos de desativação térmica de primeira ordem de Levenberg-Marquardt (MORE, 1997), conforme Equação 3. O tempo de meia-vida da enzima imobilizada foi determinado conforme Equação 4. Para determinar a energia de ativação da desativação térmica, os resultados da atividade enzimática em função da temperatura foram ajustados ao modelo de Arrhenius, utilizando o Microsoft Office Excel, conforme Equação 5.

$$\ln \frac{A(t)}{A_0} = -k_d \cdot t \quad (3)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,69}{k_d} \quad (4)$$

$$\ln(k_d) = \ln k_d^* - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (5)$$

sendo:

$\frac{A(t)}{A_0}$ : atividade enzimática relativa (%);

$k_d$ : constante de desativação térmica ( $\text{min}^{-1}$ );

$k_d^*$ : fator de frequência para a reação;

$t$ : tempo (min);

$t_{\frac{1}{2}}$ : tempo de meia-vida (min);

$E_d$ : energia de desativação térmica ( $\text{kcal mol}^{-1}$ );

$R$ : constante universal dos gases ( $8,13 \text{ J mol.K}^{-1} = 1,99 \text{ cal mol.K}^{-1}$ );

$T$ : temperatura (K);

### 3.2.8 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada

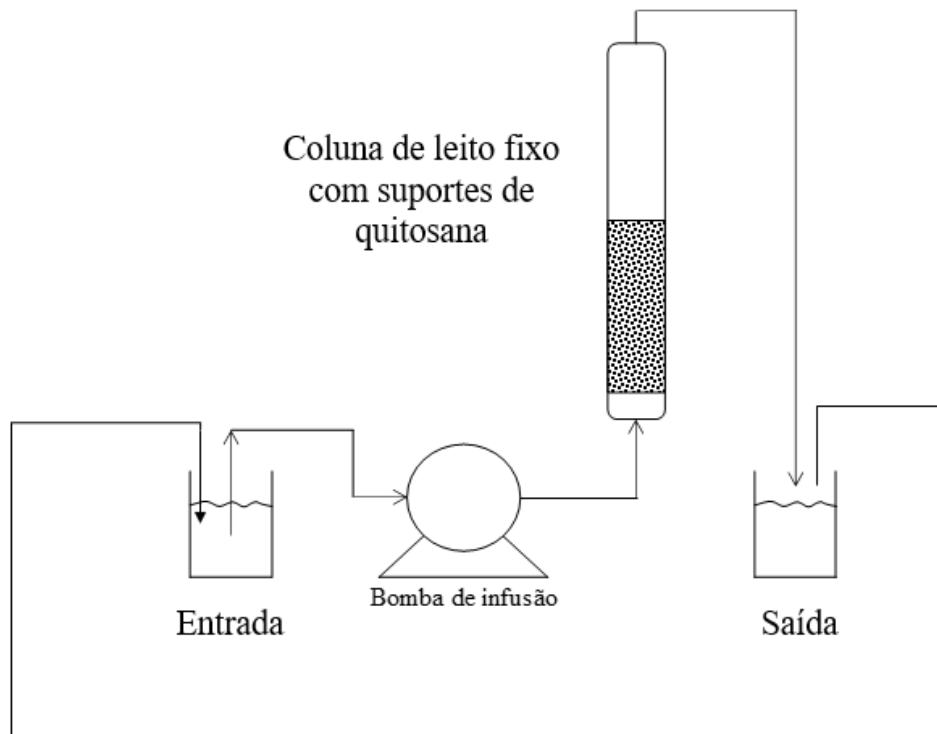
Os ensaios de reuso foram realizados em duas etapas. Primeiro a enzima foi imobilizada no suporte de quitosana e a atividade enzimática foi determinada no tempo inicial. Na segunda etapa foram realizadas cinco hidrólises consecutivas, cada hidrólise no tempo de 30 minutos, e calculada a atividade residual em relação a inicial. No intervalo de cada hidrólise o biocatalisador imobilizado era lavado com 75 mL de solução tampão fosfato de potássio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH otimizado. Todos os experimentos foram executados nas a  $37 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,8 (em tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e concentração inicial de lactose de  $50 \text{ g L}^{-1}$ .

### 3.2.9 Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo

A estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase imobilizada em esferas de quitosana foi avaliada em coluna de leito fixo, conforme apresentado na Figura 1. Na coluna foram inseridas 2,0 gramas de suporte de quitosana (b.s.). A imobilização ocorreu com passagem ascendente e com recirculação de 200 mL de solução enzimática  $5 \text{ mL L}^{-1}$ , a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e vazão de  $10 \text{ mL min}^{-1}$  durante 7 horas. Após esse período, o biocatalisador foi lavado com 300 mL de solução tampão fosfato de potássio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0), sem recirculação. A hidrólise da lactose ocorreu a partir da passagem ascendente de 500 mL de solução de lactose  $50 \text{ g L}^{-1}$ , a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e vazão de  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . A solução de lactose foi recirculada até atingir máxima conversão de lactose em glicose e determinada a concentração de glicose por

glicose-oxidase. Para avaliar o processo foram retiradas amostras no meio reacional e na saída da coluna.

Figura 1: Esquema da coluna de leito fixo para a imobilização da enzima (25°C, durante 7h;  $C_0= 5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e hidrólise da lactose (37°C;  $C_0= 50 \text{ g L}^{-1}$ ) com recirculação



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

A conversão de lactose foi determinada de acordo com a Equação 6.

$$C_{\%} = \frac{C_G \times \frac{MM_L}{MM_G}}{C_L} \quad (6)$$

sendo:

$C_{\%}$ : conversão de lactose (%);

$C_G$ : concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ );

$C_L$ : concentração inicial de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ );

$MM_L$ : massa molar da lactose ( $\text{g mol}^{-1}$ );

$MM_G$ : massa molar da glicose ( $\text{g mol}^{-1}$ ).

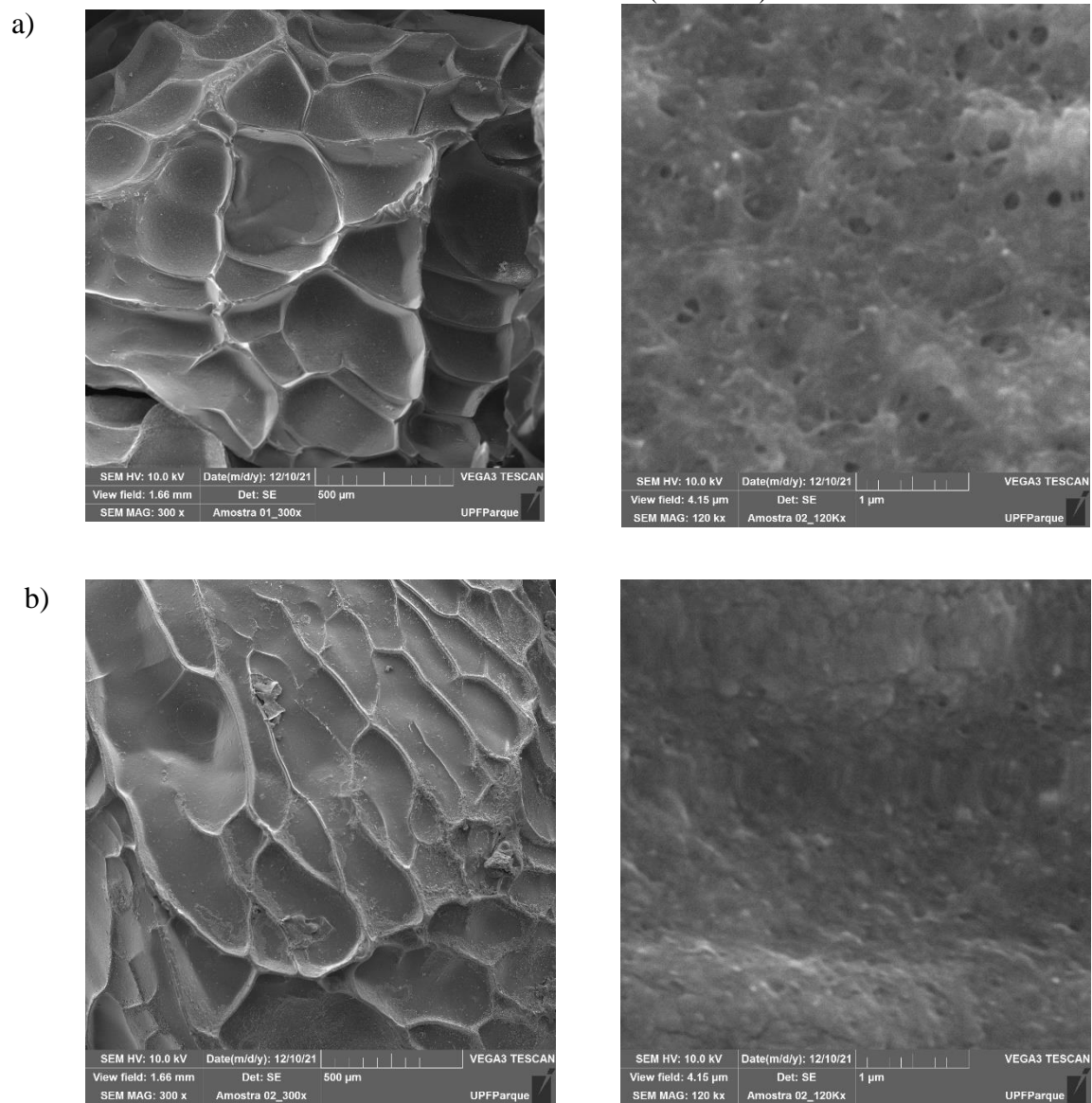


### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Caracterização do suporte antes e após o processo de imobilização da $\beta$ -galactosidase

A Figura 2 apresenta microscopia eletrônica de varredura que revela a textura e morfologia da superfície do suporte de quitosana e do biocatalisador imobilizado.

Figura 2: Análise de microscopia eletrônica de varredura do suporte de quitosana (a: Chi) e do biocatalisador imobilizado (b: ChiEnz)

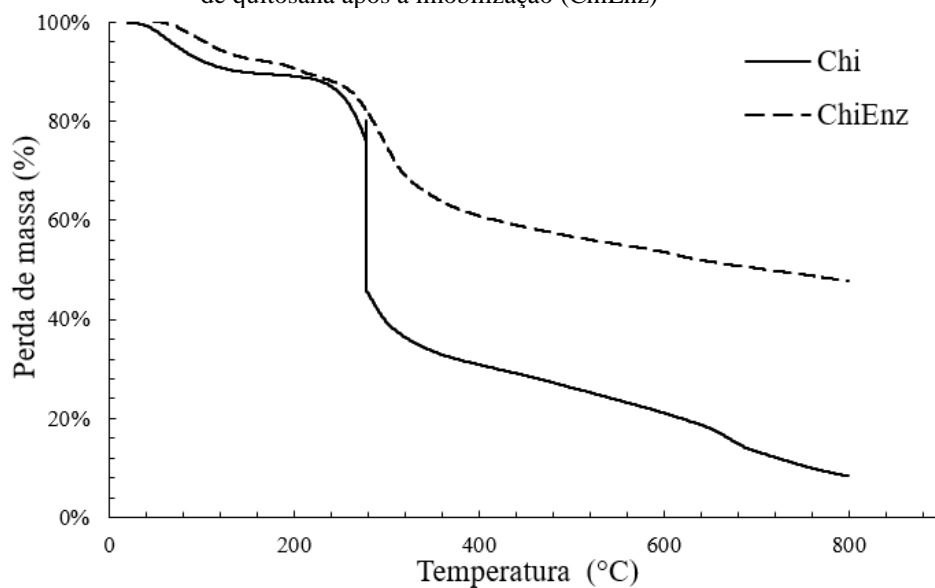


Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

As imagens em 300x mostram uma superfície lisa com saliências em ambas as amostras. No entanto, nas imagens em 120000x é possível observar a diferença entre os materiais. O material Chi apresentou pequenos orifícios na superfície enquanto o material ChiEnz, apresentou uma superfície com menos poros. Essas alterações morfológicas sugerem que antes da imobilização, o suporte apresentou maior área superficial, revelada pela presença dos orifícios, permitindo a ligação entre enzima e suporte. Após, a imagem apresentou uma aparência mais turva, sugerindo que a enzima está imobilizada na superfície do suporte (BRAGA et al., 2014).

A estabilidade térmica do suporte de quitosana e do suporte de quitosana após a imobilização da enzima foram medidas utilizando análise termogravimétrica. As mudanças na massa da amostra com o aumento da temperatura são mostradas na Figura 3.

Figura 3: Curva da análise termogravimétrica a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do suporte de quitosana (Chi) e do suporte de quitosana após a imobilização (ChiEnz)



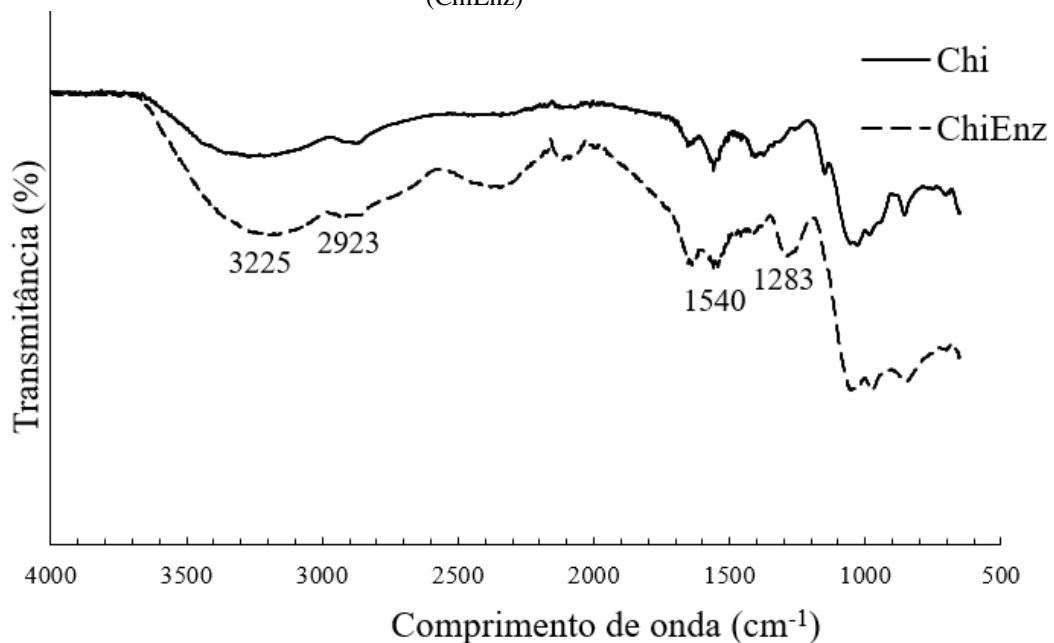
Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Em ambas as amostras houve uma perda de massa brusca após a temperatura de  $200^{\circ}\text{C}$  relativa à degradação da quitosana. Esta etapa de decomposição pode ser atribuída à desidratação dos anéis sacarídeos e despolimerização (KLEIN et al., 2016; ZOHURIAAN E SHOKROLAHI, 2004). O residual de matéria a temperatura de  $800^{\circ}\text{C}$  para o suporte e o biocatalisador imobilizado foi de 38% e 48%, respectivamente. No estudo de Klein et al. (2016) foram obtidas maiores perdas de massa utilizando um material de quitosana reticulado, alcançando a  $270^{\circ}\text{C}$  25,8% e 30,8% de material residual para o material sem e com a presença da enzima, respectivamente. Além disso, ambas as curvas de TGA indicam que o suporte de

quitosana seria termicamente estável na faixa de temperatura ótima utilizada no processo de reação da hidrólise da lactose, de até 55°C, dependendo da fonte microbiana (XAVIER et al., 2018).

A Figura 4 apresenta a análise FTIR para o suporte de quitosana e o biocatalisador imobilizado.

Figura 4: Espectros da análise FTIR para o suporte de quitosana (Chi) e o biocatalisador imobilizado (ChiEnz)



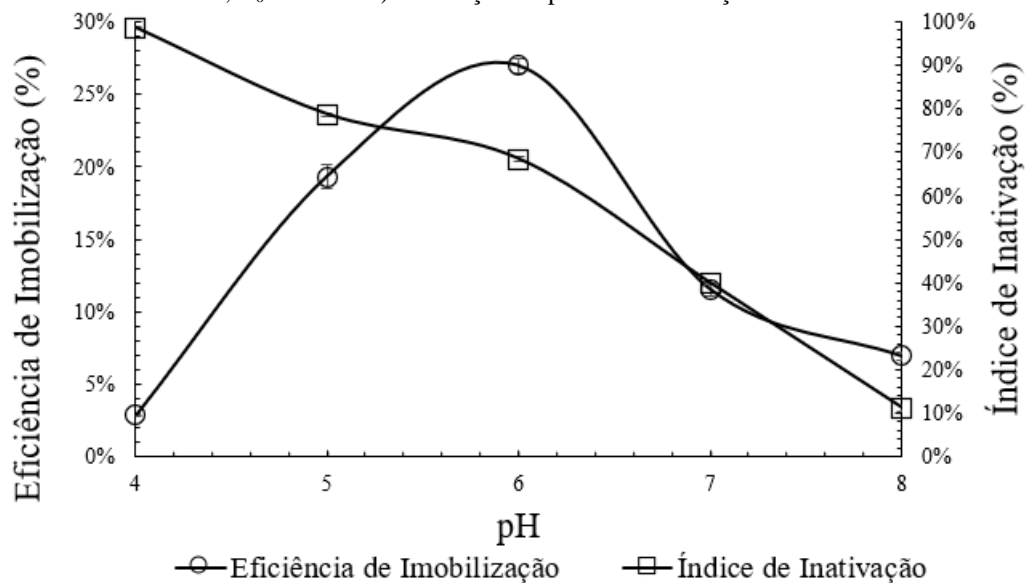
Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Os dois espectros (Chi e ChiEnz) mostraram uma banda larga entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  que foi atribuído à vibração do estiramento OH, presente na estrutura química da quitosana e devido a presença de água intramolecular, a qual provavelmente se sobrepõe às vibrações médias de estiramento amina ( $\text{NH}_3$ ) na mesma região (SOUZA et al., 2019; KLEIN et al., 2016; LAMBERT, 1987). As bandas entre 3000  $\text{cm}^{-1}$  e 2800  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas à vibração de estiramento CH (SOUZA et al., 2019; COLTHUP;DAILY;WIBERLEY, 1975). Os picos em aproximadamente 1655  $\text{cm}^{-1}$  e 1510  $\text{cm}^{-1}$  e correspondem a deformação de amina no biocatalisador imobilizado (SOUZA et al., 2019). A região de 1400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  se refere a deformação da ligação C-N e estiramentos da ligação C-O presente na quitosana, que podem sofrer deslocamento no processo de imobilização (DENNIS et al., 2016) observado no espectro do biocatalisador (ChiEnz).

### 3.3.2 Otimização do processo de imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase

Na Figura 5 está apresentado o comportamento da enzima imobilizada em quitosana em diferentes valores de pH de imobilização (tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os parâmetros avaliados foram o índice de inativação e a eficiência de imobilização.

Figura 5: Eficiência de imobilização (a) e índice de inativação (b) da enzima imobilizada ( $25^\circ\text{C}$ , durante 24h;  $C_0 = 5 \text{ mL L}^{-1}$ ) em função do pH de imobilização



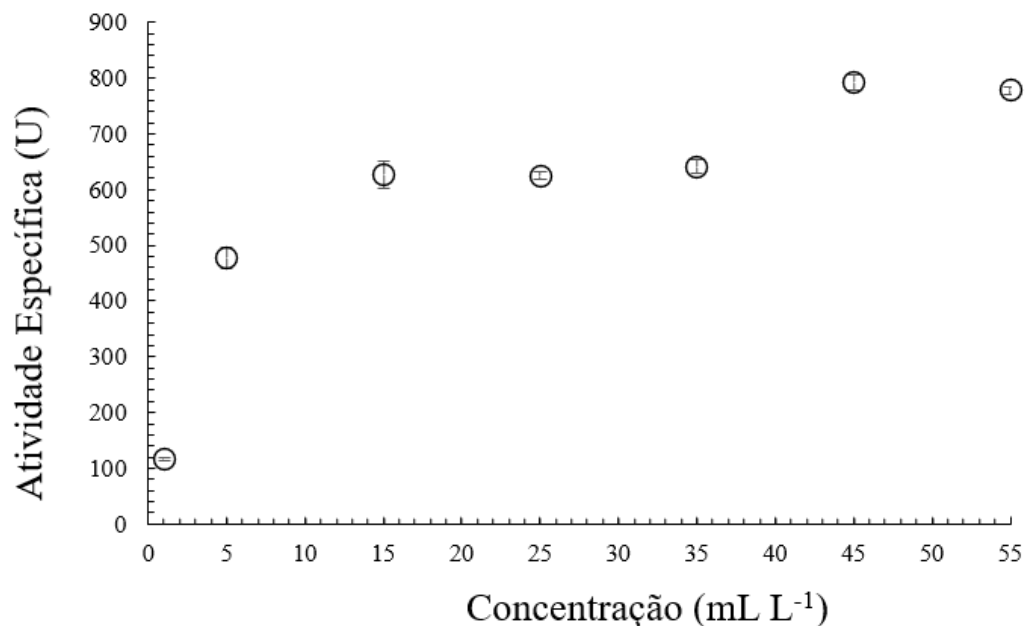
Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

O índice de inativação da enzima após o processo de imobilização diminuiu conforme aumentou o pH. No entanto, a eficiência de imobilização apresentou um valor máximo em pH 6,0 e diminuiu com o distanciamento desse pH, tanto para meios mais ácidos, quanto para mais básicos. O pH da solução aquosa afeta o grau de ionização das moléculas adsorvidas e grupos funcionais na superfície do composto (LIMA et al., 2021). Estudos relataram que em pH ácido a quitosana apresenta grupos protonados (MACHADO et al., 2022). Nessa condição, a ligação covalente entre a enzima e o suporte pode prevalecer, devido a presença de grupamentos amins no suporte altamente reativos com a enzima (FREITAS et al., 2020). No entanto, é possível observar que em pH 4,0 e 5,0 houve uma alta inativação da enzima. A hipótese está em ligações covalentes multipontos entre o suporte e a enzima, o que possivelmente causou alterações na conformação terciária da estrutura enzimática e diminuiu a recuperação da atividade. Logo, em pH 6,0 pode ter prevalecido interações físicas, incluindo forças de Van der Waals, interações iônicas e ligação de hidrogênio entre a enzima e o suporte, o que resultou em uma maior eficiência de imobilização. Sob essa condição, espera-se que os grupos  $\epsilon$ -amino lisina não

carregados sejam bastante baixos e, portanto, a possibilidade de ligações covalentes é baixa (FREITAS et al., 2020). Nesse sentido, considerando os efeitos decorrentes da alteração do pH o valor mais adequado para a imobilização enzimática é aquele que resulte na máxima eficiência de imobilização. Estudos similares apresentaram melhores condições de imobilização em pH 6,5 (BEYLER-CIGIL et al., 2021) e em pH 7,0 (KATROLIA et al., 2019). Diante disso, os ensaios de concentração enzimáticas foram conduzidos a pH 6,0, correspondente a uma atividade enzimática de 507 U.

A eficiência de imobilização é um parâmetro que depende da quantidade de enzima que é exposta em contato com o suporte. Essa dependência está relacionada com a saturação do suporte em relação a capacidade de reter a enzima (JESIONOWSKI, ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Na Figura 6 estão apresentadas as atividades específicas da enzima imobilizada para as diferentes concentrações.

Figura 6: Atividade específica da enzima imobilizada (pH 6,0; 25°C durante 24 horas) em função das concentrações enzimáticas



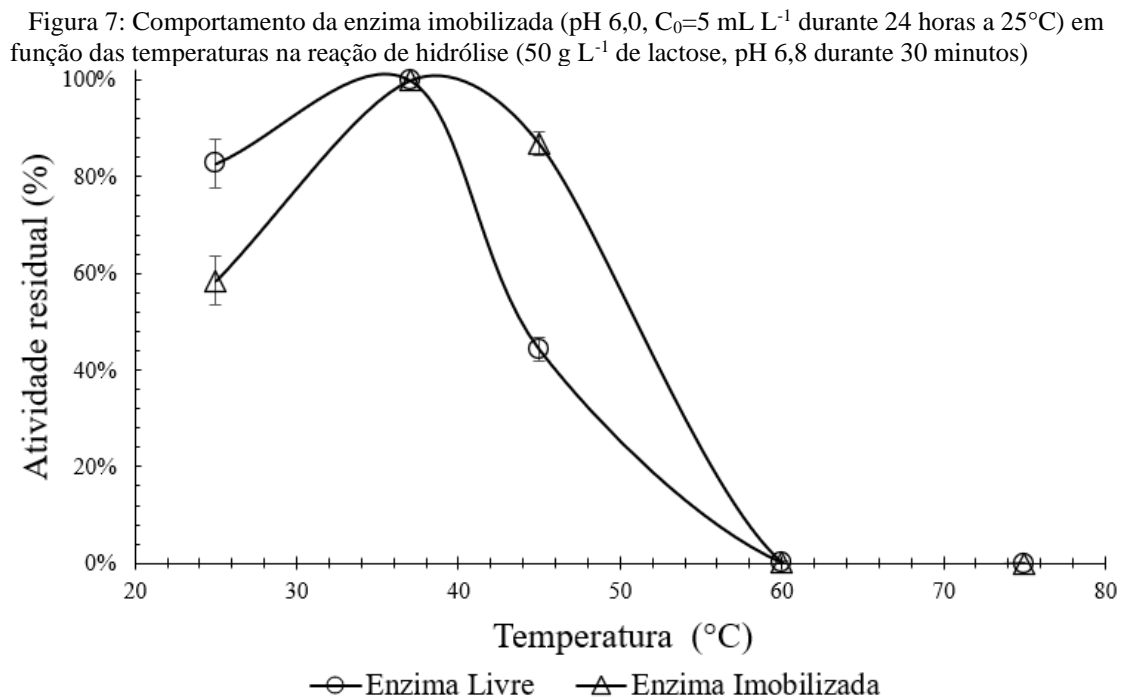
Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Apesar do aumento da concentração enzimática resultar em um aumento da atividade específica, a diferença entre as respostas foi diminuindo em relação as primeiras concentrações. A curva tendeu a formar um platô de adsorção, demonstrando uma parcial saturação do suporte. No estudo de Guidini et al. (2010), da  $\beta$ -galactosidase imobilizada em Duolite A568, não houve diferença significativa com o aumento da concentração enzimática, avaliado após a concentração enzimática de 16 g L<sup>-1</sup>. Nesse sentido, com o objetivo de reduzir o consumo de

enzima e, conseqüentemente, o custo do processo, foi definida a concentração enzimática de 5 mL L<sup>-1</sup> para os ensaios subsequentes.

### 3.3.3 Influência da temperatura durante a reação de hidrólise

A velocidade das reações enzimáticas depende da temperatura (LIMA et al., 2021). No entanto, pode ocorrer diminuição da atividade enzimática, devido a desnaturação da enzima em determinadas temperaturas (LIMA et al., 2021; WOLF et al., 2018). A estabilidade térmica da enzima imobilizada é fundamental para a aplicação em processos industriais. Diante disso, a enzima livre e a enzima imobilizada foram avaliadas em diferentes temperaturas e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7 é possível observar que houve uma redução na atividade enzimática da enzima tanto com o aumento quanto com a redução da temperatura em relação à condição ótima (37°C). A redução da atividade enzimática a 25°C é explicada pela velocidade de uma reação química ser proporcional à temperatura. Nessa condição, a enzima livre obteve uma atividade superior a enzima imobilizada, demonstrando que, além da redução da atividade, a difusão do substrato pelo biocatalisador imobilizado é um fenômeno controlador do processo reacional. A difusão é um fenômeno que ocorre quando há

um fluido dentro de uma matriz porosa, sendo que a taxa de difusão diminui com o decréscimo da temperatura (CREMASCO, 2019). Nesse sentido, se a difusão do substrato for menor que a velocidade de reação da enzima, a reação não ocorrerá da mesma forma que ocorre com a enzima livre (VITOLLO et al., 2015). No caso de uma reação enzimática, o aumento da difusão em altas temperaturas é anulada pelo processo de desnaturação da enzima.

Na temperatura de 45°C ocorre a redução da atividade residual em ambas as enzimas em comparação com a temperatura de 37°C. No entanto, a atividade residual da enzima imobilizada foi superior à da enzima livre. Esse comportamento demonstra o aumento da estabilidade térmica da enzima após o processo de imobilização. O suporte de quitosana foi capaz de formar um microambiente entorno da enzima, mantendo a sua capacidade catalítica. Nesse sentido, os resultados demonstraram que o biocatalisador imobilizado manteve sua atividade enzimática em uma faixa de temperatura superior à enzima livre. No estudo de Klein et al. (2012) foram obtidas as melhores atividades da enzima  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada na temperatura de 45 °C.

Nas temperaturas de 60°C e 75°C a atividade residual foi próxima a zero. A diminuição da atividade enzimática é causada pela desnaturação estrutural da enzima, segundo Shafi et al. (2021), devido ao aumento da temperatura, que aumenta as vibrações das moléculas e ocasiona o rompimento das interações e ligações de hidrogênio que estabilizam a enzima, causando a diminuição e até inativação da atividade catalítica.

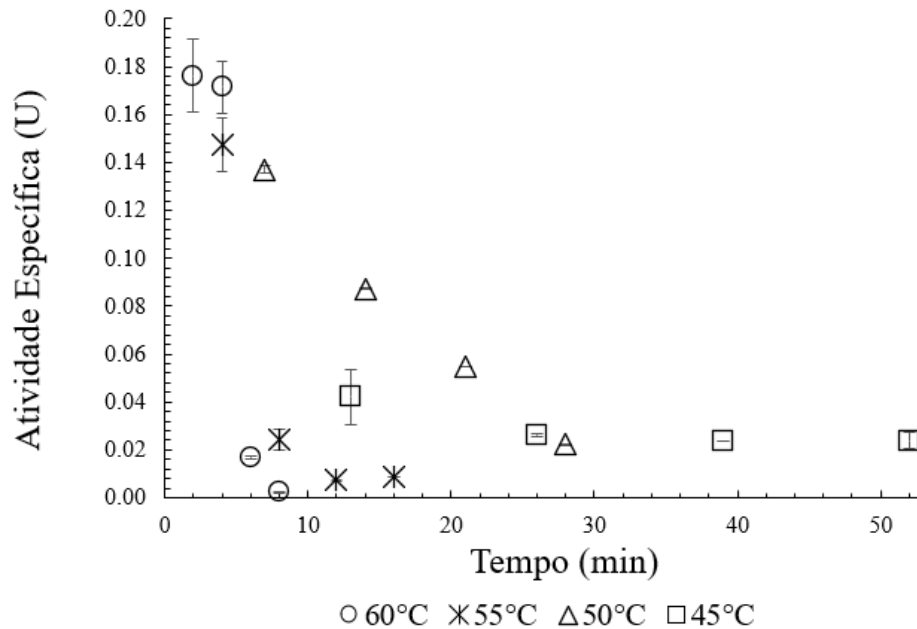
Argenta et al. (2021), avaliaram a influência da temperatura na enzima livre e imobilizada e obtiveram resultados similares aos desse trabalho. A temperatura ótima foi de 35 °C, sendo que na temperatura de 45 °C a enzima imobilizada teve maior atividade enzimática quando comparada à atividade enzimática da livre. De Albuquerque et al. (2018), avaliou as temperaturas de 37, 45, 50, 55 e 60 °C na hidrólise da lactose utilizando a enzima imobilizada em partículas de quitosana. A conversão de lactose foi mais efetiva na temperatura de 37°C e 45°C, respectivamente. No entanto, há altas temperaturas ocorreu a diminuição na conversão de lactose, indicando a perda na atividade enzimática.

### **3.3.4 Cinética de desativação térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada**

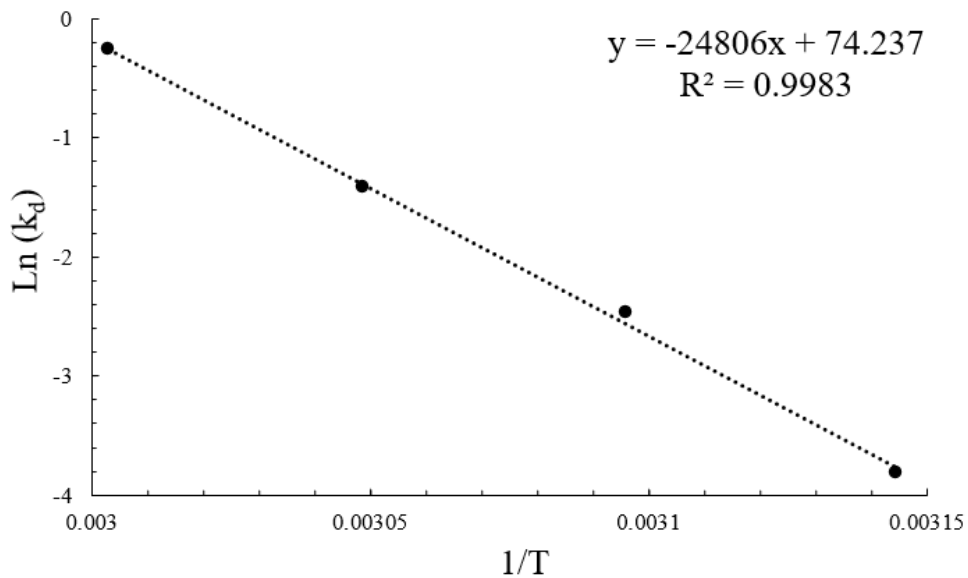
Na Figura 8a estão apresentadas as atividades específicas em função do tempo de incubação em relação à temperatura estudada, para a  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana.

Figura 8: Efeito da temperatura sobre a desativação térmica da enzima imobilizada: a) Cinética de desativação térmica para a enzima imobilizada (pH 6,0, 5 mL L<sup>-1</sup> durante 24 horas a 25°C); b) Gráfico de Arrhenius da constante cinética da desativação térmica

a)



b)



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

A forte dependência da estabilidade do biocatalisador imobilizado em diferentes temperaturas foi observada. Na temperatura de 60°C após 8 minutos de incubação houve 100% de decaimento da atividade residual. O decaimento baixou em conjunto com a temperatura, sendo que a 45°C foi de 57% após 52 minutos de incubação. Isso demonstra que as temperaturas mais baixas o biocatalisador imobilizado é mais resistente. No estudo de Urrutia et al. (2018)



foram obtidos resultados similares para um suporte de quitosana reticulado com glutaraldeído, após 50 minutos de incubação houve redução de mais de 50% da atividade residual.

A cinética de desativação térmica foi modelada pelo mecanismo de desativação de primeira ordem. Os resultados obtidos para as constantes de desativação ( $k_d$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e energia de ativação da desativação térmica ( $E_d$ ) estão apresentadas Tabela 1.

Tabela 1: Constante de desativação, tempo de meia-vida e energia de ativação da desativação térmica da enzima imobilizada em pH 6,0 a 5 mL L<sup>-1</sup> durante 24 horas a 25°C para diferentes tempos de incubação nas temperaturas de 45, 55, 50 e 60°C

Temperatura (°C)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$E_d$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
45	0,022	31,14	49,34
50	0,085	8,2	
55	0,240	2,9	
60	0,770	0,9	

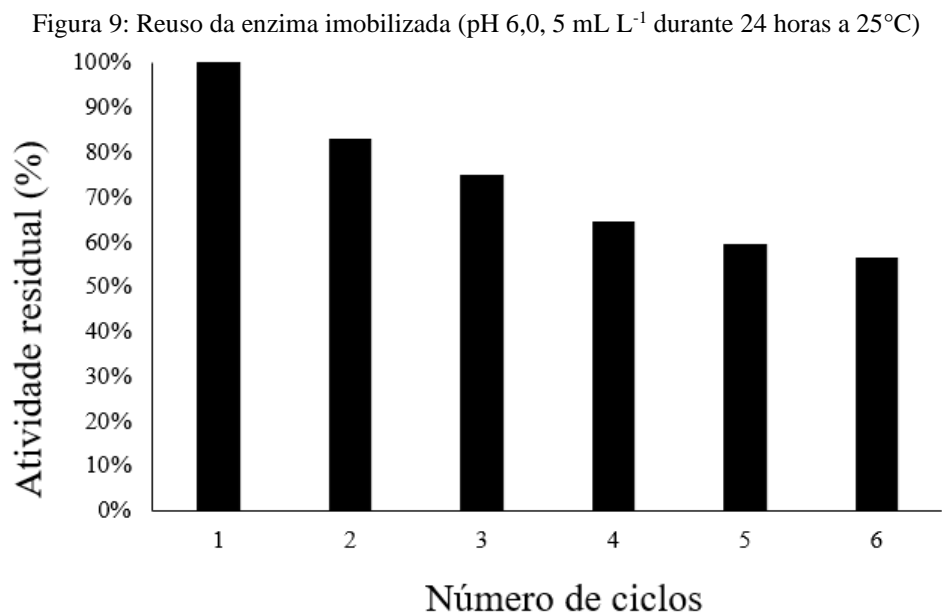
Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Observa-se que com a diminuição da temperatura há um aumento no tempo de meia-vida da enzima, de até 0,52 horas. O tempo de meia-vida é definido como o tempo em que a atividade da enzima se reduz à metade (PACHECO; MENDES, 2021). No trabalho de Urrutia et al. (2018) foi obtido resultados semelhantes utilizando como suporte quitosana reticulada e a  $\beta$ -galactosidase (*A. Oryzae*). Na temperatura de 60°C foi determinado um tempo de meia-vida 0,47 e 0,75 horas com suporte de quitosana reticulado com glutaraldeído e reticulado com epícloridrina, respectivamente. Braga et al. (2014) determinaram o tempo de meia-vida de 6,1 horas a 45°C para a enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada em suporte Eupergit® C. Esses resultados demonstram a forte dependência da estabilidade térmica da enzima em relação as diferentes temperaturas.

As medidas físicas da constante  $k_d$  foram consistentes com a teoria de Arrhenius, pois quanto maior a temperatura maior a constante de desativação térmica da enzima (GUIDINI et al., 2011). Na determinação da energia de ativação o ajuste linear obtido atingiu um coeficiente de determinação de 0,99, conforme apresentado na Figura 8b. Assim, a energia de ativação da desativação térmica da enzima foi de 49,34 kcal mol<sup>-1</sup>. O maior valor de energia de ativação da inativação térmica se traduz em uma enzima menos sensível à temperatura, ou seja, mais estável a elevadas temperaturas (PACHECO; MENDES, 2021).

### 3.3.5 Reuso da enzima $\beta$ -galactosidase imobilizada

A capacidade de reuso é uma vantagem desejável dos biocatalisadores imobilizados em relação às enzimas livres, causando uma diminuição nos custos operacionais do processo (FLORES et al., 2019). No primeiro ciclo o biocatalisador imobilizado apresentou uma atividade de 534 U e foi considerado como 100% de atividade residual para referenciar os ciclos seguintes, conforme Figura 9.



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Conforme observado na Figura 9 houve redução da atividade residual no decorrer dos ciclos. Há duas hipóteses para essa redução e essas hipóteses podem ocorrer simultaneamente. São elas: a dessorção da enzima causada pelo enfraquecimento da ligação entre a enzima e o suporte (LIMA et al., 2021) e a deformação do sítio ativo da enzima após reagir com o substrato da batelada antecedente (GENNARI et al., 2019). Em contraponto, no sexto ciclo foi possível manter mais que a metade da atividade inicial (60%). Isso indica a possibilidade de reuso do biocatalisador, porém, quanto mais ciclos forem realizados menor será a eficiência do processo. Além disso, há a possibilidade de restaurar a atividade enzimática adicionando mais enzima no meio, sendo que essa adição pode ocorrer a partir da solução residual do processo de imobilização.

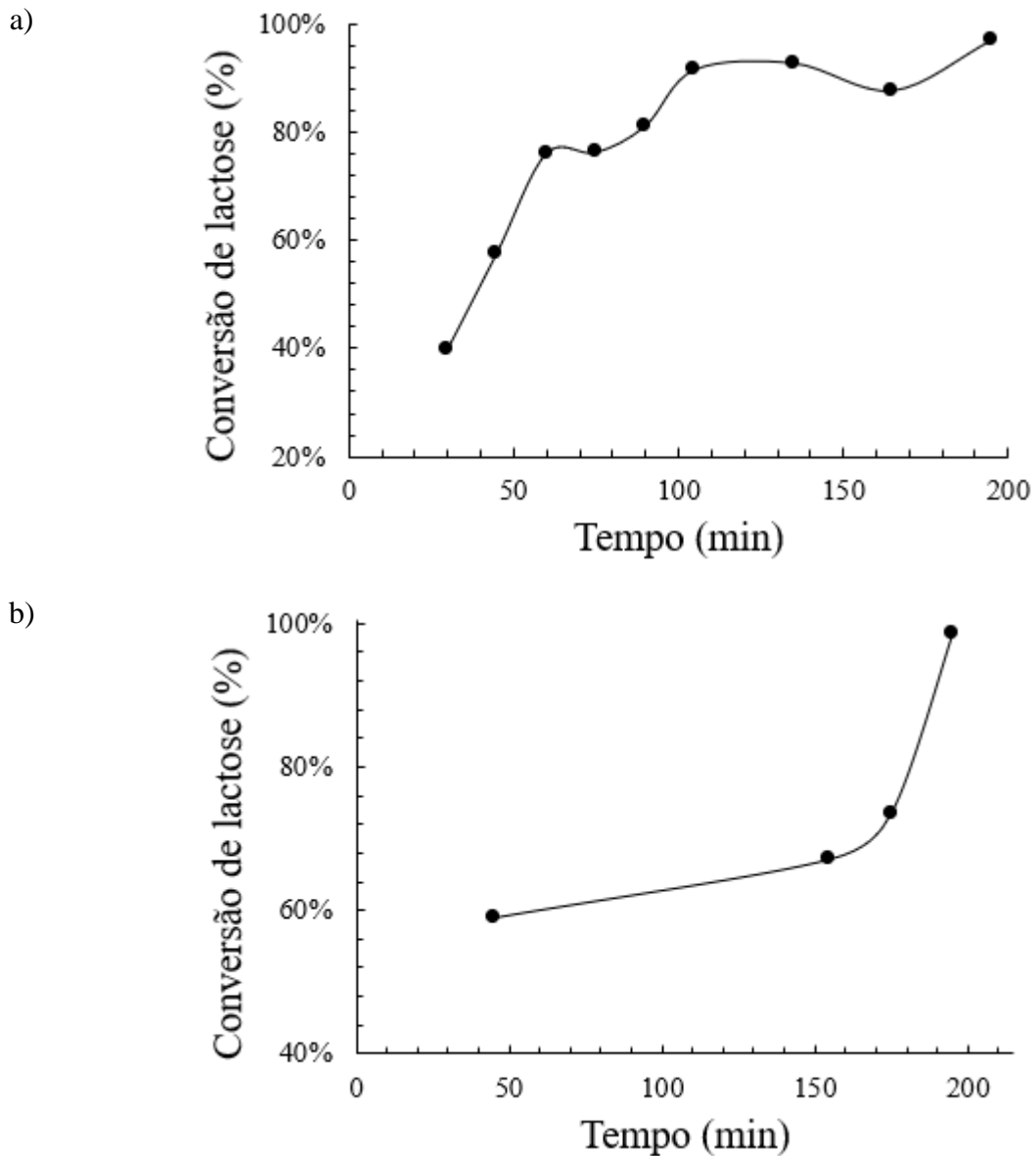
No estudo de Wahba e Soliman (2018) foi avaliado um suporte reticulado de goma gelana e quitosana que manteve 85,17% da atividade após 14 ciclos. Isso demonstra que a

reticulação vinculada a adsorção física é um processo alternativo para o aumento da estabilidade do biocatalisador e, conseqüentemente, para o aumento no número de ciclos. Contudo, a reticulação não foi avaliada neste trabalho.

### 3.3.6 Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo

Na Figura 10 está apresentada a conversão de lactose em relação ao tempo de reação de hidrólise na saída da coluna de leito fixo e no meio reacional, com recirculação.

Figura 10: Conversão de lactose ( $C_0$ : 50 g L<sup>-1</sup>) em relação ao tempo de reação de hidrólise (T: 37°C; pH 6,8) utilizando enzima imobilizada em coluna ( $C_0$ : 5 mL L<sup>-1</sup>; pH 6,0) a) conversão instantânea na saída da coluna; b) conversão total do meio reacional



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Observa-se que nos primeiros tempos de reação a variação da taxa de conversão de lactose na saída da coluna (Figura 10a) é superior a variação da taxa de conversão no meio reacional (Figura 10b). Isso ocorre devido ao maior volume de solução de lactose na entrada da coluna que ainda não foi convertido em glicose. No entanto, ao passo que vai se exaurindo a lactose no meio a taxa de conversão começa a reduzir devido, a menor relação entre substrato e enzima. A conversão máxima (100%) é atingida em 195 minutos. Isso demonstra que o biocatalisador foi capaz hidrolisar toda a lactose presente no meio. Fischer et al. (2013) estudou a hidrólise da lactose em dois reatores em série utilizando resina de troca iônica como suporte para a imobilização da enzima (de *A. oryzae*). Nesse estudo, a vazão de alimentação foi de 6 mL min<sup>-1</sup> e a conversão de lactose no primeiro reator foi de 65% e a conversão final foi de 82%, após 60 minutos de reação.

### 3.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, as condições de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em suportes de quitosana foram avaliadas. O material foi caracterizado em relação a aspectos físicos e químicos antes e após a imobilização, sendo observado alterações morfológicas do material de quitosana para o biocatalisador imobilizado e o aparecimento de picos de infravermelho, evidenciando a imobilização da enzima no suporte. Além disso, foi observado um aumento da estabilidade térmica do biocatalisador. As condições otimizadas durante o processo de imobilização foram de pH 6,0 (tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e concentração enzimática 5 mL L<sup>-1</sup>. A influência de temperatura foi estudada sobre a reação de hidrólise e sobre a inativação térmica da enzima. Em relação à temperatura de hidrólise, observou-se um incremento na estabilidade da enzima imobilizada com a elevação da temperatura e uma maior influência da difusão no interior do suporte com a redução da temperatura. Já o aumento da temperatura sobre a enzima imobilizada provocou o acréscimo da constante cinética de desativação térmica e redução no tempo de meia-vida, sendo representada por uma energia de desativação térmica na ordem de 49,34 kcal mol<sup>-1</sup>. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada nos ensaios de reuso e na aplicação em reator de leito fixo, sendo observado a possibilidade de reuso do biocatalisador bem como a aplicação na hidrólise da lactose em condições operacionais da indústria. Dessa forma, conclui-se que a esfera de quitosana desenvolvida se apresentou como um promissor suporte para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase.

## 4 *SHORT COMMUNICATION: DESENVOLVIMENTO DE SUPORTE DE QUITOSANA-SÍLICA PARA IMOBILIZAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE*

### Resumo

Biopolímeros como a quitosana são aplicados como suportes para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase. A técnica sol-gel com precursores de sílica é capaz de contornar algumas deficiências relacionadas à quitosana, como a baixa porosidade e área específica, possibilitando a imobilização da enzima por adsorção e ligações cruzadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em um suporte de sílica-quitosana, obtido utilizando a técnica sol-gel com adição de glutaraldeído, através da hidrólise da lactose. Para isso, foi determinado o índice de inativação e avaliado o efeito do agente reticulante no suporte. Por fim, a viabilidade de utilização da enzima imobilizada foi verificada através dos reusos. Foi observada imobilização de até 17,38% e índice de inativação de até 81,16%, sendo o XE 1:1 o mais promissor com eficiência de imobilização de 13,40% e índice de inativação de 16,30%, apresentando maior viabilidade de aplicação por até cinco vezes consecutivas. Dessa forma, concluiu-se que o compósito adsorvente a base de sílica, quitosana e glutaraldeído possui potencial aplicação na imobilização de enzimas.

**Palavras-chaves:** Adsorção. Reticulação. Sol-gel. Lactose.

### 4.1 INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas é um processo alternativo para contornar as desvantagens associadas a enzima livre, como estabilidade moderada, elevado custo e difícil recuperação no final do processo (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2019). Os fatores intrínsecos desse processo são as técnicas de imobilização e os suportes empregados. Uma das técnicas mais empregadas para imobilização de enzimas é a adsorção física, uma vez que promove pouca perturbação sobre a estrutura da enzima (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). Porém, apresenta desvantagens como a dessorção da enzima durante sua utilização (JESIONOWSKY; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Assim, a aplicação de um reagente bifuncional como o glutaraldeído, para criação de ligações cruzadas adicionais, tem o intuito de aumentar a estabilidade da enzima sobre o suporte e diminuir a dessorção durante o processo (MALHOTRA; BASIR, 2020; LETCA et al., 2004).

O desenvolvimento de materiais avançados com propriedades físicas, químicas e mecânicas favoráveis para atuar como suportes de enzimas é um contribuinte para um bom desempenho do biocatalisador imobilizado. A quitosana, um resíduo pesqueiro obtido da casca de camarão, destaca-se entre os materiais alternativos utilizados como suportes para

imobilização de enzimas, como na imobilização de lipases, catalases e  $\beta$ -galactosidases (MENDES et al., 2011). Entretanto, em sua forma natural, a quitosana é solúvel em meio ácido, possui baixa área superficial e porosidade, sendo essas características indesejáveis para um suporte (AHAMAD et al., 2019).

Deste modo, a utilização da técnica sol-gel para síntese de suportes possibilita a produção de materiais com várias composições estruturais, alto grau de pureza e elevada homogeneidade (BRAGA et al., 2014). Assim, o desenvolvimento de compósitos sintetizados a partir de sílica e quitosana através da técnica sol-gel com adição de glutaraldeído pode minimizar as características indesejáveis da quitosana, permitindo a imobilização da  $\beta$ -galactosidase.

Uma das funções da  $\beta$ -galactosidase é realizar a hidrólise da lactose dos produtos lácteos. A hidrólise apresenta-se como alternativa, pois proporciona uma melhoria nas características sensoriais desses produtos, conferindo maior solubilidade, poder adoçante e permitindo a obtenção de produtos adequados à alimentação de pessoas intolerantes a este açúcar (RICARDI et al., 2018).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces lactis* em um suporte de sílica-quitosana, obtido através da técnica sol-gel com adição de glutaraldeído, verificando o efeito da concentração do agente reticulante no compósito sobre a eficiência de imobilização e avaliando a viabilidade de reuso  $\beta$ -galactosidase imobilizada.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Materiais

A  $\beta$ -galactosidase de fonte *Kluyveromyces lactis* (54,9 mg mL<sup>-1</sup> de proteína) foi adquirida da Globalfood (Brasil). A lactose monohidratada (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) foi obtida da Nathupharma. A quitosana foi obtida de origem crustáceo seguindo a metodologia proposta por Weska et al. (2007) e adaptada por Moura et al. (2015). O método de produção é apresentado em material suplementar (ANEXO A). O glutaraldeído (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) 25% (m/v) foi da Dinâmica. Os demais reagentes utilizados foram de padrão analítico.

#### 4.2.2 Síntese do suporte utilizando a técnica sol-gel

Os compósitos foram sintetizados de acordo com o pedido da patente nº BR 102021 003136 0 (MACHADO; MELLO; PICCIN, 2021; MACHADO et al., 2022). Resumidamente, 10 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) precursor de sílica foram misturados com uma solução contendo 12 mL de etanol e 1 mL de uma solução de ácido clorídrico ( $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ )  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , que foi mantida sob agitação de 150 rpm por 2 h a  $35^\circ\text{C}$  (Tecnal, TE-421). Simultaneamente, 100 mL de uma solução aquosa contendo 1% de quitosana (m/v) em 2% de ácido acético (v/v) foi preparada e agitada até a solubilização total da quitosana (Fisatom, 752A). Posteriormente, essas duas soluções foram misturadas, à temperatura ambiente sob agitação de 100 rpm por 1 h, para completar a hidrólise da solução (Fisatom, 711S). Após esta etapa, o compósito sílica/quitosana foi reticulado com glutaraldeído em diferentes graus pela adição de diferentes volumes de glutaraldeído sob agitação mecânica constante por 1 h (Fisatom, 711S), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Volume de glutaraldeído 25% para a produção dos xerogéis

Amostra	Proporção (unidades de D-glucosamina:glutaraldeído)	Volume de glutaraldeído para 2 g de quitosana (mL)
XE 1:0	1:0	0,00
XE 2:1	2:1	0,96
XE 1:1	1:1	1,92
XE 1:2	1:2	3,84
XE 1:4	1:4	7,68
XE 1:6	1:6	11,52
XE 1:8	1:8	15,36

Fonte: Machado et al. (2022), com adaptações

As proporções de glutaraldeído foram baseadas no estudo de Poon, Wilson e Headley (2014) e Machado et al. (2022). Para a policondensação da sílica foi utilizada uma proporção volumétrica de 1:5 (para 10 mL de TEOS na solução de pré-hidrólise), e a mistura obtida na etapa anterior foi adicionada lentamente a uma solução contendo 12,21 mL de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ ) e 73,20 mL de etanol, que foi mantido sob agitação mecânica a 70 rpm por 5 min (Fisatom, 711S). Posteriormente, o material foi envelhecido a  $35^\circ\text{C}$  (DeLeo, DL-SED). Após as primeiras 24 h, o excesso de solução foi removido do sistema para acelerar a secagem. Assim, a secagem completa ocorreu em aproximadamente 5 dias. Após completa policondensação e secagem, o material foi lavado em extrator Soxhlet com acetona por 2 h (Tecnal, Sebelin TE-188), conforme metodologia adaptada de Shan et

al. (2019) . Posteriormente, foi mantido em dessecador a vácuo até a evaporação do solvente à temperatura ambiente (aproximadamente 2 a 3 dias).

As características dos materiais foram determinadas por Machado et al. (2022). Os materiais sintetizados com glutaraldeído apresentaram coloração marrom/alaranjada, conforme Figura 11. As áreas superficiais dos materiais XE 1:0, XE 1:2 e XE 1:8 (determinado por adsorção-dessorção de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), a 77 K) foram 70,68, 42,23 e 19,06 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os poros foram distribuídos na faixa de 13 a 14 Å, indicando uma predominância de microporos.

Figura 11: Imagens dos xerogéis desenvolvidos (conforme Tabela 2)



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

#### 4.2.3 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase

A imobilização enzimática foi realizada de acordo com o método proposto por Guidini et al. (2010). Um volume de 10 mL de solução enzimática 5 mL L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8) foi incubado com 0,5 g de suporte de quitosana, sob agitação de 50 rpm em incubadora rotativa (Tecnal, TE-421) a 25°C por 1 hora. Em seguida, o suporte foi separado da solução residual e lavado com 30 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>,



pH 6,8). A solução de enzima livre, a enzima imobilizada, a solução residual e a solução de lavagem foram submetidas aos ensaios de determinação da atividade enzimática.

#### 4.2.4 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada a partir da reação de hidrólise da lactose e determinação da concentração de glicose. As reações foram conduzidas em um reator de mistura contendo 100 mL de solução de lactose na concentração de 50 g L<sup>-1</sup> em pH 6,8 e 0,5 gramas de biocatalisador imobilizado, sob agitação de 50 rpm e temperatura de 37 ± 1°C durante 30 minutos (Fisatom, 711S). Aos 30 minutos foi retirado uma amostra e inserida em um banho de água em ebulição para a completa inativação da enzima. A concentração de glicose foi determinada pelo método glicose-oxidase, apresentado no material suplementar (ANEXO B). Sendo que a concentração de glicose foi determinada por espectrofotometria a 505 nm (Tecnal, UV-5100), conforme a curva padrão ([Glicose]= 3.5024\*absorbância, R<sup>2</sup>> 0,99). Para todos os ensaios foi determinado o índice de inativação e a eficiência de imobilização, conforme a Equação 7 e 8, respectivamente.

$$II = \frac{A_{EL} - (A_{SR} + A_{SL} + A_{EI})}{A_{EL}} \quad (7)$$

$$EI = \frac{A_{EI}}{A_{EL}} \quad (8)$$

sendo:

*II*: índice de inativação (%);

*EI*: eficiência de imobilização (%);

*A<sub>EL</sub>*: atividade residual da enzima livre (%);

*A<sub>EI</sub>*: atividade residual da enzima imobilizada (%);

*A<sub>SR</sub>*: atividade residual da solução residual (%);

*A<sub>SL</sub>*: atividade residual da solução de lavagem (%);

A unidade de atividade específica (U) foi definida como micro mol de glicose produzidos por minuto, por grama de suporte (μmol g<sub>suporte</sub>.min<sup>-1</sup>). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e representados pela média.

#### 4.2.5 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada

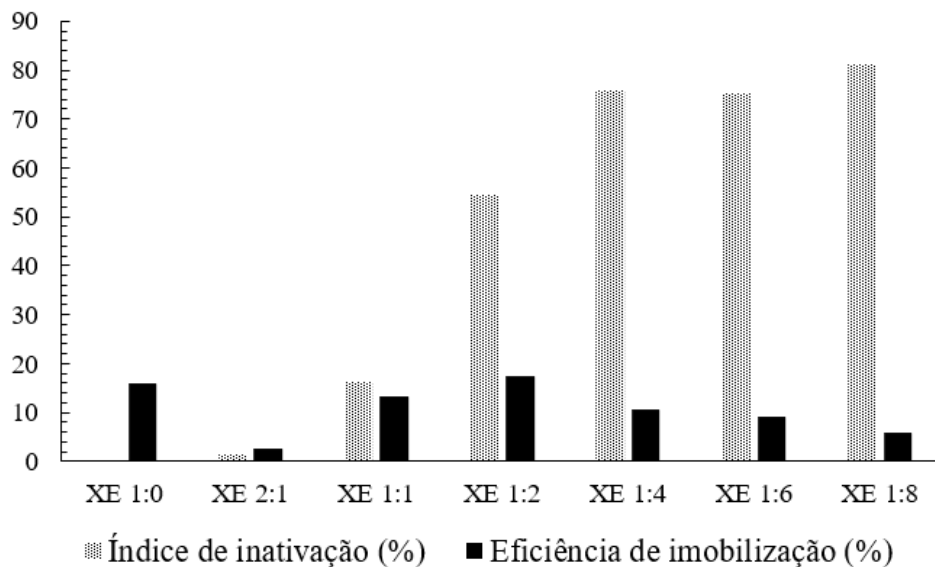
Os ensaios de reuso foram realizados em duas etapas. Primeiro a enzima foi imobilizada no suporte em estudo e a atividade enzimática foi determinada no tempo inicial. Na segunda etapa foram realizadas quatro hidrólises consecutivas e calculada a atividade residual em relação a inicial. No intervalo de cada hidrólise o biocatalisador imobilizado era lavado com 30 mL de solução tampão fosfato de potássio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,8). Todos os experimentos foram executados nas seguintes condições: temperatura de  $37 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,8 e concentração inicial de lactose de  $50 \text{ g L}^{-1}$ . A atividade residual foi determinada a partir da atividade máxima denominada 100%.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Influência do glutaraldeído na imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase

Na Figura 12 está apresentado o comportamento da enzima imobilizada em diferentes concentrações de glutaraldeído. Os parâmetros avaliados foram o índice de inativação e a eficiência de imobilização.

Figura 12: Índice de inativação e eficiência de imobilização da enzima imobilizada a  $25^\circ\text{C}$  durante 1 hora na concentração enzimática de  $5 \text{ mL L}^{-1}$  em pH 6,8



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que para o material XE 1:0 a inativação da enzima é nula. Por outro lado, os materiais com maior quantidade de glutaraldeído em sua formulação apresentam maior índice de inativação da enzima. Demonstrando assim, que o glutaraldeído tem influência de forma direta nesse processo. Entretanto, da mesma forma que a adição do glutaraldeído diminuiu a atividade catalítica da enzima, no XE 1:2 observa-se um aumento na imobilização da enzima pelo material em comparação com o XE 1:0. Essa situação demonstra que a presença do glutaraldeído em baixa concentração interferiu positivamente na adsorção da enzima pelo material. A eficácia dessa reticulação poderá ser investigada pelo reuso desse material, visto que é possível observar se ocorrerá dessorção durante a sua aplicação.

O glutaraldeído é utilizado para formação de ligações cruzadas adicionais e tem o intuito de aumentar a estabilidade da enzima e diminuir a dessorção durante o processo (LETCA et al., 2004). Assim, a reticulação química seria uma das melhores abordagens em questão de estabilidade da estrutura da enzima (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999). Porém, a reação de enzimas com agentes reticulantes pode promover reações indesejáveis e que poderá promover a distorção do centro ativo e a inativação da enzima, conseqüentemente (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999). Além disso, o excesso de glutaraldeído, pode resultar em capacidade de adsorção atenuada, devido a mudanças potenciais na química da superfície e na inacessibilidade dos sítios de adsorção (POON et al., 2014).

Assim, sabe-se que o glutaraldeído reage rapidamente com grupamentos amina terminais de peptídeos e aminoácidos via grupos  $\alpha$ -amino e grupo sulfidril de cisteína em pH neutro, formando piranos, hidratos e outros polímeros (SATAR et al., 2017). Dessa forma, tem-se a hipótese de que os grupamentos do glutaraldeído que não se ligam a quitosana são capazes de se ligar com o grupamento amina das enzimas (VITOLLO et al., 2015). Essa ligação resulta em uma distorção do centro ativo dificultando a ligação enzima-substrato na reação de hidrólise (VITOLLO et al., 2015). Isto significa que a enzima está presente no meio, mas está inativa, com todos seus grupamentos ligados e, conseqüentemente, indisponíveis para novas ligações.

Quando avaliada a eficiência de imobilização, de acordo com a Figura 18, percebe-se que os valores não apresentaram um comportamento diretamente proporcional. Para o material XE 2:1 a eficiência de imobilização obtida foi inferior aos demais materiais. Assim, surge a hipótese de que para esse suporte ocorreu perda do sítio de adsorção, sendo que a formação de ligações entre o glutaraldeído e os grupamentos amina ( $\text{NH}_2$ ) dos dois monômeros de quitosana tornou esse sítio ativo indisponível para o processo de imobilização.

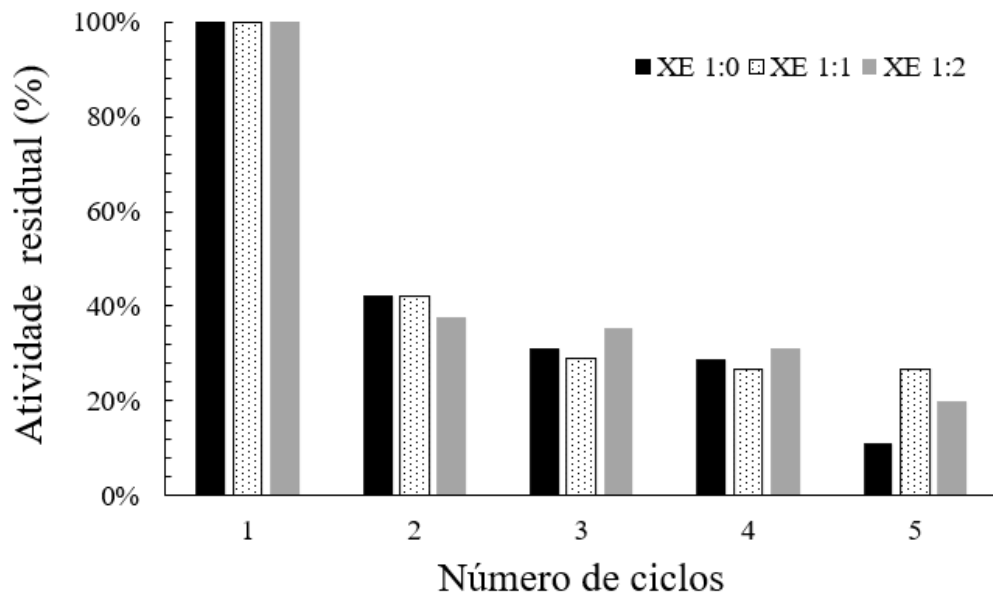
Os materiais XE 1:0, XE 1:1 e XE 1:2 apresentaram porcentagens de 15,83%, 13,40% e 17,38% de eficiência de imobilização, correspondente a atividades enzimáticas de 133 U, 107

U e 148 U, respectivamente. Devido a esses resultados, esses materiais foram selecionados para os ensaios de reuso.

### 4.3.2 Reuso da $\beta$ -galactosidase imobilizada

O reuso da enzima imobilizada é um parâmetro importante a ser avaliado, uma vez que permite a utilização do suporte consecutivas vezes durante o processo de hidrólise da lactose, o que melhora a relação custo-benefício geral do processo. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para os materiais que apresentaram maior eficiência de imobilização.

Figura 13: Reuso da enzima imobilizada nos suportes XE 1:0, XE 1:1 e XE 1:2 na hidrólise da lactose com concentração de  $50 \text{ g L}^{-1}$  e pH 6,8



Fonte: elaborado pelo Autor (2022)

Nos três materiais, a partir da segunda batelada já houve redução da glicose formada. Esse declínio pode ser atribuído à deformação do sítio ativo da enzima após reagir com o substrato na primeira batelada (GENNARI et al., 2019). No entanto, é possível observar que após a segunda batelada o material XE 1:1 manteve os valores de atividade enzimática residual até a quinta batelada, apresentando maior viabilidade de aplicação por até cinco vezes consecutivas.

Estudos similares foram realizados por Falleiros et al. (2017), que testaram a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase e modificação com glutaraldeído em um suporte comercial, obtendo um total de 10 ciclos de reuso. Wahba (2017) analisou a imobilização de  $\beta$ -

galactosidase em suportes de pectinato de cálcio e quitosana ativados com glutaraldeído, obtendo 13 ciclos, com valores de atividade permanecendo em 59%. Dessa forma, evidenciando o potencial dos materiais e processo desenvolvido no presente estudo.

#### **4.4 CONCLUSÃO**

Neste trabalho foi possível verificar a capacidade de um material de sílica e quitosana com adição de glutaraldeído na imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase através do fenômeno de adsorção. Além disso, foi possível verificar a inativação da enzima imobilizada devido a polimerização causada pelo aumento da quantidade de glutaraldeído na composição do material. O material XE 1:1 foi o que apresentou maior viabilidade de aplicação, apresentando uma atividade enzimática específica de 158 U, e após cinco hidrólises, 27% de atividade enzimática residual. Diante desse contexto, os resultados obtidos foram satisfatórios para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase e hidrólise da lactose, permitindo o entendimento de como o agente reticulante glutaraldeído influencia nesse processo.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A presente dissertação apresenta um estudo sobre o desenvolvimento de materiais suportes a base de quitosana para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase. O estudo foi desenvolvido com base em uma revisão bibliográfica sobre o tema, e dois artigos experimentais sobre a influência de diferentes técnicas de desenvolvimento de suportes sobre a eficiência de imobilização da enzima.

A análise sistemática da bibliografia atual sobre o tema mostrou a importância das técnicas de imobilização por adsorção e *cross-linking* no campo da  $\beta$ -galactosidase. Também, observou-se que suportes de origem naturais, como o biopolímero quitosana, são uma das tendências de pesquisas na área.

Em relação aos métodos de imobilização, foram propostas duas metodologias: a primeira baseada na produção de esferas de quitosana por coagulação e, a segunda, baseada na produção de compósitos (xerogéis) de quitosana/sílica pela técnica sol-gel. Nas condições ótimas de imobilização, a atividade enzimática obtida para as esferas de quitosana e para o xerogel 1:1 foram de 507 U e 158 U, respectivamente, mostrando que as esferas de quitosana possuem maior facilidade de imobilizar a enzima.

Para a imobilização da enzima em esferas de quitosana foi avaliado o efeito do pH e concentração de solução enzimática sobre a eficiência de imobilização. Nesses ensaios foi possível observar a forte dependência da eficiência de imobilização com o pH da solução enzimática, além de ser possível identificar que com o aumento da concentração há uma tendência de saturação do suporte.

Já os xerogéis (XE) foram desenvolvidos com diferentes proporções de quitosana e glutaraldeído (computados como unidades monoméricas de D-glucosamina por molécula de glutaraldeído) e o efeito desta reticulação no suporte sobre a imobilização e inativação da enzima. O material XE 1:1 foi o que apresentou maior viabilidade de aplicação, sendo que o incremento da reticulação com glutaraldeído levou a uma maior inativação enzimática.

O reuso da enzima imobilizada foi avaliado para ambos os materiais, sendo que com o material de quitosana, após seis ciclos foi possível manter 57% da atividade enzimática inicial e com o XE 1:1 após cinco ciclos foi mantido 27% da atividade enzimática inicial.

Diante desse contexto, o suporte de esferas de quitosana foi mais eficiente para a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase e possibilitou uma maior quantidade de ciclos no reuso. Para isso, foram avaliados os efeitos da temperatura na reação de hidrólise e na desativação

térmica da enzima imobilizada. A variação da temperatura na reação reduziu atividade enzimática da enzima livre e imobilizada com o aumento e com a redução da temperatura em relação à condição ótima de 37°C. No entanto, com a enzima imobilizada foi possível observar uma maior faixa de temperatura de atuação em comparação com a enzima livre. A cinética de desativação térmica da enzima demonstrou a forte dependência da estabilidade térmica do biocatalisador em diferentes temperaturas. O aumento da temperatura sobre a enzima imobilizada provocou o acréscimo da constante cinética de desativação térmica e redução no tempo de meia-vida, de até 0,52 horas a temperatura de 45°C.

A partir do estudo dinâmico em coluna de leito fixo foi possível realizar um processo semelhante ao industrial, sendo possível imobilizar a enzima  $\beta$ -galactosidase direto na coluna. O comportamento dinâmico apresentou resultados satisfatórios e a possibilidade de converter toda lactose (50 g L<sup>-1</sup>) presente no meio reacional. Como sugestões para trabalhos futuros, avaliar a possibilidade de restaurar a atividade enzimática a partir reativação do suporte com uma nova solução enzimática ou, até mesmo, com a solução residual proveniente da imobilização.

Neste sentido, observa-se que suportes de quitosana são promissores para a imobilização de enzimas, em especial a  $\beta$ -galactosidase que foi objeto deste estudo, sendo um fator que pode contribuir com o desenvolvimento de tecnologias ainda mais inovadoras e rentáveis para as indústrias alimentícias. O artigo de revisão desenvolvido possibilitou realizar um estado da arte da imobilização da  $\beta$ -galactosidase, demonstrando as perspectivas e os desafios da imobilização e a forma que isso está atrelado as técnicas e aos suportes empregados. Os suportes avaliados em ambos os artigos experimentais ressaltam a importância desses fatores intrínsecos no processo de imobilização.

Aliando o estado da arte desenvolvido com os resultados obtidos neste trabalho conclui-se que a imobilização da  $\beta$ -galactosidase é um processo promissor para o aumento da estabilidade térmica e operacional da enzima, bem como para a aplicação na hidrólise da lactose de produtos lácteos. Em estudos futuros será importante avaliar a viabilidade econômica desse processo, pois os custos adicionais envolvidos na imobilização devem ser compensados em relação a utilização da enzima livre para a hidrólise da lactose em produtos lácteos.

## REFERÊNCIAS

- AHAMAD, T.; RUKSANA; CHAUDHARY, A. A.; NAUSHAD, M.; ALSHEHRI, S. M. Fabrication of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles embedded chitosan-diphenylureaformaldehyde resin for the removal of tetracycline from aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 180-188, 2019.
- ALONSO, N. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, p. 57-61, 2005.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 351-359, 2012.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R.; CHIBBER S.; KHAN, M. J., 2013. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 258-263, 2013.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R.; ZAIDI, S. K.; NASEER, M. I.; KARIM, S.; ALQAHTANI, M. H.; RASOOL, M. Nanodiamonds as an effective and novel matrix for immobilizing  $\beta$  galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 298-303, 2015.
- ARGENTA, A. B.; NOGUEIRA, A.; SCHEER, A. P. Hydrolysis of whey lactose: *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilisation and integrated process hydrolysis ultrafiltration. **International Dairy Journal**, v. 117, p. 105007, 2021.
- ARSALAN, A.; ALAM, M. F.; ZOFAIR, S. F. F.; AHMAD, S.; YOUNUS, H. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, p. 117637, 2020.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p. 56– 66, 2014.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BAKSHI, P. S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELU, K.; KUMAR, N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072–1083, 2020.



BARBOSA O.; ORTIZ C.; BERENGUER-MURCIA Á.; TORRES R.; RODRIGUES R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advance**, v. 4, p. 1583–1600, 2014.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURICA, A.; RODRIGUES, R. C. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2433–2462, 2013.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v, 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

BAUMANN, T. F.; GASH, A. E.; SATCHER, J. H. J. A Robust Approach to Inorganic Aerogels: The Use of Epoxides in Sol–Gel Synthesis. In: AEGERTER, M. A.; LEVENTIS, N.; KOEBEL, M. M. (Editores). **Aerogels Handbook**. New York: Springer, 2011. p. 155- 170.

BAYRAMOGLU, G., GURSEL, I., YILMAZ, M., ARICA, M.Y.: Immobilization of laccase on itaconic acid grafted and Cu (II) ion chelated chitosan membrane for bioremediation of hazardous materials. **Journal Chemical Technology Biotechnology**. v. 87, p. 530–539, 2012.

BCC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. BIO030K, BCC Publishing, September, 2018.

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Use of silicon dioxide nanoparticles for  $\beta$ -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. **LWT**, v. 87, p. 553-561, 2018.

BEYLER-ÇIGIL A.; OZKAN D.; ONUR S.; MEMET V. K.; AYSE O.; SERAP D.. Optimizing the Immobilization Conditions of  $\beta$ -galactosidase on UV-cured Epoxy-based Polymeric Film Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, 2021.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462–482, 2019.

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

BRAGA, A. N. S., DUARTE-NETO, J. F., MENEZES, R. R., LIRA, H. L., NEVES, G. A. Síntese de mulita pelo processo sol-gel: Uma revisão da literatura. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 9, n. 2, p. 60-73, 2014.

BUDNYAK, T. M.; PYLYPCHUK, I. V.; TERTYKH, V. A.; YANOVSKA, E. S.; KOLODYNSKA, D. Synthesis and adsorption properties of chitosan-silica nanocomposite prepared by sol-gel method. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, p. 1-10, 2015.

CASTRO, H. F. **Método de encapsulação de lipasa em matriz hidrofóbica preparada por meio da técnica sol-gel e que emprega tetraetilortossilicato como precursor**. Depositante:

Heizir Ferreira de Castro. BR n. PI 0306829-3 A. Depósito: 11 set. 2003. Concessão: 21 fev. 2006.

CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZOA, P.; GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42 p. 6262-6276, 2013.

CHEBA, B. A. Chitosan: Properties, Modifications and Food Nanobiotechnology. *Procedia Manufacturing*, v. 46, p. 652–658, 2020.

CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes - Research and Development**. New York: John Wiley & Sons, 1978.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAMIN, B. I. S.; KOVALSKI, F. C.; FISCHER, J.; PICCIN, J. S.; DETTMER, A. Challenges and perspectives of the  $\beta$ -galactosidase enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 13, p. 5281-5298, 2021.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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.

DE ALBUQUERQUE, T. L. GOMES S. D. L.; D'ALMEIDA, A. P.; LAFUENTE R. F.; GONÇALVES L. R.; B. Maria Valderez Ponte Rocha Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 65-73, 2018.

DHAWADE, P.; JAGTAP, R. Comparative Study of Physical and Thermal Properties of Chitosan-Silica Hybrid Coatings Prepared by Sol-Gel Method. **Pelagia Research Library - Der Chemica Sinica**, v. 3, p. 589-601, 2012.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 29-35, 2009.

ELNAHRAWY, A. M.; KIM, Y. S.; ALI, A. I. Synthesis of hybrid chitosan/calcium aluminosilicate using a sol-gel method for optical applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 676, p. 432-439, 2016.

ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Covalent Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on Carrageenan Coated with Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 14-24, 2009.

ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Lactose Hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase Covalently Immobilized to Thermally Stable Biopolymers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 426-437, 2009.

FALLEIROS, L. N. S. S. et al. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 23, n. 4, p. 495-506, 2017.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 7, n. 1-4, p. 181-189, 1999.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.

FLORES, E. E. E.; CARDOSO, F. D.; SIQUEIRA, L. B.; RICARDI, N. C.; COSTA, T. H., RODRIGUES, R. C.; KLEIN B M. P.; HERTZA, P. F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 73-80, 2019.

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*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

FREITAS, M. F. M.; HORTÊNCIO, L. C.; ALBUQUERQUE, T. L.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 711-722, 2020.

FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; SANTANA, L. N. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 178-186, 2013.

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; CATTO, A. L.; BENVENUTTI, E. V.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilized on collagen: catalytic stability on batch and packed-bed reactor hydrolysis. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 127, p. 583-599, 2019.

GONÇALVES, M. C. P.; KIECKBUSCH, T. G.; PERNA, R. F.; FUJIMOTO, J. T.; MORALES, S. A. V.; ROMANELLI, J. P. Research on the enzyme immobilization based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2018.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação da quitosana. **Química Nova**, v. 34, 2011.

GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 1–20, 2017.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined

ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2-3, p. 137-143, 2010.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J.  $\beta$ -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3-4, p. 139-145, 2011.

GÜRDAS, S.; GÜLEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 904-911, 2012.

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

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

HERNANDEZ, C. E. L. R.; LUTZ, S., LIESE, A., BON, E.P.S. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 582-588, 2005.

HOARAU, M.; BADIEYAN, S.; MARSH, E. N. G. Immobilized enzymes: understanding enzyme-surface interactions at the molecular level. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 15, p. 9529-9736, 2017.

HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2291-2299, 2012.

HUSAIN, Q.; ANSARI, S. A.; ALAM, F.; AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 37-43, 2011.

ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G.R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.

INSTITUO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985, 300 - 309 p.

ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 543-554, 2009.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801-821, 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new Kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 397-405, 2004.

KATROLIA, P.; LIU, X.; LI, G.; KOPPARAPU, N. K. Propriedades aprimoradas e eficiências de hidrólise de lactose de  $\beta$ -galactosidasas de grau alimentício imobilizadas em vários suportes: uma abordagem comparativa. **Bioquímica Aplicada e Biotecnologia**, v. 188, p. 410-423, 2019.

KAWAGUTI, H. Y.; BUZATTO, M. F. ORSI, D. C.; SUZUKI, G. T.; SATO, H. H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2035–2040, 2006.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2456-2464, 2012.

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M. H.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and  $\beta$ -d-galactosidase Immobilization. **Carbohydrate Polymers**. v. 137, p. 184-90, 2016.

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis With an Immobilized Beta-Galactosidase From *Kluyveromyces Fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LETCA, D.; HEMMERLING. C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinat Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. **Roumanian Society of Biological Sciences**. v. 9, p. 1879-1886, 2004.

LIMA, P. C.; GAZONI, I.; DE CARVALHO A. M. G.; BRESOLIN D.; CAVALHEIRO, D.; OLIVEIRA, D.; RIGO, E.  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in genipin-activated chitosan: An investigation on immobilization, stability, and application in diluted UHT milk. **Food Chemistry**, v. 349, p. 129050, 2021.

MACHADO, T.S.; J.R. MELLO, J.S. PICCIN. Method of production of adsorbent composites based on silica and chitosan with glutaraldehyde and application of the same. Depositor: Passo Fundo University Foundation, BR nº. 10 2021 003136 0. Deposit 19 February 2021 (in Portuguese), 2021.

MACHADO, T.S.; CRESTANI, L.; MARCHEZI, G.; MELARA, F.; MELLO, J.R.; DOTTO, G.L.; PICCIN, J.S. Synthesis of glutaraldehyde-modified silica/chitosan composites for the removal of water-soluble diclofenac sodium. **Carbohydrate Polymers**, p. 118868, 2022.

MAKOWSKI, K.; BIAŁKOWSKA, A.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; KALINOWSKA, H.; KUR, J.; CIEŚLIŃSKI, H.; TURKIEWICZ, M. Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 59, n. 2, p. 535-542, 2007.

MALHOTRA, I., BASIR, SF. Application of Invertase Immobilized on Chitosan Using Glutaraldehyde or Tris (Hydroxymethyl) Phosphine As Cross-Linking Agent to Produce Bioethanol. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 191, 838–851, 2020.

MARKETSANDMARKETS. Industrial Enzymes Market. FB 2277, April, 2020.

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

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, ANDREA.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LOPEZ GALLEGO, L.; PESSELA, B.C.C.; HIDALGO, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2006.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a Biologia Molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

MATHIÚS, L. A.; MONTANHOLI, C. H. S.; OLIVEIRA, L. C. N.; BERNARDES, D. N. D.; PIRES, A.; HERNANDEZ, F. M. O. Aspectos atuais da intolerância à lactose. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 1, p. 46-52, 2016.

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

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

MORÉ J.; WATSON G.A. (Ed.). The Levenberg–Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. **Lecture Notes in Mathematics**, v. 630, p. 105–116, 1977.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 921-926, 2016.

MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470-477, 2015.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Physicochemical Characteristics of Commercial Lactases Relevant to Their Application in the Alleviation of Lactose Intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 179-191, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal**. Tradução de Fátima Murad. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 279 p., 2005.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. Embrapa, 2021

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L.; RESENDE, L. M. Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication. **Scientometrics**, v. 105, p. 2109-2135, 2015.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production of  $\beta$ -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530-543, 2006.

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

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

PERDIGOTO, M. L. N.; MARTINS, R. C.; ROCHA, N.; QUINA, M. J.; GANDOFERREIRA, L.; PATRÍCIO, R.; DURÃES, L. Application of hydrophobic silica based aerogels and xerogels for removal of toxic organic compounds from aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 380, p. 134-140, 2012.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 92-101, 2014.

RAMOS, J. V. H.; MORAWSKI, F. M.; COSTA, T. M. H.; DIAS, S. L. P.; BENVENUTTI, E. V.; MENEZES, E. W.; ARENAS, L. T. Mesoporous chitosan/silica hybrid material applied for development of electrochemical sensor for paracetamol in presence of dopamine. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 217, p. 109-118, 2015.

REGENHARDT, S. A.; MAMMARELLA, E. J.; RUBIOLO, A. C. Hydrolysis of lactose from cheese whey using a reactor with  $\beta$ -galactosidase enzyme immobilised on a commercial ultrafiltration membrane. **Chemical and Process Engineering**, v. 34, n. 3, p. 375-385, 2013.

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

RHIMI, M.; BOISSON, A.; DEJOB, M.; BOUDEBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a  $\beta$ -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 515-525, 2010.

RICARDI, N. C.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; SCHÖFFER, J. N.; HACKENHAAR, C. R.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. Highly stable novel silica/chitosan support for  $\beta$ -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v. 246, p. 343-350, 2018.

RODRIGUES, S.D.; MENDES, A.A.; ADRIANO, S.W.; GONÇALVES, B.R.L.; GIORDANO, C.L.R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.

ROUWENHORST, R. J.; PRONK, J. T.; VAN DIJKEN, J. P. The discovery of  $\beta$ -galactosidase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 10, p. 416-418, 1989.

SANTOS, C. D. S. **Mineralização biomimética de hidrogéis quitosana/gelatina**. Dissertação (Mestrado em ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SATAR, R.; ANSARI, S. A. Functionalized agarose as an effective and novel matrix for immobilizing *Cicer arietinum*  $\beta$ -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. **Journal Chemical Engineering**, v. 34, p. 1678-4383, 2017.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S. A.; TASSADUQ, R. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, p. 79, 2017.

SERIO, M. DI; MATURO, C.; ALTERIIS, E. DE; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, v. 79-80, p. 333-339, 2003.

SHAFI, A.; AHMED, F.; HUSAIN, Q.  $\beta$ -Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: Its stability and application in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

SHAN, W.; ZHANG, D.; WANG, X.; WANG, D.; XING, Z.; XIONG, Y.; FAN, Y.; YANG, Y. One-pot synthesis of mesoporous chitosan-silica composite from sodium silicate for application in Rhenium(VII) adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 278, p. 44-53, 2019.



SHEN, Q.; YANG, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for  $\beta$ -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565-1571, 2011.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A., VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how?. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6225, 2013.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal Molecular Catalysis**, v. 39, p. 69, 2006.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização Enzimática: Princípios Fundamentais e Tipos de Suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, 2017.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; SOUZA, C. F. S.; VRIESMANN, L. C.; VICENTE, J.; DE CARVALHO, M. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; Favaro-Trindade, C. S. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by Complexation: Effect of Interaction on the Properties of the Enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 594-602, 2019.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 6, p. 631-637, 2000.

URRUTIA, P.; CLAUDIA B.; LORENA W.; AND ANDRÉS I. Use of Chitosan Heterofunctionality for Enzyme Immobilization:  $\beta$ -galactosidase Immobilization for Galactooligosaccharide Synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 116, p. 182-93, 2018.

VASILEVA, N.; IVANOV, Y.; DAMYANOVA, S.; KOSTOVA, I.; GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339-346, 2016.

VIEIRA, D. C.; LIMA, L. N.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54-64, 2013.

VITOLO, M.; PESSOA, A.; SOUZA, G. M.; CARVALHO, J.C.M.; STEPHANO, M.A.; SATO, S. Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos Sobre Aplicação Industrial. **Blucher**, ed. 1, São Paulo, 2015.

WAHBA, MI. Chitosan-Glutaraldehyde Activated Calcium Pectinate Beads As a Covalent Immobilization Support. **Biocatal Agric Biotechnol** v. 12, p.266-274, 2017.

WAHBA, M. I.; SOLIMAN, T.N. Whey protein isolate for the preparation of covalent immobilization beads. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 14, p. 328-337, 2018.

WANG, D.; NAKAMURA, J.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; KASUGA, T.; JONES, J. R.; MCPHAIL, D. S. ToF-SIMS evaluation of calcium-containing silica/ $\gamma$ -PGA hybridsystems for bone regeneration. **Applied Surface Science**, v. 309, p. 231-239, 2014.

WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749-753, 2007.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using  $\beta$ -D-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low lactose milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 157-164, 2018.

WONG S. S.; WONG, C. L-J. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 866-874, 1992.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V.; SHARMA, R. K.  $\beta$ -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. p. 1 -15, 2018

YU, H. W.; CHEN, H.; WANG, X.; YANG, Y. Y.; CHING, C. B. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. **Journal Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 43, p. 124-127, 2006.

ZHOU, Q. Z.; CHEN, X. D.; LI, X. Kinetics of Lactose Hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* Immobilized on Cotton Fabric. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 127-133, 2002.

ZHU, T., & ROW, K. H. Preparation and applications of hybrid organic-inorganic monoliths: A review. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 1294–1302, 2012.

ZOU, H.; WU, S.; SHEN, J. Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 3893-3957, 2008.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, p. 14139–14194, 2014.

## APÊNDICE A – TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO

Artigo de revisão de literatura do projeto de dissertação intitulado como “*Challenges and perspectives of  $\beta$ -galactosidase enzyme: immobilization methods and supports*” que aborda as técnicas de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase, os suportes já utilizados e os potenciais suportes. Conforme a Figura abaixo, o artigo foi publicado na revista *Applied Microbiology and Biotechnology* e o doi do artigo é 10.1007/s00253-021-11423-7.

Applied Microbiology and Biotechnology  
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11423-7>

MINI-REVIEW



### Challenges and perspectives of the $\beta$ -galactosidase enzyme

B. I. S. Damin<sup>1</sup> · F. C. Kovalski<sup>2</sup> · J. Fischer<sup>3</sup> · J. S. Piccin<sup>1</sup> · A. Dettmer<sup>1</sup>

Received: 27 March 2021 / Revised: 20 June 2021 / Accepted: 22 June 2021  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

#### Abstract

The enzyme  $\beta$ -galactosidase has great potential for application in the food and pharmaceutical industries due to its ability to perform the hydrolysis of lactose, a disaccharide present in milk and in dairy by-products. It can be used in free form, in batch processes, or in immobilized form, which allows continuous operation and provides greater enzymatic stability. The choice of method and support for enzyme immobilization is essential, as the performance of the biocatalyst is strongly influenced by the properties of the material used and by the interaction mechanisms between support and enzyme. Therefore, this review showed the main enzyme immobilization techniques, and the most used supports for the constitution of biocatalysts. Also, materials with the potential for immobilization of  $\beta$ -galactosidases and the importance of their biotechnological application are presented.

#### Key points

- The main methods of immobilization are physical adsorption, covalent bonding, and crosslinking.
- The structural conditions of the supports are determining factors in the performance of the biocatalysts.
- Enzymatic hydrolysis plays an important role in the biotechnology industry.

**Keywords** Supports · Biocatalysis · Immobilization · Enzymatic hydrolysis

Artigo de revisão desenvolvido durante a disciplina de bioprocessos em alimentos intitulado como “The kombucha phenomenon: production aspects, health benefits, and food safety issues” foi publicado na revista *Brazilian Journal of Development* e o doi do artigo é 10.34117/bjdv7n7-638, apresentado na Figura abaixo:



**The Kombucha phenomenon: production aspects, health benefits, and food safety issues**

**O fenômeno da Kombucha: aspectos de produção, benefícios à saúde e aspectos de segurança alimentar**

DOI:10.34117/bjdv7n7-638

Recebimento dos originais: 07/06/2021  
Aceitação para publicação: 31/07/2021

**Brenda Isadora Soares Damin**

Chemical Engineer, University of Passo Fundo, Graduate Program in Food Science and Technology, Campus I, BR 285, Km 12, Building L1, Passo Fundo - RS, Brazil  
E-mail: brebrenda.damin@gmail.com

**Verônica Gamba**

Chemical Engineer, University of Passo Fundo, Graduate Program in Food Science and Technology, Campus I, BR 285, Km 12, Building L1, Passo Fundo - RS, Brazil  
E-mail: vee\_gamba@hotmail.com

**Aline Dettmer**

PhD in Chemical Engineering, University of Passo Fundo, Graduate Program in Food Science and Technology, Campus I, BR 285, Km 12, Building L1, Passo Fundo - RS, Brazil  
E-mail: alinedettmer@upf.br

**Luciane Maria Colla**

PhD in Food Science and Engineering, University of Passo Fundo, Graduate Program in Food Science and Technology, Campus I, BR 285, Km 12, Building L1, Passo Fundo - RS, Brazil  
E-mail: lmcolla@upf.br

**ABSTRACT**

The artisanal production of kombucha has caused the spread of manufacturing and worldwide consumption in the last ten years. The characteristics similar to carbonated beverages and their bioactive and functional properties have attracted the staggering of industrial production, however, the process control and food safety make the beverage production challenges. The objective is to carry out a bibliographic review of the functional aspects of beverage consumption, as well as the fermentation control parameters mentioned by some authors. The search for articles was carried out in the Scopus database using the Bibliometrix tool to select the terms used, to contextualize the subject about the evolution of consumption and artisanal production, benefits, and food security. It was found that fermentation conditions, the type of tea used, and the concentration of sucrose are determining factors in some bioactive properties and sensory characteristics of kombucha. The benefits of consumption are greater with its harm, the harm being rare and related to symptoms similar to food poisoning. This factor is decisive for further studies related to the drink's food security. Even with benefits, there is a need

Capítulo de livro sobre compósitos avançados para a produção de fármacos apresentado na Figura abaixo:



**Advances in Material Research and Technology**  
Series Ed.: Ikhmayies, Shadia Jamil  
ISSN: 2662-4761

**ACCEPTANCE LETTER**

27 September, 2021

Dear Prof. Drs. Thais Strieder Machado, Brenda Isadora Soares Damin, Giovana Marchezi, Larissa Crestani, Jeferson Steffanello Piccin

I am glad to inform you that your chapter entitled "**Advanced composites for drug adsorption**" is accepted for publication in the e-book series on materials entitled "**Advances in Material Research and Technology**"

in the Volume: **Advanced Composites**,  
edited by: Shadia Jamil Ikhmayies,  
which will be published by Springer Publisher

## **ANEXO A – PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE CASCA DE CAMARÃO**

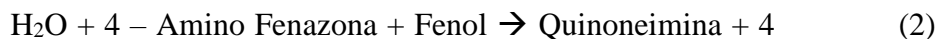
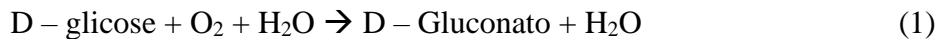
As cascas de camarão foram lavadas com água corrente e inseridas em uma solução de ácido clorídrico 2,5% (v/v), em uma relação de 2,5 L de solução/Kg de casca, sob agitação por 2 horas. Após esse período, as cascas foram lavadas com água até a neutralidade e inseridas em uma solução de hidróxido de sódio 5,0% (m/v), em uma relação de três litros de solução para cada quilograma de casca, sob agitação por 2 horas. As cascas foram lavadas novamente e inseridas em uma solução de hipoclorito de sódio 0,36% (v/v), em uma relação de cinco litros de solução para cada quilograma de casca, sob agitação por 3 horas. Por fim, as cascas foram lavadas com água corrente para a retirada de excessos, e secas a uma temperatura de 80°C em estufa por 4 horas e moídas em granulometria entre 1 a 5 mm.

Para o processo de desacetilação da quitina foram inseridas a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 45% (m/v) e quitina (numa proporção de 20 mL de solução de NaOH para cada 1,0 g de quitina) moída em um reator termoquímico com refluxo aberto, sob agitação de 60 rpm. A mistura foi aquecida na temperatura de ebulição da solução de NaOH (aproximadamente 130°C) e mantida por 4 horas. Estas condições são baseadas no trabalho de Moura et al. (2015) e resultados preliminares do grupo de pesquisa. O material resultante deste processo foi a quitosana desacetilada não purificada. Após o resfriamento da solução, a quitosana da quitina moída foi lavada com água até próximo da neutralidade de pH 7,0 e medida novamente a massa de sólidos.

A purificação da quitosana foi realizada através da solubilização em solução de ácido acético 1,0% (v/v), em uma proporção de 1% (m/v), sob agitação por 6 a 12 horas em temperatura ambiente. Após, foi realizada a centrifugação a 3500 min<sup>-1</sup> por 30 minutos e descartado o material sólido. Com a solução restante, a quitosana foi precipitada pelo ajuste do pH para 12 com solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> e, em seguida, neutralizada com solução de ácido clorídrico (HCl) 2,0 mol L<sup>-1</sup> para pH 7. A quitosana úmida foi coletada por centrifugação a 3500 min<sup>-1</sup> por 20 minutos. Por fim, a quitosana úmida foi seca por liofilização e armazenada em condições ambientes a 25°C e 70% de umidade.

## ANEXO B – MÉTODO GLICOSE-OXIDASE

A glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose em ácido glúconico (D-Gluconato), com formação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este reage com fenol e 4-aminofenazona, na presença da peroxidase, formando quinoneimina, composto vermelho violeta que apresenta máxima absorção de luz em um comprimento de onda de 505 nm. As reações estão representadas nas Equações 1 e 2.



H<sub>2</sub>O

É um método sensível e específico para a dosagem de glicose sendo que a coloração é proporcional a quantidade de glicose presente na solução.

Procedimento descrito por Mandels; Hontz e Nystrom (1974):

Para determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi à determinação da curva padrão, de absorbância em função das concentrações de glicose. Para isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 1 mL da solução de glicose-oxidase (kit) preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 10 litros de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,5 g L<sup>-1</sup>, com intervalos de 0,5 g L<sup>-1</sup>, incubando em banho maria por 10 minutos a 37 +/- 2°C. Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco a solução de glicose-oxidase. Com os valores de absorbância em função das concentrações de glicose foram construídas equações lineares e determinadas as equações das mesmas, considerando o intervalo de concentração adotado.

Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o mesmo procedimento anterior, determinando-se a sua absorbância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.