UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA ATIVADA COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO EM LÁCTEOS

PÂMELA CRISTINA LIMA

PINHALZINHO, 2020

Digitalizado com CamScanner

PÂMELA CRISTINA LIMA

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA ATIVADA COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO EM LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Elisandra Rigo
Coorientadora: Débora de Oliveira

PINHALZINHO, SC

2020

Digitalizado com CamScanner

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da

Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Pâmela Cristina
Imobilização da enzima b-Galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina para aplicação em lácteos. / Pâmela Cristina Lima. -- 2020.
95 p.

Orientadora: Elisandra Rigo
Coorientadora: Débora de Oliveira
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2020.

1. b-galactosidase. 2. Biocatalisador. 3. Polimerização. 4. Reticulação. 5. Hidrólise. I. Rigo, Elisandra. II. de Oliveira, Débora. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Titulo.

Digitalizado com CamScanner

PÂMELA CRISTINA LIMA

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA ATIVADA COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO EM LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Elisandra Rigo – Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dra. Aniela Pinto Kempka
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dra. Rosana Goldbeck
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dra. Darlene Cavalheiro
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Pinhalzinho, 19 de fevereiro de 2020

Digitalizado com CamScanner

PÂMELA CRISTINA LIMA

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA ATIVADA COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO EM LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Elisandra Rigo – Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dra. Aniela Pinto Kempka
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dra. Rosana Goldbeck
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dra. Darlene Cavalheiro
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Pinhalzinho, 19 de fevereiro de 2020

Digitalizado com CamScanner

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus avós Elza e Pedro, que sempre foram meu porto seguro e não mediram esforços para me auxiliar no seguimento dos meus estudos. Vocês são meus maiores exemplos.

À minha tia Marcia, que sempre esteve por perto nos piores momentos e nunca deixou de me dar a mão e mostrar que quem acredita sempre alcança, obrigada por ser tão presente na minha vida.

Aos meus irmãos Patrícia, Poliana, Bernardo e Gabriel, que são o vínculo do amor de nossos pais, afinal "Seja legal com seus irmãos. Eles são a melhor ponte com o seu passado e possivelmente quem vai sempre mesmo te apoiar no futuro".

Aos meus pequenos Henrique, Valentina, Thomas e Alexandre, por deixarem a vida mais leve com a pureza de ser criança. Vocês são a alegria dos meus dias e eu agradeço infinitamente em poder ter vocês por perto.

À minha boadrasta Elisabete e ao meu pai Jorge, que sempre apoiaram as minhas decisões e não mediram esforços para me ajudar a conquistar meus objetivos. Obrigada por tanto!

Ao meu namorado Natan Moras, por ser minha calmaria em um mar turbulento. Teu apoio, teu carinho, tuas jantas prontas após um dia cheio de análises foram meu refúgio em todos os momentos. Obrigada por me aturar, me incentivar, e me amar incondicionalmente.

À minha orientadora, professora, amiga e inspiração Elisandra Rigo. Não existem palavras que definam a minha admiração pela grande mulher que você é. Quero sempre levar comigo a tua garra, tua energia e teu amor de mãe. Você tem um coração enorme! Obrigada por todos os momentos, eu não teria conseguido sem você!

Às professoras Darlene Cavalheiro e Débora de Oliveira, pela sabedoria, apoio e orientação.

Agradecimento em especial às minhas ICs Isadora e Alexandra, por sempre estarem dispostas (inclusive durante madrugadas) a me auxiliar, também a DSc Daniela Bresolin pelas explicações e o empenho na realização das análises. Vocês são peças chave desse estudo. Obrigada infinitamente!

Aos meus amigos, presentes da minha vida: Natacha, Kamila, Aline, Adriano, Vitória, Crislaine, Ana, Vanessa, Laressa e Cindiamara. Obrigada pelo apoio, palavras de conforto e por estarem presentes mesmo longe. ALOHA!

Digitalizado com CamScanner

Ao meu clubinho: Fabiomar, Douglas e Maiara, meus dias se tornaram mais leves e descontraídos com vocês. Obrigada por me aturarem, auxiliarem nas análises e por estarem sempre por perto. Gratidão define!

Aos amigos que o mestrado me deu: Ivan, Cristine, Andressa, Gabriela pelas alegrias e por serem os presentes da vida acadêmica.

Agradeço também à UDESC, FAPESC e PROZYN por todo apoio e meios concedidos para realização da pesquisa.

Minha eterna gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram no processo de construção e aprendizagem durante o mestrado.

E por final, dedico a presente pesquisa à minha mãezinha Simone Rosin Lima (*in memoria*) que por fatalidade do destino não pode ver sua filha concluir o tão sonhado mestrado. Mãe essa conquista é para você, obrigada por sempre acreditar no meu potencial, espero ter te feito orgulhosa.

Digitalizado com CamScanner

EPÍGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

Digitalizado com CamScanner

RESUMO

A imobilização de enzimas tem sido utilizada no intuito de melhorar a economia dos bioprocessos, visando estabilidade, reutilização, recuperação, seletividade e alta qualidade do produto resultante. Apesar das vantagens da imobilização de enzimas, as disponíveis comercialmente apresentam valor elevado, assim, são necessários estudos que desenvolvam novos suportes e métodos de imobilização economicamente viáveis, seguros e, principalmente, eficientes. Em vista disso, o presente trabalho buscou avaliar a imobilização da enzima β-galactosidase proveniente de *Kluyveromyces lactis* em suporte à base de quitosana ativada com genipina para aplicação em lácteos. Foram avaliadas a forma de suporte de quitosana, tempo e temperatura de ativação, concentração do ativador genipina, secagem das esferas e posteriormente, a própria imobilização, através da carga enzimática oferecida ao suporte. Com base no planejamento experimental foram analisadas a influência da quantidade de esferas e concentração de substrato, no rendimento de imobilização e atividade enzimática. Os imobilizados e a enzima livre foram avaliados quanto pH e temperatura ótima de reação e estabilidade térmica. Do biocatalisador foram definidas as constantes cinéticas Km e Vmáx, sua estabilidade operacional e de armazenamento, assim como, caracterizados conforme as análises de TGA, DSC, MEV, TPA e cor. Os resultados obtidos no estudo de parâmetros de preparo de suporte definiram pela atividade enzimática (At) e rendimento da imobilização (RI) a forma do suporte em esferas de 2 mm, o tempo de 1 hora à 60 °C para a ativação do suporte com a genipina em uma concentração de 0,5 mg/mL, para polimerizar com a quitosana para imobilizar a carga de 56 U/mL de β-gal. O planejamento experimental demonstrou que houve influência das variáveis quantidade de esferas e concentração de substratos tanto no rendimento de imobilização quanto na avaliação da atividade enzimática, obtendo como condição otimizada 4,57 mg/mL de esferas e concentração de o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) de 10 mM, com um RI de 84,13% e At 24,97 U/g. A temperatura ótima de reação foi de 37 °C e o pH de atuação da enzima imobilizada de 7,0, em comparação a 42 °C e 6,8 da enzima livre. A enzima imobilizada apresentou aumento da estabilidade térmica em 10 e 37 °C, em comparação à enzima livre. A imobilização possibilitou a aplicação da enzima β-gal em quatro ciclos sucessivos de hidrólise de lactose contida em leite UHT, e em meio sintético (lactose e ONPG) apenas 1 reciclo foi possível, e a forma congelada por vinte e um dias consecutivos foi a indicada para conservação dos imobilizados. A enzima imobilizada apresentou um Km alto, de 320 mM indicando baixa afinidade pelo substrato e uma Vmáx de 54,95 μmol/min.g enzima. A caracterização por meio das análises de TGA e DSC evidenciaram a estabilidade térmica dos imobilizados, e por meio do MEV e TPA foi possível avaliar a estrutura rígida formada pela ativação e imobilização da β-gal em esferas de quitosana com genipina, e através da avaliação da cor, notou-se que a genipina pode interagir e modificar a cor após a ativação e a imobilização de enzimas. Assim, a imobilização da enzima em suporte à base de quitosana ativada com genipina apresentou potencial para a hidrólise de lactose contida em leite UHT, podendo ser aplicada na produção de alimentos zero lactose e/ou prebióticos, já que a genipina apresenta menos toxicidade que outros agentes utilizados na imobilização de enzimas.

Palavras-chave: β-galactosidase. Biocatalisador. Polimerização. Reticulação. Hidrólise.

Digitalizado com CamScanner

ABSTRACT

Enzyme immobilization has been used in order to improve the economy of bioprocesses, aiming at stability, reuse, recovery, selectivity and high quality of the resulting product. Despite the advantages of enzyme immobilization, the commercially available ones have a high value, therefore, studies are needed to develop new supports and methods of economically viable, safe and, mainly, efficient immobilization. In view of this, the present study sought to evaluate the immobilization of the enzyme β-galactosidase from Kluyveromyces lactis in support of chitosan based on genipin for application in dairy products. The form of chitosan support, activation time and temperature, concentration of the genipin activator, drying of the spheres and, subsequently, the immobilization itself through the enzymatic load offered to the support were evaluated. Based on the experimental design, the influence of the number of spheres and substrate concentration, on the immobilization yield and enzymatic activity were analyzed. The immobilized and the free enzyme were evaluated for pH and optimal reaction temperature and thermal stability. From the biocatalyst, the kinetic constants Km and Vmax were defined, their operational and storage stability, as well as, characterized according to the analyzes of TGA, DSC, SEM, TPA and color. The results obtained in the study of support preparation parameters defined by the enzymatic activity (At) and immobilization yield (IR) the shape of the support in 2 mm spheres, the time of 1 hour at 60 ° C for the activation of the support with genipin at a concentration of 0.5 mg / mL, to polymerize with chitosan to immobilize the 56 U / mL charge of β-gal. The experimental design demonstrated that there was an influence of the variables quantity of spheres and concentration of substrates both in the immobilization yield and in the evaluation of the enzymatic activity, obtaining as optimized condition 4.57 mg / mL of spheres and concentration of o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) of 10 mM, with an IR of 84.13% and up to 24.97 U / g. The optimal reaction temperature was 37 ° C and the pH of the immobilized enzyme was 7.0, compared to 42 ° C and 6.8 for the free enzyme. The immobilized enzyme showed an increase in thermal stability at 10 and 37 ° C, compared to the free enzyme. Immobilization enabled the application of the β-gal enzyme in four successive cycles of lactose hydrolysis contained in UHT milk, and in synthetic medium (lactose and ONPG) only 1 recycle was possible, and the frozen form for twenty-one consecutive days was the indicated for conservation of fixed assets. The immobilized enzyme showed a high Km, 320 mM indicating low affinity for the substrate and a Vmax of 54.95 µmol /min.g enzyme. The characterization through the TGA and DSC analyzes showed the thermal stability of the immobilized, and through the SEM and TPA it was possible to evaluate the rigid structure formed by the activation and immobilization of β-gal in chitosan spheres with genipin, and through the evaluation of color, it was noted that genipin can interact and modify color after enzyme activation and immobilization. Thus, immobilization of the enzyme in support of chitosan based on genipin showed potential for lactose hydrolysis contained in UHT milk, and can be applied in the production of zero lactose and / or prebiotic foods, since genipin has less toxicity than others agents used in enzyme immobilization.

Keywords: β-galactosidase. Biocatalyst. Polymerization. Crosslinking. Hydrolysis.

Digitalizado com CamScanner

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hidrólise da lactose pela ação da enzima β-galactosidase.....23
Figura 2 - Transgalactosilação da lactose pela ação da enzima β-galactosidase.....23
Figura 3 - Métodos de imobilização.....26
Figura 4 - Estrutura química da quitosana.....29
Figura 5 - Reticulação e ativação da quitosana com genipina.....32
Figura 6 - Síntese de lactulose a partir da lactose.....37
Figura 7 - Fluxograma do processo da imobilização da enzima β-gal em quitosana ativada com genipina.....39
Figura 8 - Suportes à base de quitosana neutros e secos para aplicação na imobilização de enzimas.....41
Figura 9 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para as atividades enzimáticas (U/g) da enzima imobilizada β-galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina em função da quantidade de esferas (mg/mL) e da concentração de substrato (mM).....59
Figura 10 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para rendimento de imobilização (%) da enzima β-galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina em função da quantidade de esferas (mg/mL) e da concentração de substrato (mM).....60
Figura 11 - Efeito do pH na atividade relativa da enzima livre e enzima imobilizada em quitosana ativada com genipina.....62
Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade residual da enzima β-gal na forma livre e imobilizada em suporte de quitosana ativado com genipina.....63
Figura 13 - Estabilidade térmica à 10 °C da enzima livre (a) e enzima imobilizada em esferas de quitosana ativada com genipina (b).....64
Figura 14 - Estabilidade térmica à 37 °C da enzima livre (a) e da enzima imobilizada em esferas de quitosana ativada com genipina (b).....65
Figura 15 - Linearização de Lineweaver-Burk.....67
Figura 16 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 60 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução de ONPG 10 mM à 37 °C sob agitação de 150 rpm.....69
Figura 17 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 270 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução lactose a 5% (p/v) à 37 °C sob agitação de 150 rpm.....69

Digitalizado com CamScanner

Figura 18 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 300 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução contendo leite UHT à 37 °C sob agitação de 150 rpm.....70
Figura 19 - Estabilidade ao armazenamento das enzimas imobilizadas em diferentes métodos de conservação das esferas: congeladas, imersas em solução tampão, liofilizadas mantidas em geladeira e liofilizadas congeladas.....71
Figura 20 - Análise de TGA nas esferas de quitosana utilizando o método de secagem: ES, ESA, ESI, ESC.....73
Figura 21 - Análise de TGA nas esferas de quitosana utilizando-as úmidas: EC, ECA e ECI.....74
Figura 22 - Curvas de DSC para as amostras de amostras de esferas secas (ES), esferas secas ativadas (ESA), esferas secas ativadas imobilizadas (ESI); esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC).....76
Figura 23 - Curvas de DSC para as amostras de amostras de esferas úmidas congeladas (EC), esferas úmidas congeladas e ativadas (ECA) e esferas úmidas ativadas e imobilizadas (ECI).....77
Figura 24 - Análise de MEV para esferas de quitosana secas (a), esferas de quitosana secas ativadas (b), esferas de quitosana secas ativadas e imobilizadas (c) e imobilizadas congeladas (d).....78
Figura 25 - Análise de MEV para esferas de quitosana úmidas (a), esferas de quitosana úmidas ativadas (b), esferas de quitosana úmidas ativadas e imobilizadas (c).....79
Figura 26 - Esferas de quitosana (ES), esferas de quitosana ativadas (ESA) e esferas de quitosana ativadas e imobilizadas com β-gal (ESI).....82

Digitalizado com CamScanner

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes com os respectivos níveis utilizados no planejamento experimental para imobilização de β-galactosidase em esferas de quitosana ativadas com genipina.....43
Tabela 2 - Resultados de atividade enzimática e rendimento de imobilização para as três formas de suportes a base de quitosana avaliados.....51
Tabela 3 - Influência do tempo e da temperatura da ativação com genipina nas esferas de quitosana de 2 mm, na atividade e rendimento da β-gal imobilizada.....52
Tabela 4 - Ativação do suporte de quitosana com genipina nas concentrações de 0,5 e 1,5 mg/mL nas atividades enzimáticas (At) e no rendimento de imobilização (RI).....54
Tabela 5 - Atividade enzimática (At) e rendimento de imobilização (RI) na avaliação da secagem das esferas ativadas.....55
Tabela 6 - Influência da carga enzimática oferecida ao suporte de quitosana ativada com genipina, na atividade (At) e no rendimento de imobilização (RI).....55
Tabela 7 - Resultados do planejamento DCCR 2^2 para atividade enzimática e rendimento de imobilização da enzima β-gal em esferas de quitosana ativadas com genipina. Variáveis independentes: Quantidade de esferas (mg/mL) (X1) e Concentração de substrato ONPG (mM) (X2), com valores codificados e reais. Variáveis dependentes: Atividade enzimática (At) e Rendimento de Imobilização (RI).....57
Tabela 8 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para os modelos de regressão utilizados para explicar as atividades enzimáticas e rendimento de imobilização da enzima β-gal em suporte a base de quitosana ativada com genipina.....58
Tabela 9 - Resultados experimentais das atividades enzimáticas da β-gal.....67
Tabela 10 - TPA das amostras de esferas de quitosana secas (ES), ativadas (ESA), imobilizadas (ESI) e congeladas (ESC) para o parâmetro de dureza.....81
Tabela 11 - Análise de cor das amostras de esferas de quitosana secas (ES), ativadas (ESA), imobilizadas (ESI).....82

Digitalizado com CamScanner

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Imobilização da enzima β-galactosidase pelo tipo de imobilização, suporte e aplicação.....33

Digitalizado com CamScanner

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-gal	β-galactosidase.
A. oryzae	*Aspergillus oryzae*.
At	Atividade enzimática.
ANOVA	Análise de Variância.
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional.
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura.
EC	Esferas úmidas congeladas.
ECA	Esferas úmidas congeladas ativadas.
ECI	Esferas úmidas congeladas ativadas e imobilizadas.
ES	Esferas secas.
ESA	Esferas secas ativadas.
ESI	Esferas secas ativadas imobilizadas.
ESC	Esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas.
GL	Grau de Liberdade.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura.
ONPG	o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside.
ONP	2-Nitrophenol.
UHT	Ultra High Temperature
RI	Rendimento da Imobilização.
TGA	Análise Termogravimétrica.
TPA	Análise do Perfil de Textura.

Digitalizado com CamScanner

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVO GERAL 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

3.1 ENZIMAS 21

3.1.1 Enzima β-Galactosidase 22

3.1.2 Reações catalisada pela β-galactosidase 22

3.2 ENZIMAS IMOBILIZADAS 24

3.2.1 Métodos de imobilização 25

3.2.2 Tipos de suporte 28

3.2.3 Reticulação e ativação de suporte 29

3.2.4 Imobilização da enzima β-galactosidase 32

3.3 APLICABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA 35

3.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS 37

4 MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1 PREPARO DO SUPORTE 40

4.1.1 Avaliação da forma de suporte à base de quitosana 40

4.1.2 Influência do tempo e temperatura de ativação 41

4.1.3 Avaliação da concentração do ativador 42

4.1.4 Avaliação da secagem após ativação 42

4.1.5 Influência da carga enzimática oferecida ao suporte 42

4.2 PARÂMETROS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA 42

4.3 PARÂMETROS DA ENZIMA IMOBILIZADA 43

4.3.1 Temperatura e pH ótimo da medida da atividade da enzima livre e imobilizada 44

4.3.2 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada 44

4.3.3 Constantes cinéticas 44

4.3.4 Estabilidade operacional 45

4.3.5 Estabilidade ao armazenamento 45

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE E DA ENZIMA IMOBILIZADA 46

4.4.1 Análise Termogravimétrica (TGA) 46

4.4.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 47

Digitalizado com CamScanner

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 47
4.4.4 Análise do Perfil de Textura e Cor Instrumental 47
4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA 48
4.5.1 Enzima Livre 48
4.5.2 Enzima Imobilizada 49
4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA 50
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 51
5.1 PREPARO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO 51
5.1.1 Forma de preparo do suporte 51
5.1.2 Influência do tempo e temperatura de ativação 52
5.1.3 Avaliação da concentração do ativador 53
5.1.4 Avaliação da secagem pós ativação 54
5.1.5 Influência da carga enzimática oferecida ao suporte 55
5.2 PARÂMETROS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA 56
5.3 PARÂMETROS DA ENZIMA IMOBILIZADA 61
5.3.1 Temperatura e pH ótimo da enzima livre e imobilizada 61
5.3.2 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada 64
5.3.3 Constantes cinéticas 66
5.3.4 Estabilidade operacional 68
5.3.5 Estabilidade ao armazenamento 71
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA 72
5.4.1 Análise Termogravimétrica (TGA) 72
5.4.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 75
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 78
5.4.4 Análise do Perfil de Textura e Cor Instrumental 80
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 84
7 REFERÊNCIAS 85
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR 94
APÊNCIDE B - DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO 95

Digitalizado com CamScanner

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a tecnologia de imobilização de enzimas tem sido utilizada, tornando possível manusear a maioria das enzimas, para que exibam propriedades desejadas pela indústria (SHELDON; VAN PELT, 2013; KLEIN et al., 2016). Com intuito de melhorar ainda mais a dinâmica dos processos, a imobilização visa aumentar a estabilidade e seletividade, proporcionar a recuperação e ainda obter produtos específicos. Além da estabilidade cinética, a aplicação industrial também requer um biocatalisador com resistência mecânica e segurança, sendo este último essencial nas indústrias alimentícias.

A quitosana tem sido amplamente utilizada como suporte para imobilização enzimática devido a suas características como não toxicidade, ser inerte, biocompatível, biodegradável, bacteriostática, barata e versátil para diversas formas e tamanhos, sendo ideal para uso em bioprocessos. Ainda, a estrutura da quitosana faz dela um suporte heterofuncional para imobilização enzimática (KLEIN et al., 2016; FLORES et al., 2019). Porém, devido a sua baixa resistência mecânica, faz-se necessário a reticulação formando redes de maior estabilidade. Entre os agentes reticulantes, o mais conhecido e amplamente utilizado é o glutaraldeído; no entanto, essa substância deve ser evitada em produtos alimentícios por apresentar efeitos citotóxicos em concentrações superiores a 0,1% (FLORES et al., 2019).

A genipina obtida a partir dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides* Ellis, consiste em um agente reticulante com cerca de 5.000 a 10.000 vezes menor citotoxicidade que o glutaraldeído (SUNG et al., 1999, BELLÉ et al., 2018), tornando-se uma alternativa interessante para integrar sistemas de imobilização de enzimas aplicadas em alimentos. Além disso, foi relatado que a genipina pode apresentar atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antidepressivo, antifúngico, antiangiogênico, antidiabético e imunossupressor (LEE et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2018; HOBBS et al., 2018).

A enzima β-galactosidase proveniente de *Kluyveromyces lactis* tem um papel importante na indústria de laticínios, catalisando a hidrólise da lactose em glicose e galactose, sendo essencial para o desenvolvimento de novos produtos com reduzido teor de lactose e ou na produção de prebióticos como lactulose e oligassacarídeos (BELLÉ et al., 2018). No entanto, poucos estudos apresentados na literatura avaliam a imobilizada.

Digitalizado com CamScanner

Visando atender o índice ascendente de portadores de intolerância à lactose, estimado em cerca de 70% da população adulta no mundo que manifesta alguma deficiência de lactase no organismo (RUEDA et al., 2016), bem como a busca por alimentos funcionais (BALTHAZAR et al., 2017), as indústrias têm buscado utilizar enzimas em processos para o benefício da saúde do consumidor e da qualidade nutricional dos alimentos.

Com base nos resultados satisfatórios apresentados pela quitosana como suporte à imobilização da β-galactosidase (KAUSHAL et al., 2018; BELLÉ et al., 2018; FLORES et al., 2019) e na importância do aprimoramento de bioprocessos do ponto de vista da compatibilidade alimentar, utilizar a genipina como agente de reticulação e ativação natural, pode ser uma alternativa viável para imobilização da β-galactosidase e posterior aplicação em processos de hidrólise de lactose e síntese de prebióticos (GUERRERO et al., 2017) na indústria de produtos lácteos.

Digitalizado com CamScanner

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imobilização da β-Galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina para aplicação em lácteos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Investigar a ativação do suporte de quitosana com genipina quanto à:
   - concentração de ativador utilizada;
   - tempo de ativação;
   - temperatura de ativação.

b. Investigar a imobilização da enzima β-Galactosidase em quitosana ativada com genipina quanto:
   - ao tipo de suporte a ser utilizado (esferas x partículas);
   - à secagem do suporte;
   - à carga de enzima oferecida ao suporte.

c. Otimizar a imobilização da β-Galactosidase em quitosana ativada com genipina através de planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 sendo variáveis independentes concentração de suporte e concentração de substrato;

d. Determinar pH e temperatura ótima dos derivados enzimáticos;

e. Avaliar estabilidade térmica dos derivados enzimáticos;

f. Determinar as constantes cinéticas dos imobilizados;

g. Determinar os reciclos operacionais do biocatalisador;

h. Verificar a influência da forma de armazenamento na estabilidade dos imobilizados;

i. Caracterizar os derivados imobilizados por MEV, DSC, TGA e quanto à textura e cor.

Digitalizado com CamScanner

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

As enzimas são consideradas biocatalisadores que aumentam as velocidades reacionais de vários processos biológicos, sendo também consideradas importantes devido ao apelo ecológico, por apresentar soluções "mais limpas" para a catálise de produtos de interesse (MACKENZIE et al., 2015; MADHAVAN et al., 2017), já que a maior parte dos processos que envolvem catalisadores químicos usam solventes orgânicos ambientalmente nocivos e requerem alta energia para os processos (MACKENZIE et al., 2015).

Desde as décadas de 1940 e 1960, as enzimas têm sido utilizadas em aplicações industriais. O uso de enzimas livres e imobilizadas ocorrem no setor alimentício, na área de medicina, farmacêutica, têxtil, agricultura, meio ambiente, indústrias química e bioquímica (DICOSIMO et al., 2013), estas ganharam popularidade devido à sua ampla gama de aplicações, em desenvolvimento ou potenciais. Atualmente, a maioria das aplicações enzimáticas é desenvolvida a nível industrial (HETTIARACHCHY et al., 2018).

Dentre os biocatalisadores industriais mais importantes estão as lactases (indústria de alimentos) (ALBUQUERQUE et al., 2016), lipases (biocombustível e indústria farmacêutica) e celulases (biocombustível) (SANTOS et al., 2015), tripsina (indústria do couro) (BHAVSAR et al.,2013), xilanase (indústria de papel e celulose) (KHATRI et al., 2016), lipoxigenase e fitase (indústria alimentícia) (REBELLO et al., 2017), proteases ativas a frio e α-amilase (indústria de detergentes) (RAI et al., 2017), hialuronidase (enzima farmacêutica) (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A utilização industrial de enzimas é frequentemente dificultada devido à recuperação dessas enzimas solúveis do meio reacional. Assim, estas são desperdiçadas e em alguns casos podem resultar em contaminação do produto final. Contudo, a solução deste problema pode ser alcançada pela imobilização dessas enzimas (WAHBA, 2018). Nesse sentido, o uso da tecnologia de imobilização enzimática pode melhorar ainda mais a economia dos processos devido a diferentes vantagens em relação aos sistemas que utilizam micro-organismos ou enzimas livres (RODRIGUES et al., 2013).

Digitalizado com CamScanner

3.1.1 Enzima β-Galactosidase

A enzima β-galactosidase (EC 3.2.1.23) é utilizada na hidrólise da lactose, para produção de alimentos com baixo teor de lactose, aumentando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados a partir da glicose e galactose, bem como, alguns oligossacarídeos dentre os quais destaca-se o galacto-oligossacarídeos (GOS), açúcares não digeríveis (SOUZA et al., 2018) e lactulose (GUERRERO et al., 2017). Também conhecida como lactase ou β-D-galactohidrolase, pode ser encontrada amplamente na natureza, mais precisamente, em vegetais, como amêndoas e maçãs, em órgãos de animais, como intestino e cérebro, além de ser produzidas por muitos microrganismos, como leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*), fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) e bactérias (*Bacillus coagulans, Bacillus stearco-thermophillus, Bacillus circulans, Escherichia coli, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus thermophila*) (VIDYA et al., 2014).

Pertencentes à família das glicosídeo hidrolases (família GH2 e GH35) devido aos enovelamentos distintos, no geral, as β-galactosidases fúngicas são capazes de atuar em uma faixa de pH de 2,5 a 5,4, sendo que as provenientes de leveduras possuem pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e as bacterianas entre 6,5 e 7,5, atuando numa faixa relativamente mais neutra. Devido a essas características e outras, como temperatura ótima, 37 a 42 ° C, a enzima β-galactosidase proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* tem sido empregada com sucesso em estudos de hidrólise de leite (KLEIN et al., 2012; WOLF et al., 2019).

O ambiente em que será empregada a enzima deve ser levado em consideração antes de sua aplicação, devido à essas diferenciações e faixas de pH e temperatura, (HUSAIN, 2010) assim como a fonte de obtenção da enzima que pode resultar em uma maior atividade hidrolítica ou de transgalactosilação (BELLÉ, 2017).

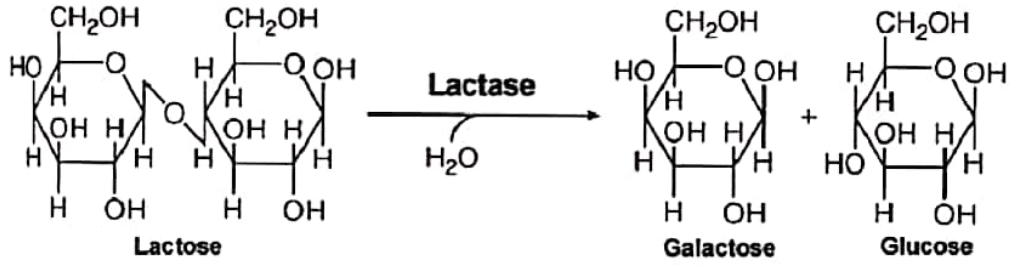
3.1.2 Reações catalisada pela β-galactosidase

A enzima β-galactosidase é capaz de hidrolisar resíduos (ligações) de β-D-galactopiranosídicas a partir de polissacarídeos, oligossacarídeos ou metabólitos secundários. Devido a essa atividade, a enzima possui duas grandes aplicações industriais: a de redução do teor de lactose de produtos à base de leite e a de síntese de produtos galactosilados (HUSAIN, 2010). Ou seja, seu mecanismo de ação inclui tanto a

Digitalizado com CamScanner

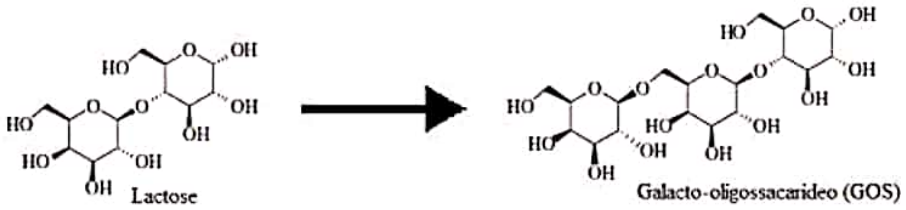
hidrólise da lactose quanto a reação de transgalactosilação. Se a enzima estiver em um ambiente de baixa concentração de lactose (com alta atividade de água) irá ocorrer a hidrólise desse dissacarídeo, enquanto que se estiver na presença de altas concentrações de lactose sua via será deslocada para a transgalactosilação (GOULAS *et al.*, 2007), de acordo com os esquemas apresentados na Figura 1 e 2, respectivamente.

Figura 1 - Hidrólise da lactose pela ação da enzima β-galactosidase.



Fonte: BELLÉ *et al.*, 2019.

Figura 2 - Transgalactosilação da lactose pela ação da enzima β-galactosidase.



Fonte: HUSAIN, 2010.

A β-galactosidase produzida a partir de *Kluyveromyces lactis* tem sido amplamente empregada na hidrólise de lactose de alimentos lácteos industriais, produzindo glicose e galactose (TORRES; BATISTA-VIEIRA, 2012; KLEIN et al., 2012). A hidrólise da lactose minimiza os problemas de cristalização em alimentos contendo açúcar e aumenta ao tempo de conservação, utilizada assim em na fabricação de produtos como o leite condensado e doce de leite. Além disso, diminui os problemas de saúde para indivíduos intolerantes à lactose, aumentando a solubilidade e a digestibilidade dos alimentos lácteos (RICARDI et al., 2017). A β-galactosidase pode ser utilizada também para a produção de prebióticos como os galacto-oligossacarídeos e a lactulose (GUERREIRO et al., 2017).

Digitalizado com CamScanner

O processo de hidrólise/transgalactosilação usando enzimas livres aumenta o custo de produção de alimentos sem lactose e/ou com baixo teor de lactose e de prebióticos (FACIN et al., 2015). Assim, a imobilização de β-galactosidase para a hidrólise de lactose é uma estratégia promissora para a indústria de alimentos quando o objetivo é produzir alimentos com teores reduzidos de lactose (LIU et al., 2012) e/ou síntese de prebióticos como os galacto-oligassacarídeos e a lactulose (SONG et al., 2013; GUERRERO et al., 2017).

3.2 ENZIMAS IMOBILIZADAS

O uso da tecnologia de imobilização enzimática pode melhorar ainda mais a economia dos processos nos quais se busca a utilização de resíduos devido a diferentes vantagens em relação aos sistemas que utilizam micro-organismos ou enzimas livres (HETTIARACHCHY et al., 2018).

As enzimas imobilizadas possuem em sua grande maioria atividade superior em relação às livres devido à maior disponibilidade de seus sítios ativos quando imobilizadas nos poros do sólido. Além de ser uma técnica ecológica e acessível de acordo com o suporte utilizado, prolonga a vida útil do biocatalisador proporcionando uma recuperação fácil e reutilização das enzimas em sucessivos lotes da produção de interesse (CASTIGLIONI, 2009; HETTIARACHCHY et al., 2018). Portanto, a imobilização pode ser uma alternativa viável e eficiente na otimização efetiva do desempenho operacional em processos industriais (SHELDON; VAN PELT, 2013).

As enzimas imobilizadas são definidas como as fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região delimitada do espaço com retenção da sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetidamente e continuamente (CHIBATA; TOSA 1977; SHELDON; PELT, 2013). A imobilização de enzimas é um pré-requisito para muitos dos seus usos como biocatalisadores industriais, pois o principal objetivo da imobilização é facilitar a reutilização enzimática (SHELDON; PELT, 2013). No entanto, muitos pesquisadores concentram a pesquisa em como a imobilização pode melhorar outras propriedades enzimáticas, como estabilidade, atividade ou seletividade (RODRIGUES et al., 2013).

Existem muitas razões ou vantagens para usar técnicas de imobilização, essas incluem: permitir a recuperação e a reutilização de uma enzima muitas vezes (regeneração

Digitalizado com CamScanner

e reciclagem); obtenção fácil do produto e separação de enzimas; possível interromper a reação enzima-substrato a qualquer momento, apenas removendo a enzima da solução; possível iniciar ou continuar a reação a qualquer momento, colocando a enzima e o substrato em contato; o produto resultante não está contaminado com a enzima; alta qualidade do produto resultante; aumenta a estabilidade da enzima, melhora suas propriedades e são menos propensos a desnaturar; a reação é mais natural e pode ser feita em temperaturas mais baixas do que usando um catalisador químico, para que a energia seja utilizada de forma mais eficiente (HETTIARACHCHY et al., 2018).

A técnica de imobilização é ainda adequada para fins analíticos, uma vez que não há necessidade de uso de reagente; as enzimas geralmente têm uma meia-vida longa, sendo possível predizer a diminuição da atividade; melhora a economia de átomos e reações e/ou os custos de produção; em alguns casos, a eficiência catalítica da enzima imobilizada é melhor; controle da reação; econômico e simples de usar; as enzimas são específicas, o produto final é isento de enzimas e, portanto, sem necessidade de purificação, e mais ambientalmente correto em comparação a reações químicas devido à menor geração de CO_2 (DICOSIMO et al., 2013; KAWACHI et al., 2014; ZUCCA et al., 2016).

O método de imobilização pode influenciar na atividade enzimática, sendo importante selecionar um método adequado, ou seja, que permita alta eficiência do processo enzimático, sem danificá-la, levando em consideração o substrato e enzima a serem utilizados e o produto que será produzido. Os principais componentes para imobilização são: a matriz ou suporte, a enzima e o método de retenção (imobilização) (BRENA et al., 2013). Muitos materiais têm sido utilizados como matriz ou suporte para imobilizar enzimas, em geral, são classificados como inorgânicos, orgânicos e transportadores sintéticos (HETTIARACHCHY et al., 2018).

3.2.1 Métodos de imobilização

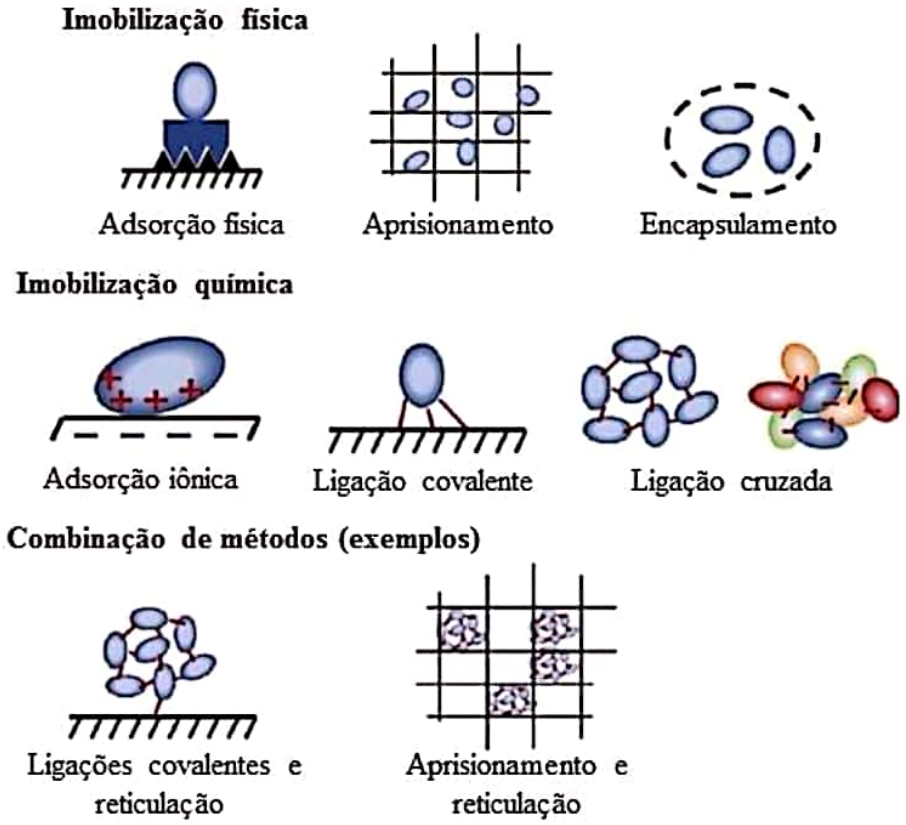
Muitas formas de imobilização foram desenvolvidas e relatadas na literatura, onde diferentes classificações foram indicadas por diferentes autores na busca por técnicas específicas e eficientes. Brena e Batista-Viera (2006) definiram métodos irreversíveis e reversíveis de imobilização enzimática e subclassificaram em: ligações covalentes, interligação, aprisionamento e microencapsulação como irreversíveis; e ligações iônicas,

Digitalizado com CamScanner

adsorção, ligações metálicas ou quelação, ligações de afinidade e ligações dissulfeto para os reversíveis; e assim por diante. A Figura 3 apresenta os métodos de imobilização utilizados atualmente.

Um processo de imobilização adequado evita a desnaturação enzimática em ambientes contendo catalisadores ativos estáveis ou soluções com diferentes temperaturas e valores de pH. Além disso, uma enzima imobilizada pode ser facilmente recuperada e reutilizada em vários ciclos de hidrólise, o que reduz a relação custo/benefício no processo industrial (LIU et al., 2012).

Figura 3 - Métodos de imobilização.



Fonte: ZHANG et al., 2011; BELLÉ et al., 2018.

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação da enzima imobilizada é necessário selecionar o procedimento mais simples e menos oneroso que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES et al., 2011). Entre muitos métodos propostos para a imobilização de proteínas, o mais importante e útil é a imobilização por adsorção.

Digitalizado com CamScanner

As ligações químicas são fracas o bastante para não alterar a conformação estrutural nativa da enzima. Isso evita que os sítios ativos da enzima se preservem e permite que a enzima retenha sua atividade (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; HWANG; GU, 2013).

Garcia-Galan e colaboradores (2011) salientam que existem pontos relevantes para se obter um biocatalisador imobilizado eficiente: resistência mecânica, simplicidade do protocolo de imobilização, ter a possibilidade de acoplar um sistema de purificação da enzima, avaliar o impacto da imobilização na atividade da enzima, garantir a estabilidade da enzima, evitando seu enrijecimento ou dissociação estrutural, garantir a sua seletividade e reduzir possíveis problemas de inibição de sua atividade.

Com o passar dos anos, a combinação de dois ou mais métodos de imobilização é cada vez mais empregada para melhorar a performance das enzimas. Visto que não há um só método ou material que beneficie todos os tipos de enzimas existentes, cada enzima necessita de um estudo de metodologia para a aplicação desejada. Porém, idealmente, a técnica utilizada para imobilização deverá conferir uma atividade estável à enzima durante longos períodos de tempo, evitar sua lixiviação, ser reutilizável e permitir a difusão de substratos e produtos durante a catálise (ISPAS et al., 2009).

O método de ligação covalente baseia-se na ativação do suporte com algum grupo reativo, como por exemplo polietilenoglicol, que interage com os grupos nucleofílicos da enzima formando ligação covalente ou ligações cruzadas numa matriz constituída pela enzima e por agentes bifuncionais (MENDES et al., 2011).

A imobilização por ligação covalente é muito eficiente, no entanto é a mais trabalhosa e dependerá dos grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os dos resíduos de aminoácidos da enzima. Esse método pode ou não carecer de uma ativação do suporte de interesse antes da imobilização da enzima. Vários grupos funcionais podem ser utilizados para imobilização covalente, como grupos amino e resíduos de açúcares (BELLÉ, 2017). Apesar de em alguns casos ser necessário bloquear alguns grupos reativos livres após a imobilização, possui as vantagens de manter a enzima fortemente ligada ao suporte, ser mais estável que a forma livre, apresentar baixa taxa de lixiviação e reduzida contaminação do produto final (GARCIA-GALAN et al., 2011; GUERREIRO et al., 2017).

Digitalizado com CamScanner

3.2.2 Tipos de suporte

As propriedades de imobilização são regidas pelas propriedades da enzima e do material transportador (suporte). A interação entre os dois fornece à imobilização características como especificidade à substâncias químicas, bioquímicas, propriedades mecânicas e propriedades cinéticas. O suporte pode ser um material sintético, um polímero orgânico, biopolímero ou um polímero inorgânico (BELLÉ et al., 2018)

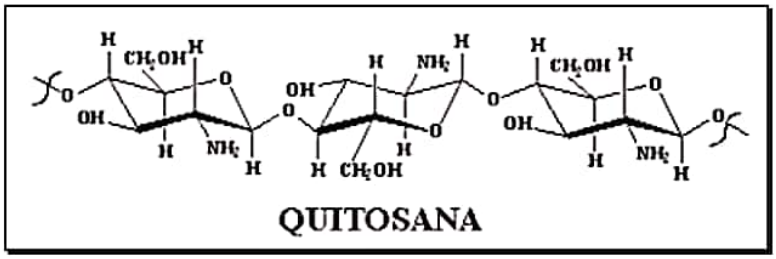
As particularidades de cada suporte, como diâmetro de partícula, susceptibilidade ao intumescimento, estabilidade mecânica e comportamento durante a compressão devem ser previamente analisados de acordo com o tamanho da enzima e também averiguados quanto às suas condições específicas de reação, já que alguns materiais podem ser instáveis em determinados pHs, temperaturas e meios reacionais (CANTONE et al., 2013).

Biopolímeros são uma boa alternativa de suportes para a imobilização de enzimas, por serem naturais e normalmente possuir custo reduzido. Diferentes biomateriais são citados na literatura como os carboidratos insolúveis (celulose, amido, dextranas, agarose, quitosana e etc.) e as proteínas (albumina, gelatina e etc.) (CAO, 2005; FACIN et al., 2015). Dentre eles, a utilização de polissacarídeos é atrativa, já que são seguros biologicamente e possuem característica hidrofílica, propiciando um ambiente adequado para a maioria das enzimas (CANTONE et al., 2013).

A quitosana [(1 4 4) -2-amino-2-desoxi-d-glucana] (Figura 4) é a forma desacetilada da quitina e solúvel em soluções de ácido acético diluído. A quitina é o biopolímero aminopolissacarídeo mais abundante na natureza responsável pela estrutura dos exoesqueletos de crustáceos, insetos, fungos, dentre outros (ELIEH-ALI-KOMI et al., 2016). Tem sido usada como suporte à imobilização de enzimas pois oferece uma série de características desejáveis, incluindo não toxicidade, biocompatibilidade, inércia fisiológica, capacidade biodegradável, uma notável afinidade para as proteínas, barato e versátil, podendo adotar diversas formas e tamanhos, sendo ideal para uso em bioprocessos (KLEIN et al., 2016).

Digitalizado com CamScanner

Figura 4 – Estrutura química da quitosana.



Fonte: AZEVEDO et al., 2007.

A estrutura da quitosana faz dela um suporte heterofuncional para imobilização enzimática. Por definição, um suporte heterofuncional permite a imobilização de uma enzima por mais de um mecanismo. Por exemplo, a primeira imobilização pode ser por adsorção, iônica ou hidrofóbica, e posteriormente ligação covalente, formada para estabilizar a enzima (ZAAK et al., 2017).

Além disso, propriedades mecânicas de suportes obtidos de quitosana podem ser facilmente melhoradas por reticulação com glutaraldeído, genipina e outros reagentes. Esse tratamento da quitosana com agentes reticuladores aumenta sua estabilidade térmica e previne sua dissolução em pHs ácidos (JUANG et al., 2001). Além do mais, o uso da quitosana é um ótimo exemplo de reintrodução de resíduos sólidos orgânicos em novos processos. Já que a quitina, fonte da quitosana, é um resíduo da indústria pesqueira e quando tratado produz este produto de alto valor agregado e permite sua introdução em outros processos (BELLÉ, 2017).

3.2.3 Reticulação e ativação de suporte

A imobilização de enzimas por ligação covalente é comumente empregada utilizando agentes de ativação. A ativação de suportes ocorre com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. O emprego desses agentes é simples e pode ser realizado misturando-os diretamente em uma matriz ou através da aplicação em matrizes pré-formadas, como membranas e esferas (RODRIGUES et al., 2008). O método é eficaz e ainda pode ser capaz de melhorar a estabilidade da enzima devido à presença desses agentes de imobilização que proporcionam ligações bi- ou multipontuais (GUISAN, 2006). Estes reagentes podem ser tanto utilizados para entrecruzamento de enzimas, como também em combinação com outros métodos. Diferentes agentes de ativação podem ser utilizados para a reticulação como o glicidol, a

Digitalizado com CamScanner

epicloridrina, o glioxal, o formaldeído, o glutaraldeído e a genipina. A reticulação é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, um processo conhecido como *crosslinking* ou ligação cruzada, ou seja, ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar. Com o aumento da reticulação, a estrutura se torna mais rígida (RODRIGUES et al., 2008; MUZZARELLI et al., 2015).

Porém, atualmente, muitos trabalhos têm sido publicados utilizando a genipina, considerando que os outros agentes possuem elevado grau tóxico e requerem excessivas purificações antes de serem descartados. Além disso, no caso da aplicação em alimentos os mesmos possuem concentrações limites para condução dos processos e muitas vezes isso inviabiliza seu uso como ativador (MUZZARELLI et al., 2015; KLEIN et al., 2016; FLORES et al., 2019)

A genipina é obtida a partir dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides* Ellis, onde após a extração, o geniposídeo é hidrolisado formando a genipina aglicona com a d-glicosidase em um processo microbiológico envolvendo *Penicillium nigricans*, tem sido utilizada como agente reticulador para imobilização. É relatado que a genipina pode ser cerca de 5.000 a 10.000 vezes menos citotóxica do que o glutaraldeído, podendo assim ser utilizada em processos alimentícios, em busca de alternativas biodegradáveis (MUZZARELLI, 2009; BELLÉ et al., 2018; FLORES et al., 2019)

Na indústria bioquímica e na área médica, a genipina é conhecida como um agente de ativação natural capaz de associar-se covalentemente à diferentes materiais como quitosana, gelatina, colágeno, caseína, entre outros (MUZZARELLI, 2009; LIN et al., 2013). A adição desses agentes é denominada de reticulação e tem como intuito aumentar a estabilidade química e física do material empregado. Além disso, a genipina agrega ao material a possibilidade de reações bifuncionais (MENDES et al., 2011). Devido a essas propriedades, a de reticular e a de ativar o material para reagir, pode ser utilizada com diferentes finalidades, como para imobilizar enzimas, para quantificar aminoácidos, para encapsular substâncias, para estabilizar emulsões óleo-água, para conferir estabilidade hidrotérmica ao couro, para liberação gradativa de fármacos em regiões específicas, na constituição de próteses, como bioadesivo, no tratamento de ferimentos cutâneos e como possível substituto de "stents" metálicos (PENG et al., 2014).

Alguns estudos relataram a grande capacidade de genipina para gerar "crosslinking" entre proteínas e polímeros como colágeno, gelatina e quitosana, podendo ligar-se as proteínas de forma diferente. Em valores baixos de pH ocorre o ataque

Digitalizado com CamScanner

nucleofílico da amina primária da proteína ao número de carbono 3 da genipina, depois, ocorre a condensação entre o grupo aldeído formado e as aminas secundárias. Sob condições alcalinas, o anel de genipina sofre um ataque pela presença de grupos hidroxila, levando à formação de ligações proteína-genipina (HOBBS et al., 2018)

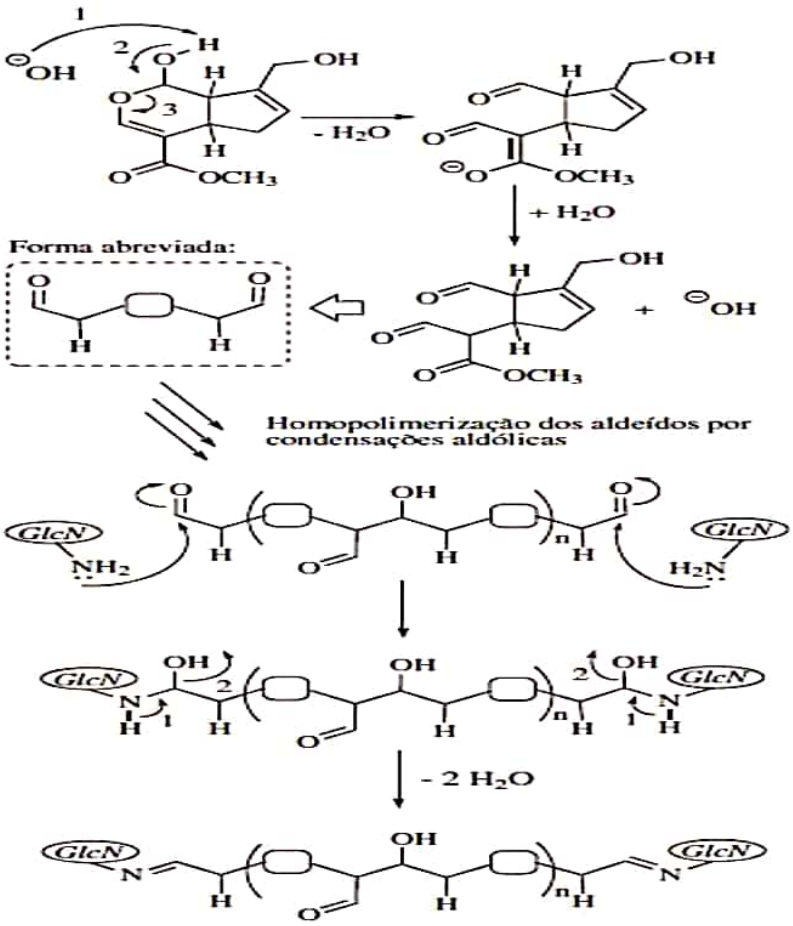
Devido a essa habilidade, a genipina é considerada um bom ativador de suporte para imobilização enzimática. Além disso, a genipina é uma molécula versátil, no processo de polimerização. Variáveis como concentração, pH, tempo e temperatura, presença ou ausência de aminoácidos específicos e suas concentrações, oxigênio podem mudar a maneira como a genipina reage e polimeriza, podendo gerar diferentes estruturas, cores e capacidades, como resistência mecânica e capacidade de inchamento (NERI-NUMA et al., 2017).

No caso específico da quitosana, a adição de pequenas quantidades de genipina a alguns desses materiais pode aumentar significativamente a elasticidade do produto e sua resistência em meios ácidos (PENG et al., 2014). O aumento da estabilidade ocorre devido a reação formar ligações resistentes (ligações covalentes) entre os materiais. Na reticulação da genipina com a quitosana há o ataque nucleofílico do grupo amino da quitosana à carbonila da genipina (C-11), o que forma uma ligação amida estável. Em seguida, há a substituição do oxigênio da estrutura cíclica da genipina por um nitrogênio da quitosana e assim estarão reticuladas (MENDES et al., 2011).

A reticulação de quitosana com genipina em solução aquosa alcalina é antecedida por uma reação de homopolimerização do agente de entrecruzamento. No processo, a polimerização do reticulante inicia-se com a abertura do anel di-hidropirânico por meio de ataque nucleofílico promovido por íons hidroxila do meio reacional. Isso resulta na formação de grupos aldoxila na molécula que, em seguida, sofrem condensação aldólica. Na etapa final, os grupos aldoxila terminais da genipina polimerizada participam de uma com as aminas das cadeias da quitosana para promover a reticulação (MUZZARELLI et al., 2009), conforme apresentado na Figura 5.

Digitalizado com CamScanner

Figura 5 - Reticulação e ativação da quitosana com genipina.



Fonte: Xu et al., 2015.

Foi relatado que a genipina apresenta atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antidepressivo, antifúngico, antiangiogênico, antidiabético, imunossupressor, usado em tratamentos de icterícia, edema e hipertensão, inibe a proliferação de várias células cancerígenas, incluindo leucemia, mama, próstata e hepatocelular carcinoma, e essas características tornam a genipina amplamente estudado principalmente para aplicações biomédicas (LEE et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2018; HOBBS et al., 2018).

3.2.4 Imobilização da enzima β-galactosidase

A imobilização da β-galactosidase vem sendo relatada na literatura mediante a aplicação de diferentes tipos de imobilização em suportes específicos buscando aplicações diversas, sendo alguns destes estudos sumarizados no Quadro 1,

Digitalizado com CamScanner

exemplificando algumas investigações realizadas com esta enzima no período de 2016 a 2019.

Quadro 1 – Imobilização da enzima β-galactosidase pelo tipo de imobilização, suporte e aplicação.

Tipo de Imobilização	**Suporte Utilizado**	**Aplicação**	**Referência**
Ligação Covalente	Nanopartículas magnéticas revestidas de quitosana ativadas com glutaraldeído	Produção de galacto-oligossacarídeos	NGUYEN et al., 2019
	Quitosana ativada com genipina	Hidrólise da lactose	FLORES et al., 2019
	Partículas de quitosana ativadas com genipina e/ou glutaraldeído	Hidrólise da lactose	BELLÉ et al., 2018
Adsorção Física	Suportes de sílica (porosa e não porosa)	Hidrólise da lactose	PRAZERES et al., 2019
	Quitosana ativada com genipina	Síntese de galacto-oligossacarídeos	KLEIN et al., 2016
Aprisionada na matriz	Quelação por colágeno	Hidrólise da lactose por processos descontínuos	GENNARI et al., 2018
	Glioxil-agarose, Aminoglioxil-agarose, Carboxil-glioxil-agarose e Quelato-glioxil-agarose	Síntese de lactulose	GUERREIRO et al., 2017
Encapsulação	Nanopartículas de quitosana	Liberação *in vitro*	HONGCAI et al., 2018
Combinação de métodos (Adsorção, incubação e reticulação)	Duolite A568	Aplicação industrial	FALLEIROS et al., 2017

Digitalizado com CamScanner

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Além de estudar o tipo de imobilização e o suporte a ser utilizado para a β-galactosidase, muitos estudos buscam avaliar a estabilidade, parâmetros cinéticos e condições de operação ótimas das enzimas imobilizadas.

Flores et al. (2019) utilizaram a β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* avaliando os efeitos dos parâmetros de reação entre genipina e quitosana, como pH (4 a 12), temperatura (25 a 70 °C), concentração de genipina (1,5; 2,5 e 5,0 mg/mL) e tempo (0,5 a 12 horas), e como estes afetaram a imobilização enzimática. O objetivo foi estudar parâmetros na preparação de esferas de quitosana ativadas por genipina, e utilizar essas partículas para imobilização da β-galactosidase avaliando a imobilização e parâmetros cinéticos, estabilidade térmica e estabilidade operacional em lotes repetidos como resposta.

Bellé et al. (2018) extraíram a genipina do genipapo através de um sistema aquoso bifásico líquido-líquido. O efeito de diferentes enzimas comerciais, suas concentrações e parâmetros de extração foram investigados. Além disso, foram preparados géis de quitosana, reticulados com glutaraldeído ou genipina e caracterizados por suas propriedades texturais e reológicas, além da estabilidade térmica e operacional. A quitosana reticulada foi usada na imobilização da enzima β-galactosidase para reações de hidrólise de lactose, apresentando aumento na resistência mecânica (0,55 N no controle e 2,54 N para a ativada) e rendimento de imobilização de 67%, quando utilizada a genipina.

Wahba (2018) avaliou o uso de esferas de gelatina (GG) como veículos de imobilização covalente para a enzima β-galactosidase; essas esferas foram submetidas a dois processos de ativação diferentes. Foram avaliados os perfis de pH e de temperatura dos imobilizados, determinados os parâmetros cinéticos Km e Vmáx, a estabilidade operacional (reciclos) e a estabilidade de estocagem.

Klein et al. (2016) realizaram um estudo de quitosana reticulada com genipina como matriz de suporte para a imobilização da β-galactosidase, caracterizando os imobilizados através de análises de FTIR e TGA, avaliando pH e temperatura ótima de atividade enzimática, além da estabilidade térmica e operacional na hidrólise da lactose a na síntese de GOS.

Esses estudos mostram a importância de avaliar a imobilização tanto na caracterização dos imobilizados, analisando as alterações ocorridas na estrutura do suporte frente a ativação e a imobilização, quanto os parâmetros de reação, como pH,

Digitalizado com CamScanner

temperatura, estabilidades térmica e operacional que são fatores de interesse no uso das enzimas pelas indústrias alimentícias.

3.3 APLICABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA

A hidrólise da lactose pela β-galactosidase já é uma tecnologia difundida nas indústrias de laticínios para reduzir o teor de lactose do leite e de seus derivados, através de mecanismo específico (KLEIN et al., 2013). Esse processo, além de beneficiar consumidores intolerantes à lactose, faz com que a doçura e a solubilidade do produto em questão sejam elevadas, pois a soma do grau de doçura desses dois sacarídeos é quase sete vezes maior que o da lactose isolada (VASILEVA et al. 2012). Com isso, indústrias que utilizam a hidrólise em seus processos diminuem a necessidade de adição de açúcares nos seus produtos finais. Além disso, a hidrólise possui outras vantagens, pode ser aplicada como uma ferramenta a fim de evitar problemas futuros nos processamentos de alguns alimentos, como ganho de textura e tempo de processo. É o caso da prevenção à cristalização da lactose, o qual gera um aspecto arenoso nos alimentos (BELLÉ, 2017).

A formação dos cristais pode ser evitada utilizando a hidrólise da lactose previamente ao processamento, como já empregado na produção de sorvetes, doce de leite e leite condensado. Outro processo em que esta catálise está inserida é no auxílio às etapas de pré-fermentação, utilizado hoje na fabricação de iogurtes (FACIN et al., 2015; BELLÉ et al., 2018). Ou seja, clivando a lactose em glicose e galactose antes da ação das bactérias lácticas se garante um menor tempo de fermentação, visto que os monossacarídeos são mais fermentescíveis que os dissacarídeos (ZADOW, 1993).

Além de realizar a hidrólise de produtos lácteos, as β-galactosidases podem catalisar reações de transgalactosilação, através da transferência de uma unidade de galactose para outro carboidrato. Essa reação é aplicada na síntese de prebióticos, como os galacto-oligossacarídeos (GOS). Os principais microrganismos que sintetizam os GOS são do gênero *Aspergillus* ou *Kluyveromyces* (TORRES et al., 2010; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018).

Os prebióticos são compostos alimentares não digeríveis que possuem ação no intestino, estimulando o crescimento ou a atividade de bactérias benéficas do sistema digestivo. Esses compostos podem ser utilizados em uma ampla variedade de produtos alimentícios, como produtos de panificação, adoçantes e iogurtes. Os GOS estimulam o crescimento de bactérias intestinais benéficas, aumentando seletivamente a microflora do

Digitalizado com CamScanner

intestino. Os prebióticos atuam como fonte de energia e de crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, fornecendo resistência contra a colonização de patógenos e reduzindo as infecções intestinais exógenas e endógenas. Os GOS são componentes ideais para formular produtos saudáveis direcionados a grupos específicos, como bebês, crianças e idosos (SANGWAN et al., 2011; CHEN; GÄNZLE, 2017).

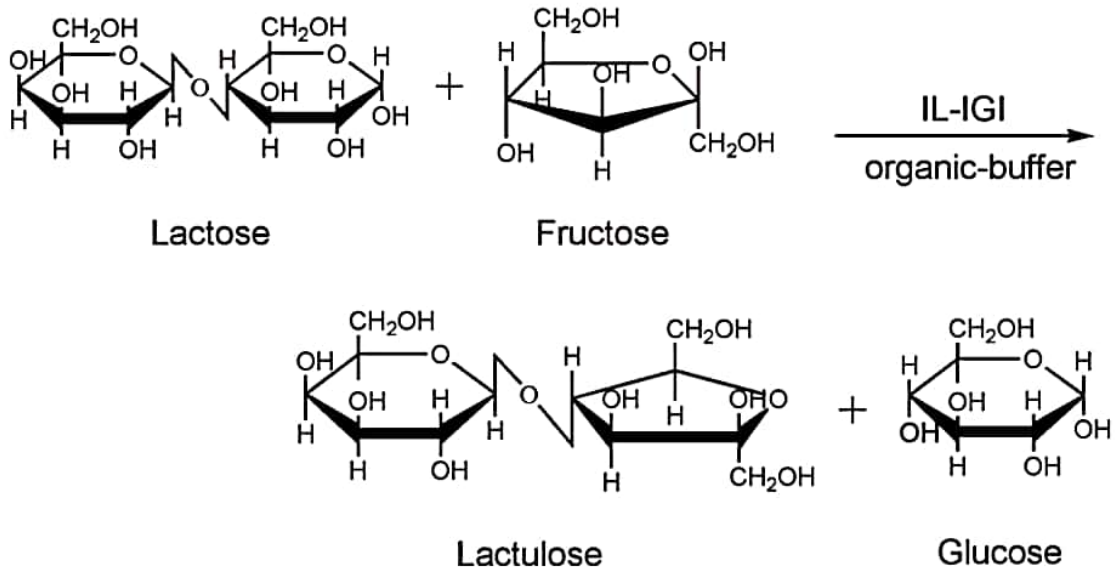
Em condições específicas de processamento, neste caso de altas concentrações de lactose, a β-galactosidase é capaz de "ativar" o seu outro mecanismo catalítico, o de transgalactosilação. Em altas concentrações desse dissacarídeo no meio reacional a enzima, além da hidrólise da lactose, promove a formação de oligômeros - galacto-oligossacarídeos (GOS). González-Delgado et al. (2016) observaram a otimização da síntese de GOS a partir da lactose utilizando a β-galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym Pure 6500 L), analisando parâmetros como temperatura, concentração de enzima, pH e tempo de reação constataram que o pH é um parâmetro crítico que afeta a transgalactosilação/hidrólise realizada pela enzima.

Entre os estudos que envolvem a aplicação da β-galactosidase, ressalta-se o uso para a síntese de lactulose (Figura 6). Guerrero et al. (2017) avaliaram a imobilização β-galactosidase em diferentes suportes para obter catalisadores altamente ativos e estáveis para a síntese de lactulose, obtendo resultados satisfatórios com o uso de suportes à base de agarose. A lactulose (4-O-β-d-galactopiranosil-d-frutose) é um dissacarídeo sintético (formado por uma molécula de frutose e uma de galactose) não digerível no qual ambos monômeros estão ligados por uma ponte β-glicosídica (SCHUMANN, 2002), classificado como prebiótico (PANESAR; KUMARI, 2011).

A primeira síntese enzimática de lactulose foi descrita por Vaheri e Kaupinnen (1978), onde observaram a síntese de 8,6 g/L de lactulose utilizando a enzima β-galactosidase na presença de lactose e frutose (em pH 7,2 e 37 °C). Essa enzima é conhecida por catalisar a hidrólise de lactose, produzindo glicose e galactose. Assim o galactosil da lactose pode ser transferido para uma hidroxila contendo um aceptor (frutose) levando a síntese de lactulose (β-d-galactosil-(1– 4) - β-D-frutose) ou outros possíveis isômeros (ponte β-1,1 ou β-1,6), dependendo da seletividade da enzima e condições de reação utilizadas (PANESAR et al., 2011).

Digitalizado com CamScanner

Figura 6 – Síntese de lactulose a partir da lactose e frutose utilizando as enzimas β-galactosidase e glicose-isomerase imobilizadas.



Fonte: HUA et al., 2010.

Assim, a imobilização de β-galactosidase para aplicação na hidrólise/transgalactosilação da lactose consiste em uma estratégia promissora para a indústria de alimentos quando o objetivo é produzir alimentos com teores reduzidos de lactose e com propriedades prebióticas (LIU et al., 2012).

3.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso de enzimas imobilizadas tem sido alvo de estudos durante anos visando ampliar e melhorar as características desses biocatalisadores. Para isso, a busca de um suporte de imobilização que possibilite que a enzima seja reutilizada, que aumente sua estabilidade frente as reações catalisadas nas indústrias e que seja compatível no setor alimentício é de suma importância. Catalisando reações de hidrolise e transgalactosilação, a enzima β-galactosidase é comumente utilizada na indústria alimentícia, na forma livre, o que pode encarecer e limitar alguns processos, indicando a necessidade de realizar estudos sobre a sua imobilização.

Digitalizado com CamScanner

Na imobilização dois fatores são primordiais: o suporte e o tipo de ligação. Com base nos resultados satisfatórios apresentados quando a quitosana foi utilizada como suporte de imobilização da β-gal (KAUSHAL et al., 2018; BELLÉ et al., 2018; FLORES et al., 2019) e da importância do aprimoramento de bioprocessos do ponto de vista da compatibilidade alimentar, utilizando a genipina como agente de reticulação e ativação natural, em um ligação covalente (suporte x enzima), ressalta-se a importância de investigar a viabilidade da imobilização dessa enzima, utilizando a quitosana ativada com genipina para posterior aplicação em processos de hidrólise de lactose e síntese de prebióticos na indústria de produtos lácteos, considerando que o consumo de alimentos especiais, zero lactose e com potencial prebiótico vem aumentando devido a tendência mundial de uma rotina mais saudável.

Segundo dados da pesquisa da Kantar Worldpanelm (2019), 20% das famílias mundialmente compram algum alimento com características especiais. A categoria de leites sem lactose, cresceu 7,9% em volume e 12,6% em valor. A entrada de produtos com propriedades prebióticas ou funcionais e os zero lactose na lista de compras revela que o consumidor está mais atento e alinhado às preocupações globais com a saúde. Ainda 27% dos lares declaram ter realizado mudanças na alimentação, aumentando de produtos naturais e que tragam algum benefício à saúde, enfatizando a importância de estudos que busquem otimizar processos e inserir novos produtos nesse contexto tanto para a indústria quanto para os consumidores.

Por isso, estudos que utilizem a enzima β-Galactosidase proveniente da *Kluyveromyces lactis* em suporte à base de quitosana ativada em genipina para uso em alimentos tornam-se importantes, devido à possibilidade de uso da mesma na hidrólise de lactose e síntese de prebióticos como os galactooligossacarídeos e a lactulose.

Digitalizado com CamScanner

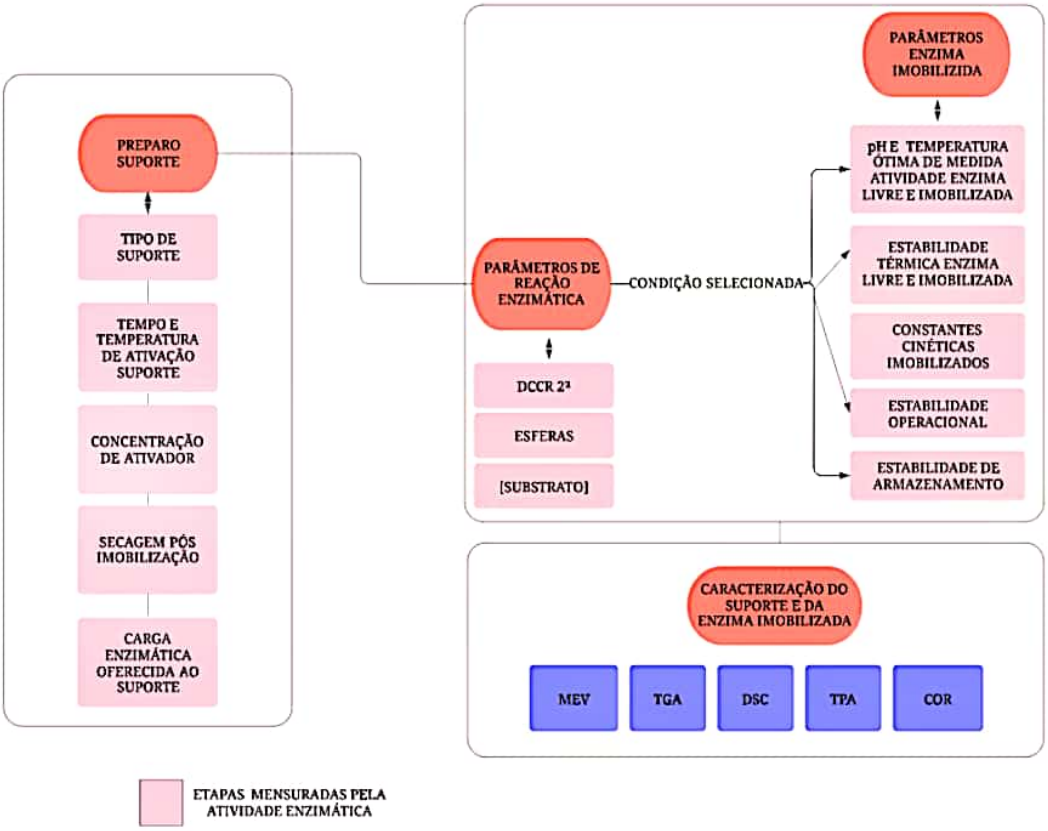
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

A β-Gal de *Kluyveromyces lactis* (EC 3.2.1.23) foi gentilmente cedida pela empresa Prozyn. O suporte de quitosana padrão foi adquirido da Polymar. Substrato ONPG (o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside), ONP (2-Nitrophenol) e genipina de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais produtos químicos provenientes da Reatec e Dinâmica.

O preparo do suporte, condições de imobilização, assim como a avaliação da enzima imobilizada foram desenvolvidos em etapas conforme descrito na Figura 7, sumarizando a pesquisa.

Figura 7 - Fluxograma do processo da imobilização da enzima β-gal em quitosana ativada com genipina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Digitalizado com CamScanner

4.1 PREPARO DO SUPORTE

Para a imobilização da enzima β-Gal utilizou-se como suporte a quitosana ativada com genipina, através do método de imobilização por ligação iônica entre quitosana e genipina e posterior ligação covalente entre o suporte e a enzima.

Foram avaliados parâmetros no preparo de suporte quanto à sua ativação e a imobilização da enzima:

- Forma do suporte à base de quitosana (partículas, esferas 4 mm e esferas 2 mm);
- Concentração de ativador;
- Tempo de ativação;
- Temperatura de ativação;
- Secagem das esferas;
- Carga de enzima oferecida.

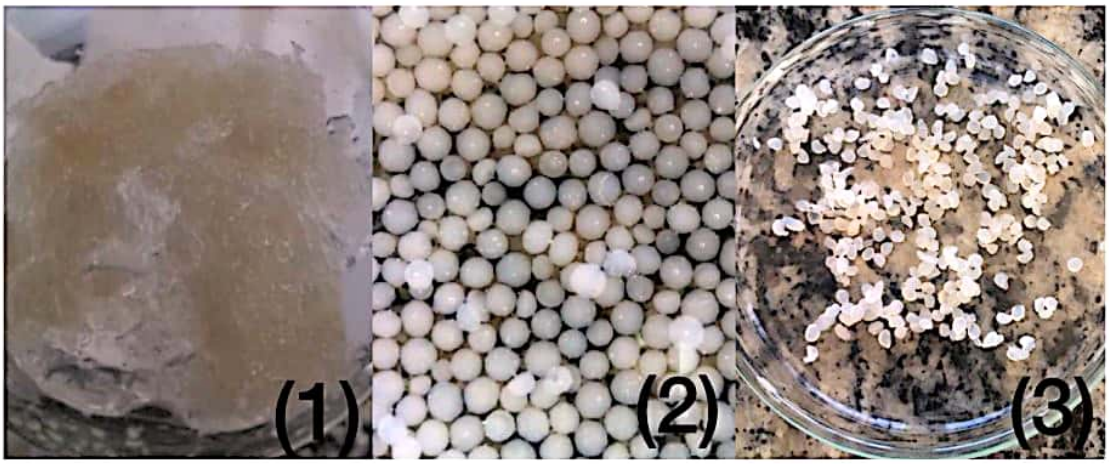
4.1.1 Avaliação da forma de suporte à base de quitosana

- Preparo quitosana em partículas (Figura 8): As esferas de quitosana foram preparadas seguindo metodologia proposta por Rigo et al. (2012), com modificações. 5,0 g de quitosana foi diluída em 200,0 mL de solução de ácido acético 5%, em agitação moderada por 1,5 h; após adicionou-se lentamente em 2 L de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, permanecendo durante 4 horas em agitação branda e 24 horas em repouso para decantar. Sucessivas lavagens foram realizadas com água destilada para a neutralização do suporte, e secagem em filtro (Whatman qualitativo n° 40) com bomba a vácuo para estocagem em geladeira.
- Preparo quitosana esferas 4 mm (Figura 8): As esferas de quitosana foram preparadas seguindo metodologia proposta por Duarte et al. (2017), com modificações. 0,2 g de quitosana foram solubilizadas em 10 mL de solução de ácido acético 0,35 M e submetidas à sonicação em banho ultrassom Quimis (40 °C) por 1 h e após gotejamento com uma seringa (5 mL) e agulha em solução de coagulação (hidróxido de sódio 1 M e etanol 26% v/v) à 10 °C, sob agitação (250 rpm) em um agitador magnético. As esferas permaneceram em repouso por 2 horas em geladeira (10 °C), seguida de lavagem com água destilada até sua neutralidade verificada com solução de fenolftaleína 1% e leitura em pHmetro para posterior estocagem em geladeira até seu uso.

Digitalizado com CamScanner

- Preparo quitosana esferas 2 mm (Figura 8): As esferas de quitosana foram preparadas seguindo metodologia proposta por Duarte et al. (2017), com modificações. 0,2 g de quitosana foram solubilizadas em 10 mL de solução de ácido acético 0,35 M e submetidas à sonicação em banho ultrassom Quimis (40 °C) por 1 h e após gotejamento com uma seringa e agulha em solução de coagulação (hidróxido de sódio 1 M e etanol 26% v/v) à 10 °C, sob agitação (250 rpm) em um agitador magnético. As esferas permaneceram em repouso por 2 horas em geladeira (10 °C), seguida de lavagem com água destilada até sua neutralidade e posterior secagem em filtro (Whatman qualitativo n° 40) com bomba a vácuo (1 h).

Figura 8 - Suportes à base de quitosana neutros e secos para aplicação na imobilização de enzimas.



(1) partículas de quitosana, (2) esferas de quitosana 4 mm, (3) esferas de quitosana 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

4.1.2 Influência do tempo e temperatura de ativação

Foram avaliadas duas metodologias propostas na literatura com modificações, de acordo com Klein et al. (2016), onde a ativação das esferas de quitosana 2 mm (selecionadas na primeira etapa) com genipina (CS-GEN) foi realizada pela adição de 500 µL de solução de genipina a 0,5% (p/v) (pH 7, fosfato de sódio 0,02 M) e reagiu durante 15 h nas temperaturas de 25 e 60 °C. Pela metodologia proposta por Flores et al. (2019), a ativação foi realizada pela adição de 0,5 mL de genipina à 0,5% (p/v) (pH 7,0 fosfato de sódio 0,02 M) reagindo por 1 h nas temperaturas de 25 e 60 °C em shaker sem agitição.

Digitalizado com CamScanner

4.1.3 Avaliação da concentração do ativador

O processo de ativação foi realizado em duas concentrações de soluções de genipina 0,5% em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 (KLEIN et al., 2016) e 1,5 % em tampão fosfato 0,02 M, pH 9,0 (FLORES et al., 2019). Para a avaliação da ativação foram utilizadas as esferas de 2 mm (0,08 g) imersas em solução de genipina (0,4 mL) em tubos de ensaio, tomando o cuidado para que todas as esferas permanecessem imersas na solução de genipina. O tempo de ativação utilizado foi de 1 hora à 60 °C em shaker sem agitação.

4.1.4 Avaliação da secagem após ativação

A avaliação da secagem após a ativação foi realizada nas esferas ativadas com a lavagem das mesmas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, e posteriormente secas em filtro (Whatmam qualitativo n° 40) em bomba a vácuo por 10 minutos.

4.1.5 Influência da carga enzimática oferecida ao suporte

Após a ativação, as esferas foram imobilizadas em 2 e 5 mL de solução enzimática com concentração de 18 ou 56 U/mL (SONG et al., 2012; FLORES et al., 2019) durante 8 h à 25 °C em shaker com agitação de 200 rpm.

4.2 PARÂMETROS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA

A ferramenta de planejamento experimental foi utilizada para otimizar os parâmetros de reação enzimática (quantidade de esferas e concentração de substrato) em relação às etapas de imobilização de β-galactosidase em esferas de quitosana ativadas com genipina pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios realizados em duplicatas. As variáveis independentes foram a quantidade de esferas (mg/mL) utilizadas no meio reacional (X1) e a concentração de substrato ONPG (mM) (X2) e as dependentes rendimento de imobilização (%) e a atividade enzimática (U/g). Os resultados das variáveis dependentes foram tratados aplicando a análise de variância (ANOVA) através

Digitalizado com CamScanner

do software Protimiza Experiment Design Software (http://experimental-design.protimiza.com.br).

A faixa pesquisada de quantidade de esferas e concentração do substrato foram definidos com base na literatura (SONG et al., 2013; KLEIN et al., 2016; FLORES et al., 2019) e utilizados no planejamento experimental de acordo com o apresentado na Tabela 1.

As esferas foram preparadas de acordo com o item 4.1.1 com 2 mm de espessura, com a concentração de 0,5% de genipina disponibilizada em 0,4 mL de solução o suficiente para que todas as esferas analisadas no DCCR permanecessem imersas, ressaltando a importância de avaliar o rendimento de imobilização das mesmas, visto que a concentração de ativador não foi alterada, somente a quantidades de esferas a serem ativadas em um volume e concentração fixa do ativador.

Tabela 1-Variáveis independentes com os respectivos níveis utilizados no planejamento experimental para imobilização de β-galactosidase em esferas de quitosana ativadas com genipina.

Variáveis	**Código**	**Níveis**				
		-1,41	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
Quantidade de esferas (mg/mL)	X1	0,63	1,2	2,6	4,0	4,57
Concentração de substrato ONPG (mM)	X2	2,95	5	10	15	17,05

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.3 PARÂMETROS DA ENZIMA IMOBILIZADA

A avaliação do preparo do suporte, carga enzimática oferecida, assim como da realização do planejamento experimental onde foram selecionadas a concentração de substrato resultaram em condições para obter uma enzima imobilizada e possibilitar a avaliação dos parâmetros como a temperatura e o pH ótimo de reação, a estabilidade térmica, constantes cinéticas, estabilidade operacional e estabilidade de estocagem da β-gal imobilizada em comparação a enzima livre.

Digitalizado com CamScanner

4.3.1 Temperatura e pH ótimo da medida da atividade da enzima livre e imobilizada

O pH ótimo da atividade da β-gal foi estudado pelo monitoramento da atividade enzimática conforme item 4.6 da enzima livre e imobilizada a 37 °C em diferentes valores de pH 4,8 e 5,8 tampão acetato de sódio 0,1 M e 6,4, 6,8, 7,0, 7,8 e 8,0 de tampão fosfato de sódio 0,1 M. A temperatura ótima foi determinada pela atividade enzimática (item 4.6), nas temperaturas de 7, 10 (utilizadas em processos na indústria de lácteos) 37, 42 (temperaturas ótimas da enzima comercial da Prozyn) 50 e 60 °C (estudos como os de KLEIN et al., 2016 e FLORES et al, 2019) com pH ótimo da enzima livre e da enzima imobilizada.

4.3.2 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada

O estudo da estabilidade térmica foi conduzido nas condições de pH ótimo indicado para cada forma de enzima. As enzimas foram adicionadas em tubos com 10 mL de tampão 0,1 M pH 6,8 para enzima livre e pH 7,0 para a enzima imobilizada, em banho maria digital (SolidStell) para a avaliação da estabilidade na temperatura de 37 °C. Para avaliar a estabilidade à 10 °C, os tubos com as enzimas foram incubados em BOD digital (Cienlab). As temperaturas investigadas compreendem a temperatura de refrigeração do leite e soro de leite, bem como a temperatura ótima indicada pelo fabricante da enzima (PROZYN) para processos concomitantes de hidrólise e fermentação.

A estabilidade foi avaliada medindo a atividade enzimática das enzimas (conforme item 4.6) por período de tempo até que a atividade relativa fosse menor que 50%.

4.3.3 Constantes cinéticas

Os parâmetros cinéticos Km e Vmax da enzima imobilizada foram determinados por regressão não linear usando concentrações crescentes de ONPG em solução (de 5, 15, 30 e 45 mM em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0). Os resultados das atividades enzimáticas desses experimentos foram considerados as velocidades de reação da enzima (V), que juntamente com as concentrações finais do ONPG [S] foram empregados para construir o gráfico de Lineweaver-Burk (Borzani et al., 2001). As equações das linhas de tendência, "Eq.1", apresentadas no gráfico foram então empregadas para estimar a constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima de reação (Vmax) dos imobilizados.

Digitalizado com CamScanner

$$1/V = Km/Vmax*1/[S] + 1/Vmax \quad (1)$$

4.3.4 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em ciclos descontínuos, incubando a quantidade de esferas otimizada no planejamento experimental (item 4.2) em 3 diferentes substratos:

- Meio sintético: 1 mL de uma solução de lactose tamponada 5% p/v (solução de lactose em tampão fosfato de 0,1 M, pH 7,0) e 9 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (Klein et al., 2016);
- Meio real: 1 mL de leite UHT e 9 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (WOLF et al., 2019);
- Meio sintético: 10 mM de ONPG dissolvidos em 20 mL de tampão 0,1 M, pH 7,0 (selecionado no DCCR) (FLORES et al., 2019).

Todo o ciclo foi realizado durante 300 min a 37 °C sob agitação de 150 rpm, retirando-se alíquotas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 minutos que foram analisadas enzimaticamente com kit Analisa para detecção de glicose (lactose e leite UHT), e lidas no espectrofotômetro à 505 nm. Após cada ciclo, a enzima imobilizada foi filtrada, lavada com tampão fosfato (0,02 M, pH 7,0) e reintroduzida em um novo meio reacional. A porcentagem de hidrólise da lactose após o primeiro ciclo foi definida como 100% (WOLF et al., 2018; FLORES et al., 2019). Essa determinação foi realizada em réplicas de reação e as análises em triplicatas.

$$\textit{Hidrólise de lactose: } \frac{Abs\ amostra}{Abs\ padrão} x\ 100 \quad (2)$$

Para o substrato ONPG o ciclo foi realizado durante 60 min a 37 ° C sob agitação de 150 rpm, retirando-se alíquotas nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60. A determinação da atividade foi realizada conforme o item 4.5.2, utilizando a curva padrão de ONP (Apêndice A).

Os resultados foram avaliados segundo análise estatística definida no item 4.6.

4.3.5 Estabilidade ao armazenamento

A avaliação da estabilidade ao armazenamento foi realizada analisando 4 formas diferentes de armazenamento: (1) esferas liofilizadas congeladas (LC) à -18 °C, (2)

Digitalizado com CamScanner

esferas liofilizadas armazenadas em geladeira (LG) à 10 °C, (3) esferas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 em geladeira (pH) à 10 °C e (4) esferas congeladas (C) à -18 °C. As esferas foram avaliadas no primeiro dia (24 horas) e a atividade foi mensurada conforme item 4.6, considerando a mesma 100%. Após foram avaliados os dias 7, 14, 21 e 30 de armazenamento.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE E DA ENZIMA IMOBILIZADA

O suporte, o suporte ativado com genipina e a enzima imobilizada na condição ótima foram caracterizados através das seguintes análises: Termogravimetria (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Microscopia de Varrredura Eletrônica (MEV), Perfil de Textura (TPA) e Cor.

As análises de TGA, DSC e MEV foram avaliados conforme:

a) Esferas secas (ES);

b) Esferas secas ativadas (ESA);

c) Esferas secas ativadas imobilizadas (ESI);

d) Esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC);

e) Esferas úmidas congeladas (EC);

f) Esferas úmidas congeladas ativadas (ECA);

g) Esferas úmidas congeladas ativadas e imobilizadas (ECI).

As análises de TPA e Cor foram avaliadas apenas nas amostras descritas anteriormente como a, b, c e d.

Essas diferenciações foram analisadas para observar a mudança de estrutura nas esferas após sua ativação com genipina e a imobilização com a β-gal. Foram avaliadas as esferas nas formas secas e úmidas no intuito de entender a modificação sofrida na estrutura durante a secagem (item 4.1.4).

4.4.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Desidratação e decomposição são os mecanismos de degradação térmica de polímeros que podem ser analisados usando a técnica TGA (Flores et al., 2019). A termogravimetria é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra, que pode ser perda ou ganho de massa, é determinada em função da temperatura

Digitalizado com CamScanner

ou em função do tempo, enquanto essa amostra é submetida a variações de temperatura (CANEVAROLO, 2007).

O TGA foi realizado em equipamento STA 449 F3 Jupiter (NETZSCH) alocado no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização da UFSC (LCP) , com uma taxa de aquecimento de 20 °C.min^{-1} com faixa de temperatura de 30 a 700 °C sob atmosfera de N_2 (10 mL.min^{-1}) (FLORES et al., 2019).

4.4.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de DSC foi realizada em um calorímetro modelo Jade-DSC (Perkin Elmer), na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. A taxa de aquecimento foi realizada com uma rampa de aquecimento e resfriamento de -40 à 400 °C uma taxa de aquecimento de 10 °C·min^{-1} sob um fluxo de nitrogênio gasoso de 40 mL·min^{-1}. (KLEIN et al., 2016).

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV permite observar informações sobre as características morfológicas das esferas de quitosana, como por exemplo, a visualização de fissuras, poros, áreas de superfície de contato, aspecto em várias amplitudes entre outros (BAPTISTIOLLI et al., 2014). As amostras de enzima imobilizada foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com as com modificações. As amostras foram recobertas com ouro em *sputter coater* (SCD 050, Baltech, Brasil). Foi utilizado um microscópio de varredura convencional com análise de raios-x (EDS): espectrometria por dispersão de energia (HITACHI TM3030). As amostras foram analisadas com ampliação de 25x, 30x, 60x e 80x, com feixe de potência 5 kV e 15 kV sendo emitida. O MEV foi realizado no USICON - Laboratório de Usinagem e Comando Numérico do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

4.4.4 Análise do Perfil de Textura e Cor Instrumental

A análise do perfil de textura (TPA) das esferas de quitosana secas (ES), esferas de quitosana secas ativadas com genipina (ESA) , esferas imobilizadas (ESI) e esferas

Digitalizado com CamScanner

imobilizadas congeladas (ESC) foi realizada em um em texturômetro (Brookfied, CT3 Texture Analizer) com probe cilíndrica de acrílico, de 25,4 mm de diâmetro, usando uma célula de carga de 50 kg. As amostras foram submetidas a dois testes consecutivos compressão do ciclo de 20% a uma velocidade constante de 2 $mm.s^{-1}$. A partir dos resultados da força, o parâmetro textural quantificado avaliado foi a dureza (ou firmeza), que é a força necessária para atingir uma determinada deformação do material (BELLÉ et al., 2018).

Para avaliação instrumental da cor foi utilizado o colorímetro digital modelo CR 300 (Minolta). A cor foi expressa em parâmetros do modelo tridimensional, L* (luminosidade, variando do branco ao negro), b* (cromaticidade, azul ao amarelo), para as amostras ES, ESA e ESI, o parâmetro a* (cromaticidade, vermelho ao verde) não foi avaliado devido as cores representativas das amostras. A análise foi feita no Laboratório de Qualidade dos Alimentos - Qualial, da UDESC.

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1 Enzima Livre

A atividade enzimática tanto da enzima livre quanto da imobilizada foi avaliada utilizando ONPG como substrato. Para mensurar a atividade da enzima livre utilizou-se 10 mL de tampão de fosfato de potássio 0,02 M a pH 7,0, ONPG 10 mM e 25 µL de β-gal, sendo a reação conduzida à 37 °C e 150 rpm durante 10 min em shaker. Para interromper a reação, 2 mL de carbonato de sódio (1M) foi adicionado à mistura reacional. A reação libera o 2-nitrofenol (ONP), que foi medido espectrofotometricamente em espectrofotômetro FEMTO Cirrus 80SA à 410 nm e calculado pela Equação 3. Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de ONP, apresentada no APÊNDICE A. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima catalisando a hidrólise de 1 mol de ONPG por minuto sob as condições de reação (SONG et al., 2013).

$$Atividade\ enzima\ livre\ (Al) = \frac{(ABSr - ABSb)\ x\ Vr\ x\ Fc}{tr\ x\ Venz} \qquad (3)$$

onde:

ABSr: absorbância lida no espectrofotômetro após reação com a enzima livre;

ABSb: absorbância do branco;

Digitalizado com CamScanner

Vr: Volume reacional;

Fc: fator de correção da curva de calibração de ONP;

tr: tempo de reação;

Venz: volume de enzima utilizada.

4.5.2 Enzima Imobilizada

A atividade da enzima imobilizada foi mensurada adicionando-se 40 esferas de quitosana (4,57 mg de suporte em base seca) a 20 mL de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 e 10 mM de ONPG, conduzida a 37 °C e 150 rpm, com coletas de 1 mL a cada 10 min, até o término da reação, interrompida com 0,2 mL de carbonato de sódio 1 M, realizando a cinética enzimática linearizando os pontos que representam a velocidade inicial de reação. A atividade dos derivados enzimáticos foi calculada pela Equação 4:

$$\textit{Atividade Enzima Imobilizada (At)} = \frac{(Slope - slopeb) x\ Fc\ x\ Vr\ x\ D}{Ms} \qquad (4)$$

onde:

Slope: coeficiente angular da curva de cinética enzimática;

Slopeb: coeficiente angular da curva de cinética enzimática do branco;

Fc: fator de correção da curva de calibração de ONP;

Vr: volume reacional;

D: diluição;

Ms: massa do suporte utilizado.

Os rendimentos das imobilizações foram calculados de acordo com Sheldon e Van Pelt (2013), conforme a Equação 5:

$$\textit{Rendimento da imobilização} = \frac{Atividade\ imobilizada\ (U/mL)}{Atividade\ inicial\ (U/mL)} \times 100 \qquad (5)$$

Atividade imobilizada é a diferença entre a atividade oferecida ao suporte e à atividade determinada no sobrenadante e na água de lavagem das esferas imobilizadas. Atividade inicial é a atividade da enzima oferecida ao suporte.

Digitalizado com CamScanner

4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As formulações do estudo foram elaboradas em réplica e as análises conduzidas em triplicata de experimentos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com significância à 5% através Software R, considerando um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Digitalizado com CamScanner

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no estudo da imobilização da enzima β-Gal em suporte de quitosana ativada com genipina e aplicação em meios sintéticos e leite UHT serão apresentados nessa sessão.

5.1 PREPARO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO

Nos itens 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4 e 5.1.5 serão apresentados os resultados das análises referentes ao preparo do suporte para a imobilização, avaliando a forma de preparo do suporte, concentração de ativador, tempo e temperatura de ativação, secagem pós ativação e a carga enzimática oferecida para imobilização.

5.1.1 Forma de preparo do suporte

Três formas de preparo de suporte foram avaliadas: (1) partículas, (2) esferas 4 mm e (3) esferas 2 mm, conforme Figura 8, e os resultados de atividade da β-gal e rendimento de imobilização são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de atividade enzimática e rendimento de imobilização para as três formas de suportes a base de quitosana avaliados.

Suporte	Atividade Enzimática (U/g)	Rendimento Imobilização (%)
Partículas	96,40±0,1[a]	48,2±0,23[c]
Esferas 4 mm	0,21±0,01[c]	72,11±0,15[b]
Esferas 2 mm	3,89±0,01[b]	84,39±0,25[a]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As esferas de 2 mm foram selecionadas como a forma do suporte de preparo do suporte de quitosana mais adequado para a imobilização por ligação covalente, visto que sua área superficial individual diminuiu, porém ocorreu aumento na área total devido a quantidade de esfera para contato com agentes ativadores e enzimas (KLEIN et al., 2012).

Digitalizado com CamScanner

A atividade enzimática apesar de inferior ao obtido no formato de partículas, apresentou maior rendimento de imobilização, o que indica haver mais enzima imobilizada.

Além disso, buscando verificar as vantagens frente à aplicação do biocatalisador, representada pelo teste de reciclos sucessivos, o formato de esfera pode ser separado do meio reacional com mais facilidade em relação às partículas. Contudo, alguns estudos apresentam o uso de partículas de quitosana para imobilização β-gal com atividade de 210 U/g de suporte seco (KLEIN et al., 2012).

Garcia-Galan e colaboradores (2011) salientam que existem pontos relevantes para se obter um biocatalisador imobilizado eficiente: resistência mecânica, simplicidade do protocolo de imobilização, ter a possibilidade de acoplar um sistema de purificação da enzima, avaliar o impacto da imobilização na atividade da enzima, garantir a estabilidade da enzima, evitando seu enrijecimento ou dissociação estrutural, garantir a sua seletividade e reduzir possíveis problemas de inibição de sua atividade. Neste sentido, considerando atender alguns dos critérios mencionados nesta etapa preliminar do estudo de imobilização da β-gal em quitosana ativada em genipina, as esferas de 2mm foram selecionadas para etapas posteriores, especialmente considerando estudos recentes conduzidos com este formato de preparo da quitosana (BELLÉ et al., 2018; FLORES et al., 2019).

5.1.2 Influência do tempo e temperatura de ativação

A polimerização interna da genipina depende diretamente de fatores como pH, concentração de genipina, tempo de ativação e temperatura que leva a formar uma matriz espacial para permitir a ligação enzimática no suporte, por isso faz-se necessário avaliar esses parâmetros. A Tabela 3 apresenta os valores encontrados quando se variou o tempo e a temperatura de ativação das esferas de 2 mm.

Tabela 3 - Influência do tempo e da temperatura da ativação com genipina nas esferas de quitosana de 2 mm, na atividade e rendimento da β-gal imobilizada.

Tempo (horas)	Temperatura (°C)	At (U/g)	RI (%)
15	25	0,22±0,01[c]	42,20±0,94[d]
	60	0,41±0,02[b]	54,75±0,14[c]
1	25	0,38±0,01[b]	71,93±0,13[b]
	60	3,89 < 0,01[a]	75,71±0,39[a]

Digitalizado com CamScanner

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A polimerização interna da genipina depende diretamente de fatores como pH, concentração de genipina, tempo de ativação e temperatura, que auxiliam a formar uma matriz espacial permitindo a ligação enzimática no suporte (WANG et al., 2011).

Observou-se na Tabela 3 que a reação de ativação em altas temperaturas (60 °C) foi mais eficiente do que em baixas temperaturas (25 °C), mostrando que a temperatura interfere no rendimento de imobilização, possivelmente devido à maior ativação e consequentemente ligação da enzima ao suporte. Flores et al. (2019) avaliaram a influência da temperatura na ativação de esferas de quitosana por genipina e encontraram valores de rendimento de 86,1 % para a temperatura de 60 °C para β-gal de *Aspergillus oryzae* específicas para pH ácidos. Klein et al. (2016) caracterizaram o suporte a base de quitosana ativada com genipina para imobilização da β-gal e obtiveram rendimento de 66% utilizando a temperatura de 25 °C na ativação e na imobilização da enzima.

O menor tempo de ativação mostrou-se mais eficaz para imobilização da β-gal de *Kluyveromyces lactis* para aplicação em leite. Esse fato pode ser explicado pela correlação inversa entre tempo e temperatura necessários para permitir a auto-polimerização interna da genipina-genipina e genipina-quitosana (MA et al.,2018) onde a alta temperatura e menor tempo são suficientes para que a reação ocorra; então, a melhor combinação para a ativação do suporte foi de 60 °C por 1 h, com base na atividade enzimática.

Maior tempo pode causar a despolimerização ou reorganização da matriz polimérica do suporte, diminuindo assim o rendimento de imobilização (WANG et al., 2011).

5.1.3 Avaliação da concentração do ativador

A concentração do agente ativador desempenha um papel muito importante no processo de imobilização enzimática, sendo responsável pelo número de grupos reativos necessários para ligar a enzima ao suporte (MIGNEAULT et al., 2004). Além disso, a genipina tem um custo elevado, por isso é crucial determinar os parâmetros de imobilização visando uma alta eficiência sem altos custos. Os resultados da avaliação da

Digitalizado com CamScanner

concentração de ativador nas esferas de quitosana para imobilização da β-gal estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Influência da ativação do suporte de quitosana com genipina nas concentrações de 0,5 e 1,5 mg/mL nas atividades enzimáticas (At) e no rendimento de imobilização (RI).

Concentração (mg/mL)	At (U/g)	RI (%)
0,5	3,91±0,02[a]	74,59±0,30[a]
1,5	3,52±0,08[b]	74,49±0,27[a]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Estudos como o de Cavello et al. (2014) relatam que quando a concentração de reticulador é muito alta, pode existir uma saturação de genipina, gerando polimerização interna entre genipina-genipina e genipina-quitosana, reduzindo os grupos disponíveis para ligar a enzima. Foi relatado que um excesso do agente de reticulação diminui a imobilização enzimática da β-galactosidase de *A. oryzae* em nanopartículas magnéticas de amino silano (KRIŽNIK et al., 2018) e em quitosana (FLORES et al., 2019).

Klein et al. (2016) estudaram a imobilização da enzima β-gal em suporte de quitosana ativado com genipina na concentração de 0,5 mg/mL e encontraram rendimento de 66%, sendo menores que os valores obtidos nesse estudo (74,59%), porém para β-gal de *A. oryzae*.

Como a genipina é um reagente de custo elevado, limitando seu uso em imobilizações de enzimas, foi selecionada a concentração de 0,5 mg/mL para prosseguir os estudos, visto que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) no rendimento.

5.1.4 Avaliação da secagem pós ativação

Na ativação das esferas de quitosana foi investigada a possibilidade de haver diferença significativa na utilização do método de secagem das mesmas, visto que as esferas permaneciam úmidas pós ativação, podendo existir grupos reativos livres que, segundo Klein et al. (2016), poderiam realizar ligações com as enzimas na etapa subsequente (imobilização), diminuindo assim o rendimento da imobilização. Conforme pode-se observar na Tabela 5, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) na atividade

Digitalizado com CamScanner

da enzima imobilizada ao realizar a secagem após imobilização. Em vista disso, a etapa de secagem foi excluída do processo de preparo das esferas de quitosana ativadas com genipina, utilizando-as úmidas.

Tabela 5 - Atividade enzimática (At) e rendimento de imobilização (RI) na avaliação da secagem das esferas ativadas

Esferas ativadas	At (U/g)	RI (%)
Secas	3,89±0,01[a]	74,59±0,30[a]
Úmidas	3,87±0,03[a]	68,14±0,35[b]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Alguns trabalhos como o de Klein et al. (2016) relatam que pode haver ligações hidrofóbicas e iônicas entre a enzima e o substrato após a ativação, por isso realizam lavagens sucessivas com reagente como o etilenoglicol e o cloreto de sódio para eliminar tais ligações que possam ocorrer. Outros trabalhos como o de Bellé et al. (2018) apenas realizam as lavagens com tampão fosfato 0,02 N, pH 7,0, atingindo rendimentos de imobilização de 74%.

5.1.5 Influência da carga enzimática oferecida ao suporte

A análise da influência da carga enzimática oferecida para imobilização da β-gal na atividade e no rendimento de imobilização, apresentados na Tabela 6, mostram que a maior carga resultou nos maiores valores de atividade e rendimento em relação à menor carga oferecida ao suporte, havendo assim uma diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre elas.

Tabela 6 - Influência da carga enzimática oferecida ao suporte de quitosana ativada com genipina, na atividade (At) e no rendimento de imobilização (RI).

Carga Enzimática (U/mL)	At (U/g)	RI (%)
18	0,35±0,01[b]	56,45±0,35[b]
56	3,89±0,01[a]	75,71±0,39[a]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Digitalizado com CamScanner

A quantidade de proteína que pode ser adsorvida em uma quantidade específica de suporte e a porção funcionalizada tem um grande impacto na enzima e na eficiência de imobilização. Flores et al. (2019) avaliaram a concentração de 20 U/ mL e observaram um decréscimo na atividade e no rendimento de imobilização quando comparado a concentração de 10 U/mL, variando em mais de 10% essa diferença, podendo ter ocorrido uma possível saturação no suporte por conta da quantidade da proteína. Esse fato também pode ser atribuído provavelmente à agregação de proteínas na superfície das esferas de quitosana, diminuindo a eficiência da imobilização e consequentemente a recuperação da atividade, impedindo os sítios catalíticos de obterem o acesso ao substrato (Klein et al., 2012). Este comportamento não foi observado no presente estudo, sendo, portanto, a carga de 56 U/mL utilizada nas demais etapas.

5.2 PARÂMETROS DE REAÇÃO ENZIMÁTICA

Os resultados da seção anterior definiram pela atividade enzimática (At) e rendimento da imobilização (RI) a forma do suporte em esferas de 2 mm, o tempo de 1 h a 60 °C para genipina na concentração de 0,5 mg/mL polimerizar com a quitosana e posteriormente imobilizar a carga de 56 U/mL de β-gal.

Nesta seção, pelas mesmas variáveis de respostas (At e RI) anteriormente utilizadas, foram avaliadas as influências da concentração de substrato no meio reacional e a quantidade de esferas com β-gal imobilizada, considerando que segundo Flores et al. (2019) a quantidade de proteína que pode ser adsorvida em uma quantidade específica de suporte e a porção funcionalizada tem um grande impacto na eficiência de imobilização. Ainda considerando que as avaliações do preparo do suporte foram conduzidas com a quantidade de esferas fixas, o planejamento possibilitou avaliar o efeito da alteração desta durante o processo de ativação do suporte, processo de imobilização em relação ao rendimento da imobilização e consequentemente na atividade quantificada em meio reacional sintético, comportamento que pode ser observado pelos resultados da Tabela 7 e a análise do planejamento experimental realizado.

Digitalizado com CamScanner

Tabela 7 - Resultados do planejamento DCCR 2^2 para atividade enzimática e rendimento de imobilização da enzima β-gal em esferas de quitosana ativadas com genipina. Variáveis independentes: Quantidade de esferas (mg/mL) (X1) e Concentração de substrato ONPG (mM) (X2), com valores codificados e reais. Variáveis dependentes: Atividade enzimática (At) e Rendimento de Imobilização (RI).

Ensaios	Variáveis		Respostas	
	X1	X2	At (U/g)	RI (%)
1	-1 (1,2)	-1 (5)	1,44±0,03	80,16±0,11
2	+1 (4,0)	-1 (5)	0,87±0,03	79,85±0,57
3	-1 (1,2)	+1 (15)	1,30±0,14	82,54±0,23
4	+1 (4,0)	+1 (15)	1,73±0,06	81,20±0,28
5	-1,41 (0,63)	0 (10)	5,83±0,22	82,45±0,64
6	+1,41 (4,57)	0 (10)	24,97±0,19	84,13±0,14
7	0 (2,6)	-1,41 (2,95)	0,67±0,01	78,63±0,46
8	0 (2,6)	+1,41 (17,05)	2,66±0,04	77,78±0,43
9	0 (2,6)	0 (10)	63,18±0,25	58,98±0,14
10	0 (2,6)	0 (10)	58,53±0,45	60,68±0,28
11	0 (2,6)	0(10)	66,51±0,24	60,68±0,71

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As atividades enzimáticas variaram de 0,67±0,01 a 66,51±0,24 U/g e o rendimento de imobilização de 58,98±0,14 a 84,13±0,14 %, indicando uma variabilidade expressiva quando a quantidade de esferas e concentração de substratos foram alteradas.

Flores et al. (2019), ao estudarem os parâmetros de imobilização da enzima β-gal em suporte à base de quitosana ativada com genipina utilizaram 2 mg/mL de esferas e 15 mM de substrato, obtendo rendimentos de imobilização de 86,1%. Bellé et al. (2018) utilizaram 0,5 mg/mL de suporte e 10 mM de substrato, resultando em 74% de RI.

A validação dos modelos foi realizada pela análise do teste de Fischer (Teste F), considerando os graus de liberdade da regressão e dos resíduos. A partir dos resultados de aplicação da análise de variância (ANOVA) apresentados na Tabela 8, concluiu-se que os modelos podem ser utilizados para predizer as atividades enzimáticas e rendimento de imobilização da β-gal em suporte a base de quitosana ativada com genipina, uma vez que

Digitalizado com CamScanner

os valores de Fcal foram maiores que Ftab, assim como, ressaltar que a regressão foi altamente significativa, pois Fcal/Ftab foi 20, 87 para a avaliação da atividade enzimática e de 105,43 para a avaliação do rendimento de imobilização. Portanto, os dados experimentais são bem representados pelos modelos ajustados, podendo ser empregados para fins preditivos dentro do domínio dos fatores estudados.

Tabela 8 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para os modelos de regressão utilizados para explicar as atividades enzimáticas e rendimento de imobilização da enzima β-gal em suporte a base de quitosana ativada com genipina.

	Fonte de Variação	**Graus de Liberdade (GL)**	**$F_{calculado}$**	**$F_{tabelado}$**	**$R_{regressão}$**
At (U/g)	Regressão	2	93,1	4,46	95,88
	Resíduos	8			
	Total	10			
RI (%)	Regressão	2	470,2	4,46	99,16
	Resíduos	8			
	Total	10			

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os coeficientes de determinação obtidos foram de 95,88 para At e 99,16 para o RI. Pelo coeficiente determinação (R^2) pode ser definido a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto, oferecendo uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os resultados do planejamento experimental foram analisados considerando valor de $p<0,05$ para variáveis significativas no processo de dosagem de atividade considerando a concentração de substrato e a quantidade de esferas, verificando desta forma o rendimento da imobilização devido ao processo de imobilização. A concentração de substrato e a quantidade de esferas influenciaram os parâmetros avaliados, sendo apresentados os modelos previstos pelos quais são estimadas as atividades enzimáticas - At (Equação 5) e rendimentos de imobilização - RI (Equação 6) da β-gal para suporte a base de quitosana em função das variáveis codificadas e significativas:

$$At\ (U/g) = 60,11 + 11,64\ x_1^2 + 9,09\ x_2^2 \qquad (5)$$

Digitalizado com CamScanner

$$RI\ (\%) = 62{,}74 - 25{,}47\ x_1^2 - 32{,}34\ x_2^2 \quad (6)$$

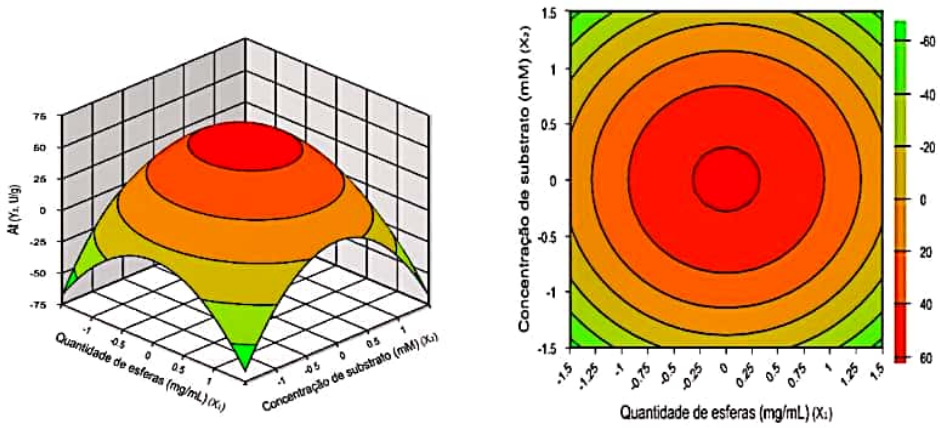
onde:

x1: quantidade de esferas (mg/mL);

x2: concentração de substrato (mM).

Após a validação dos modelos foram geradas as superfícies de resposta e curva de contorno para as atividades enzimáticas (Figura 9) e rendimento de imobilização (Figura 10) da β-gal em suporte de quitosana ativada com genipina.

Figura 9 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para as atividades enzimáticas (U/g) da enzima imobilizada β-galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina em função da quantidade de esferas (mg/mL) e da concentração de substrato (mM).

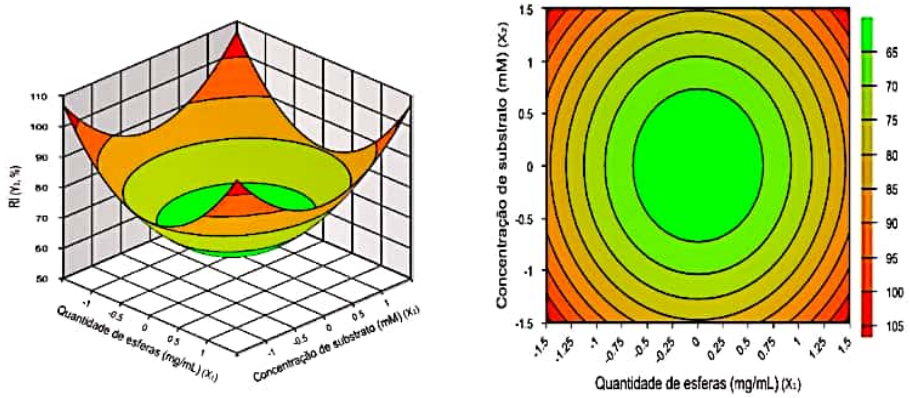


Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

As respostas aparecem no eixo Y como atividade enzimática (At) (U/g) na Figura 9 e rendimento de imobilização (RI) (%) na Figura 10 em função das condições operacionais: quantidade de esferas mg/mL (X1) versus concentração de substrato (X2). Os tons saturados de coloração mais intensa são as regiões onde foram obtidas as maiores atividades enzimáticas e rendimentos de imobilização. Verificou-se que as condições experimentais ótimas para a At foram no ponto central do planejamento experimental (X1=2,6 mg/mL e X2=10 mM) para a RI os pontos axiais (X1 =4,57 mg/mL e X2 = 10 mM) mostraram-se mais satisfatórios.

Digitalizado com CamScanner

Figura 10 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para rendimento de imobilização (%) da enzima β-galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina em função da quantidade de esferas (mg/mL) e da concentração de substrato (mM).



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O termo quadrático negativo é um indicativo de existência de um ponto máximo o qual está ilustrado pela parábola com concavidade voltada para baixo (Figura 10). Assim, pode-se concluir que as condições experimentais extremas de quantidade de esferas e de substrato, foram mais eficientes que o ponto central (X1=2,6 mg/mL e X2=10 mM), aumentando o RI.

Para a avaliação do RI, a quantidade de esferas (X1) e a concentração de substrato (X2) foram significativas, conforme pode ser observada na Equação 6. A maior quantidade de esferas utilizadas (ensaio 6, Tabela 7), resultou em o maior rendimento de imobilização e uma atividade enzimática considerável. Como a concentração de ativador não foi alterada nos ensaios, utilizando o mesmo volume independente da maior ou menor quantidade de esferas avaliada, conclui-se que 4,57 mg/mL de esferas possibilitou maiores interfaces de ligação, aumentando a área total para contato com agentes ativadores e enzimas (KLEIN et al., 2012) e consequentemente um maior RI quando comparadas a menores quantidades de esferas utilizadas. Além disso, a quantidade de esferas (4,57 mg/mL) foi satisfatória para à distribuição da enzima dentro dos macroporos de maneira uniforme e disponibilizando acesso ao sítio ativo da mesma, observado pela At (24, 97 U/g).

No estudo da At, as duas variáveis estudadas também influenciaram ($p \leq 0,05$), no entanto a melhor condição encontrada foi no ponto central com 2,6 mg/mL de esferas e 10 mM de substrato (ensaio 9, 10 e 11 Tabela 7). Apesar da maior atividade apresentada nesse ensaio, obteve-se os menores rendimentos de imobilização (60,68%) quando

Digitalizado com CamScanner

comparado ao ensaio 6 (84,13%), e isso pode ser devido a menor área oferecida para fixação de enzimas. Estudos realizados por Klein et al. (2012) indicaram que as enzimas imobilizadas podem sofrer uma fixação aleatória de proteínas na superfície das partículas, podendo mudar a conformação da enzima. Outra possível explicação é a limitação difusional na enzima imobilizada, e a possibilidade de ligação não ser forte o suficiente para conseguir prender a enzima ao suporte de imobilização, fazendo com que o RI caia (Gennari et al., 2018). Relacionando com os reciclos operacionais que a enzima imobilizada possibilita, é importante ter um RI alto, visto que a fixação de enzimas ao suporte é avaliada com o rendimento, e, portanto, quanto mais enzima no suporte, desde que ativa e disponível, maior possibilidade de reuso das mesmas em ciclos contínuos.

Desta forma, considerando os resultados obtidos no planejamento experimental com rendimento de imobilização máxima (84,13%) e uma atividade enzimática satisfatória (24,97 U/g) para a β-gal imobilizada em suporte de quitosana ativada com genipina, a variável quantidade de esferas de 4,57 mg/mL (ponto axial +1,41) e a concentração de substrato de 10 mM (ponto central 0) apresentaram os melhores resultados por isso, o ensaio 6 do planejamento foi selecionado para prosseguir com os experimentos.

5.3 PARÂMETROS DA ENZIMA IMOBILIZADA

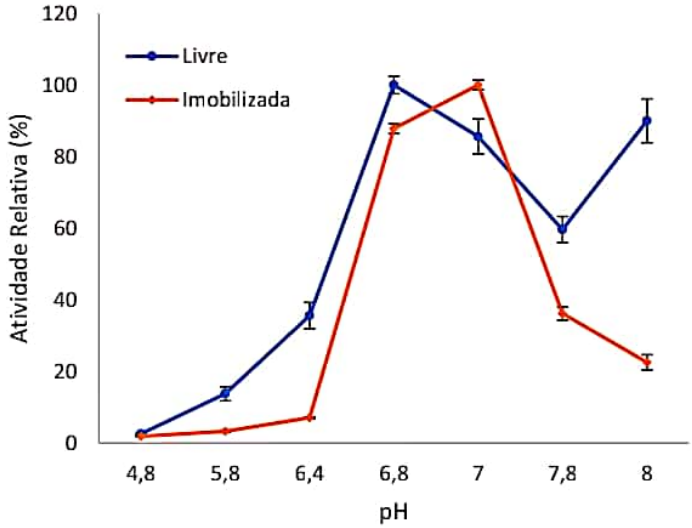
Os parâmetros da enzima imobilizada avaliados foram: pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica comparada à enzima livre; constantes cinéticas; estabilidade operacional e estabilidade de armazenamento. As análises serão descritas nos itens a seguir.

5.3.1 Temperatura e pH ótimo da enzima livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade relativa da β-gal livre e imobilizada foi avaliado na faixa de 4,8 a 8,0, conforme Figura 11. O pH exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas e por isso é importante avaliar em que condições e pH a β-gal pode hidrolisar, buscando estabelecer informações para aplicações em situações reais na indústria alimentícia (SANTOS et al., 2016).

Digitalizado com CamScanner

Figura 11 - Efeito do pH na atividade relativa da enzima livre e enzima imobilizada em quitosana ativada com genipina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em meios mais ácidos as atividades catalíticas das enzimas tanto na forma livre quanto na forma imobilizada foram reduzidas. O pH ótimo para a enzima livre foi de 6,8 e para a imobilizada de 7,0. Conforme especificação da enzima (Prozyn Lactase), a mesma tem pH ótimo de reação de 6,8, condizente com o que foi encontrado no estudo, considerando que a mesma é indicada para aplicação em leite e produtos lácteos com valores de pH próximos a neutralidade.

Para a forma imobilizada o pH 7,0 foi o que obteve a melhor atividade catalítica, deslocando a faixa de atuação para valores de pH mais alcalinos quando comparada a enzima livre. Isso se deve possivelmente às interações que ocorrem na imobilização entre a quitosana e a genipina e entre o suporte ativado com a própria enzima. A imobilização pode causar alterações nas condições de atuação dos biocatalisadores quando comparados em sua forma livre, pois as cargas livres positivas influenciam nas alterações do pH ótimo observadas após a imobilização (FLORES et al., 2019).

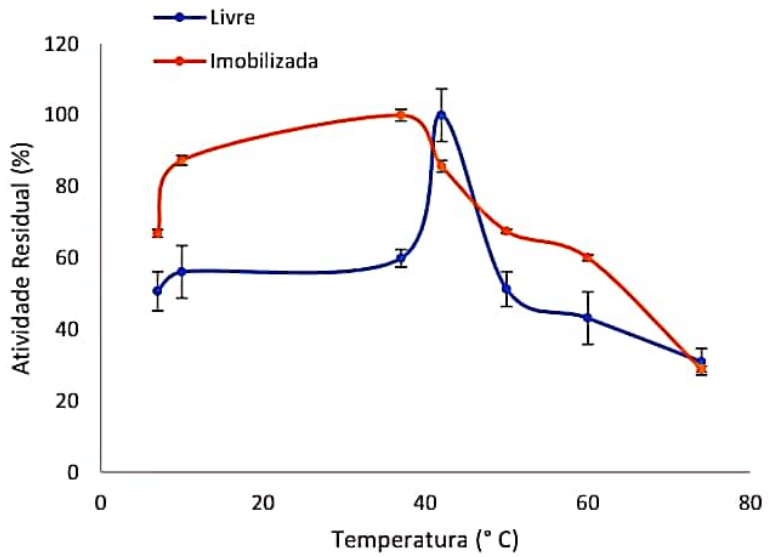
De acordo com Klein et al. (2016), os suportes carregados deslocam a atividade da enzima/perfil de pH em direção a pHs mais baixos quando a concentração de íons hidroxila na vizinhança imediata da superfície de suporte é maior do que na solução, atraída pelas cargas livres positivas (que é o caso da quitosana) ou para valores mais altos de pH quando ocorre o contrário.

Digitalizado com CamScanner

Gennari et al. (2018) estudaram a imobilização da β-gal de *A. oryzae* em colágeno e observaram o comportamento de deslocamento de pH ótimo da enzima livre (5,0) e da enzima imobilizada (6,0), indicando que a imobilização pode alterar a conformação monomérica da enzima e consequentemente modificar pH e temperatura ótima de ação da mesma.

Para avaliar a temperatura ótima da enzima na forma livre e imobilizada a faixa de 7 a 74 °C foi estudada, conforme pode-se observar na Figura 12.

Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade residual da enzima β-gal na forma livre e imobilizada em suporte de quitosana ativado com genipina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A temperatura ótima de atividade da enzima livre foi de 42 °C enquanto da enzima imobilizada foi de 37 °C. Essas temperaturas estão na faixa de temperatura ótima da própria ficha técnica da enzima β-Gal de *Kluyveromyces lactis* (PROZYN). Pode-se observar que a enzima imobilizada tem maior amplitude de temperatura ótima em relação à enzima livre, sendo as maiores observadas em 10, 37 e 42 °C. Na temperatura de 10 °C, utilizada em processos de hidrólise catalisadas na indústria de lácteos (RENTSCHLER et al., 2015), a atividade residual foi de 87,3%, resultado promissor em relação à aplicação nesse setor industrial.

A maior tolerância térmica da β-gal imobilizada reflete na sua estabilidade em comparação à enzima livre. Bellé et al. (2018) encontraram valores de temperatura de 40

Digitalizado com CamScanner

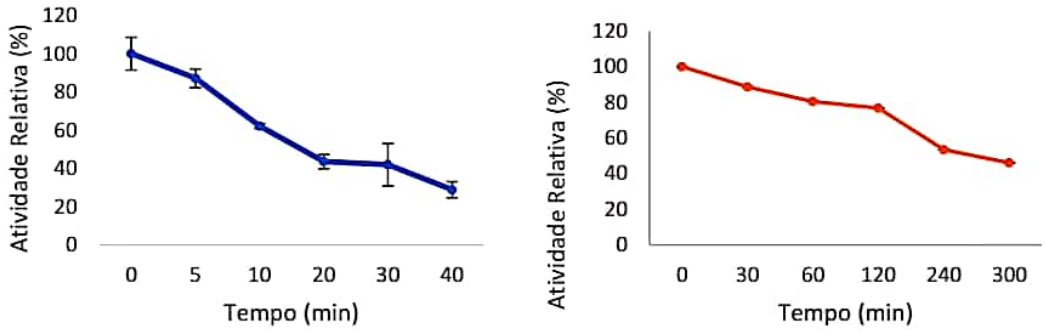
°C para as enzimas imobilizadas e livres de β-Gal de *Kluyveromyces lactis* utilizando essas temperaturas para avaliar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.

5.3.2 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada

As reações enzimáticas e as velocidades dessas reações são dependentes da temperatura. No entanto, pode ocorrer inibição da atividade enzimática devido ao processo de desnaturação em determinadas temperaturas que precisam ser determinadas muitas vezes experimentalmente (WOLF et al., 2018).

Processos industriais demandam estabilidade das enzimas utilizadas, visto que são utilizadas condições variadas para diferentes produtos, pensando nisso, verificou-se a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada nas temperaturas de 10 e 37 °C, os valores encontrados estão dispostos nas Figuras 13 para a temperatura de 10 °C e 14 para 37 °C.

Figura 13 - Estabilidade térmica à 10 °C da enzima livre (a) e enzima imobilizada em esferas de quitosana ativada com genipina (b).



(a) (b)

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

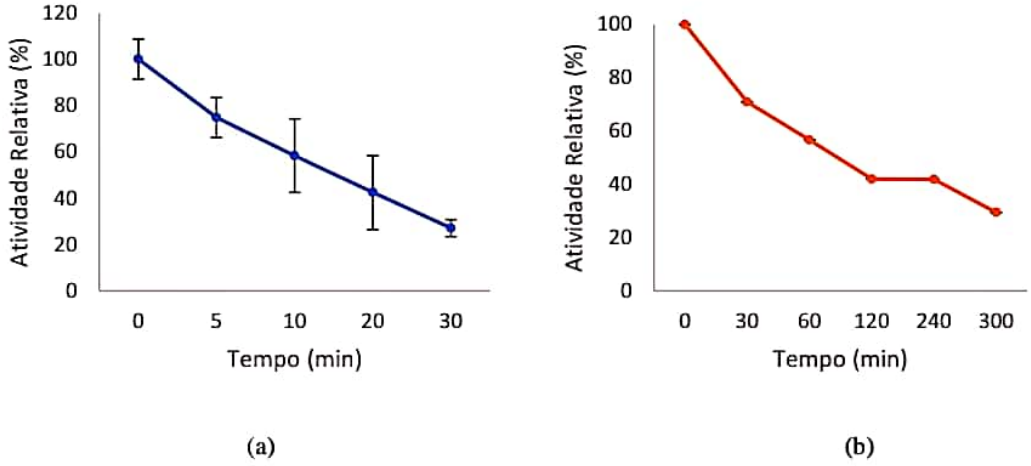
Observou-se que a enzima imobilizada apresenta maior estabilidade térmica quando comparada à enzima livre, indicando que a imobilização em esferas de quitosana ativadas com genipina teve um efeito positivo sobre a estabilidade térmica da β-galactosidase sendo capaz de proteger a conformação ativa da enzima contra danos por troca de calor. A enzima imobilizada manteve mais de 40% da sua atividade inicial após 300 min de incubação à 10 °C, enquanto a enzima livre nos 40 min já apresentava uma atividade residual menor que 30% da atividade inicial.

Digitalizado com CamScanner

Klein et al. (2016) relataram maior estabilidade e uma estrutura mais rígida da β-gal após sua imobilização em partículas de quitosana ativadas com genipina, devido à formação de ligações covalentes multiponto entre a enzima e seu suporte de imobilização.

Alguns estudos relataram que o confinamento molecular, capaz de restringir o movimento, reduz a possibilidade de desativação enzimática, aumentando sua estabilidade térmica (KLEIN et al., 2012; KLEIN et al., 2016). Isso pode ter ocorrido no presente estudo, visto que a imobilização possibilitou uma melhor estabilidade térmica. Pode-se verificar, então, que a imobilização em esferas de quitosana ativadas com genipina criou uma estrutura mais rígida da enzima e permitiu que a mesma pudesse se manter por um período mais longo sob baixas temperaturas (10 °C).

Figura 14 - Estabilidade térmica à 37 °C da enzima livre (a) e da enzima imobilizada em esferas de quitosana ativada com genipina (b).



(a) (b)

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A estabilidade térmica de um biocatalisador imobilizado é crucial para aplicações industriais. Pode depender do material de suporte, processo de imobilização ou da própria enzima, portanto a temperatura pode inativar a enzima, então necessariamente ela deve ser avaliada (Klein et al., 2013). A temperatura de 37 °C foi avaliada por ser a temperatura ótima da enzima imobilizada, e também da ficha de especificação da enzima β-Gal de *Kluyveromyces lactis* (PROZYN). Como pode-se observar nas Figuras 15 e 16, novamente a enzima imobilizada sobressaiu-se em relação à estabilidade térmica da enzima livre, mantendo 30% da sua atividade inicial após 300 minutos de incubação

Digitalizado com CamScanner

enquanto a enzima livre manteve apenas 27% após 30 min, tempo 10 vezes menor em relação ao derivado enzimático.

O aumento da estabilidade térmica da enzima imobilizada em comparação à enzima livre pode estar relacionado à proteção fornecida pela estrutura formada entre a enzima e o suporte de quitosana ativado com genipina (MONAJATI et al., 2018). Isso permite que a conformação do local catalítico permaneça intacta; além disso essa estabilidade pode vir da ligação covalente multiponto da enzima com o suporte.

Ao imobilizar a enzima β-gal em esferas de quitosana ativadas com genipina e avaliar a estabilidade térmica na presença de solução com lactose (40%, p/v), Klein et al. (2016) relataram que as enzimas imobilizadas apresentaram maior estabilidade térmica. Após 540 min de incubação a 60 °C, a enzima imobilizada apresentou 63% da atividade residual, o que significa que, em condições operacionais, a enzima é muito mais estável na forma imobilizada que na forma livre.

A importância da avaliação da estabilidade térmica para os processos de produção de alimentos zero lactose e/ou prebióticos como a lactulose se faz necessário visto que a indústria utiliza o binômio tempo/temperatura nos seus processos. Estudos como os de Song et al. (2013), que avaliaram a produção de lactulose e obtiveram como resultado que a temperatura de uso da β-gal imobilizada é de 40 °C com estabilidade por um período de 150 min, na reação de transgalactosilação, e isomerização com glicose isomerase na temperatura de 60 °C por período de 180 min, evidenciam que enzimas imobilizadas operam em temperaturas e tempos diferentes. Com isso, a estabilidade térmica se torna um diferencial das enzimas imobilizadas em comparação às livres, e possibilita uma melhor aplicabilidade para a indústria.

5.3.3 Constantes cinéticas

As constantes cinéticas foram avaliadas pela atividade enzimática da β-gal em diferentes concentrações de substrato (ONPG) apresentados na Tabela 9, sendo as equações de Lineweaver-Burk (Figura 15) empregadas para calcular o Km e o Vmáx.

As concentrações avaliadas (5, 15, 30 e 45 mM) foram estudadas por Flores et al. (2019) para a enzima β- gal de *A. oryzae* imobilizada em esferas de quitosana ativadas com genipina, no entanto essas concentrações não haviam sido consideradas para a enzima proveniente de *K. lactis*, interesse do presente estudo, por esse motivo apesar do planejamento experimental indicar 10 mM como a concentração ótima de substrato

Digitalizado com CamScanner

ONPG da enzima imobilizada, foram avaliadas outras concentrações para observar até que extremos de substratos, indicariam a afinidade e a velocidade máxima que o biocatalisador estudado poderia alcançar. Além disso, para avaliar as constantes cinéticas, que são determinadas através da regressão não linear, faz-se necessário a utilização de concentrações crescentes de substratos para avaliar o comportamento de Km e Vmáx, através de Michaelis-Menten (Wahba et al., 2018).

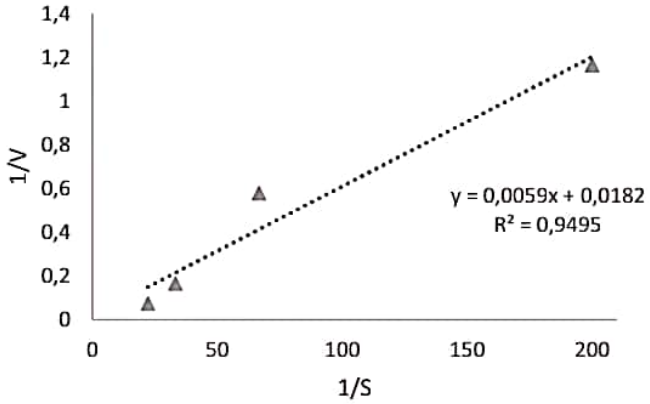
Tabela 9 - Resultados experimentais das atividades enzimáticas da β-gal.

Concentração do Substrato (mM)	Atividade Enzimática (U/g)
5	0,86±0,04[d]
15	1,78±0,05[c]
30	6,05±0,14[b]
45	13,83±0,12[a]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 15 - Linearização de Lineweaver-Burk.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os valores encontrados com a equação da reta através da linearização para a β-gal imobilizada foram de 54,95 μmol/min.g enzima para Vmax e 320 mM para Km. Vmax é a velocidade máxima na qual as enzimas convertem seus substratos em produtos, sendo fortemente afetada por quaisquer restrições que limitariam o acesso dos substratos às enzimas (Jamal et al., 2012) ou limitar a difusão dos produtos para longe das enzimas. O alto valor de Km (320 mM) indica que sua afinidade pelo substrato (ONPG) é baixa,

Digitalizado com CamScanner

assim como a capacidade de estabelecer-se o complexo enzima-substrato (Fatarella et al., 2014).

Durante o processo de imobilização, a β-gal pode formar ligações covalentes multipontos com seu suporte de imobilização através da reação com as partes da quitosana reticulada. Essas ligações fazem com que a enzima atinja uma estrutura rígida (Rodrigues et al., 2013), que podem ter sido menos capazes de estabelecer um complexo enzima-substrato (Wahba, 2018).

Recentemente, Flores et al. (2019) estudaram a influência dos parâmetros de reação de polimerização entre genipina e quitosana para imobilização enzimática da β-gal proveniente de *Aspergillus oryzae* e encontraram valores de 54,4 mM para Km e 20,35 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína para Vmax.

No trabalho de Wahba (2018), os resultados encontrados para a β-gal de *Aspergillus oryzae* imobilizada em quitosana foram de 11,9 μmol min.mg para Vmax e um Km de 187,9 mM. Na literatura, trabalhos com a β-gal de *Kluyveromyces lactis* apresentando os valores de Km e Vmáx são escassos, e apesar dos valores encontrados nesse estudo serem maiores dos que os para a β-gal de *Aspergillus*, as diferenças podem ter relação as especificidades de cada enzima. Outra possível explicação é a limitação difusional na enzima imobilizada, devido a menor acessibilidade do substrato ao local catalítico por prováveis alterações conformacionais após imobilização ou impedimentos estéricos (Gennari et al., 2018).

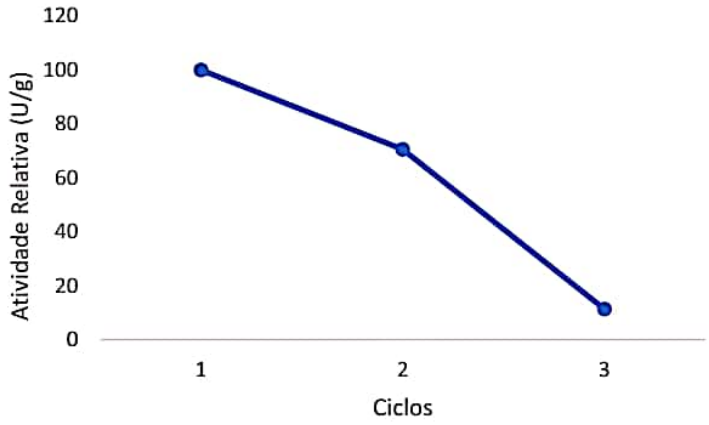
5.3.4 Estabilidade operacional

A capacidade de reutilização é uma vantagem desejável dos biocatalisadores imobilizados em comparação com enzimas livres, causando uma diminuição nos custos operacionais dos processos que envolvem enzimas (Flores et al., 2019).

A reutilização das enzimas imobilizadas foi realizada para avaliar a manutenção de sua atividade catalítica em reações sucessivos de hidrólise, com os substratos ONPG, lactose padrão 5% e leite UHT desnatado, sendo os resultados apresentados nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

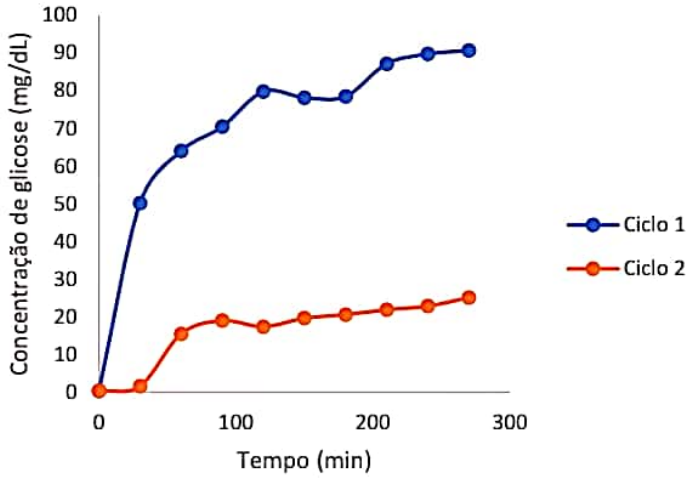
Digitalizado com CamScanner

Figura 16 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 60 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução de ONPG 10 mM à 37 °C sob agitação de 150 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 17 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 270 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução lactose a 5% (p / v) à 37 ° C sob agitação de 150 rpm.



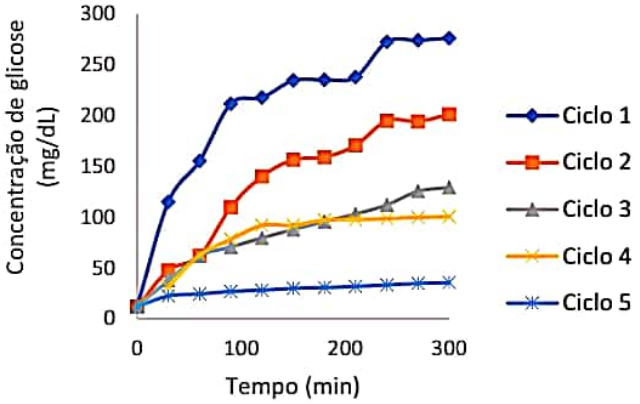
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A atividade relativa da β-galactosidase imobilizada durante a hidrólise do ONPG, da lactose padrão e lactose contida no leite UHT apresentaram diferentes comportamentos. Enquanto no substrato de ONPG apenas dois ciclos foram eficientes, na lactose padrão apenas uma utilização foi eficiente, já no leite UHT, forma obtidos até 4 ciclos de uso da enzima imobilizada. Pode-se observar que a enzima imobilizada manteve uma hidrólise superior da lactose contida em leite UHT possivelmente pela maior pressão osmótica proveniente da composição do leite, o dificultaria a liberação de

Digitalizado com CamScanner

enzima para o meio de hidrólise (WOLF et al., 2018). Ainda, os cofatores enzimáticos da enzima Mn+2 e K+ então presentes na composição mineral do leite bovino e podem ter contribuído. Cofatores enzimáticos tais como íons Na+, Mg2+ e Mn2+ contidos no leite UHT auxiliam na hidrólise da lactose pela β- galactosidase (PLOU et al., 2016).

Figura 18 - Ciclos de estabilidade operacional. Ciclos de 300 min realizado com 9 mg de suporte por mL de solução contendo leite UHT à 37 °C sob agitação de 150 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A β-gal imobilizada em esferas de quitosana ativadas com genipina poderia ser empregada por quatro ciclos sucessivos de produção de leite sem lactose/baixa lactose com bom desempenho. Vale ressaltar que a redução que ocorre na atividade observada de enzimas imobilizadas ao reutilizá-las pode ser distorção de seus sítios ativos após repetidas reações catalíticas (KISHORE; KAYASTHA, 2012).

Ao hidrolisarem leite UHT com β-gal imobilizada em quitosana e ativada com gluteraldeído, Wolf et al., 2018 obteviveram 5 reciclos sucessivos, com concentração de 90 mg/dL de glicose formada, em comparação a 4 reciclos e a formação de aproximadamente 275 mg/dL do presente estudo.

Para os substratos de reação ONPG e lactose pode ter ocorrido a perda da capacidade de catalisar a hidrolise pelo bloqueio do sítio ativo da enzima pelo próprio excesso de substrato, saturando o suporte e consequentemente dificultando que a enzima acessasse o substrato da reação seguinte. Além disso o substrato simples é indicativo de reação, utilizado geralmente para apenas um ciclo operacional.

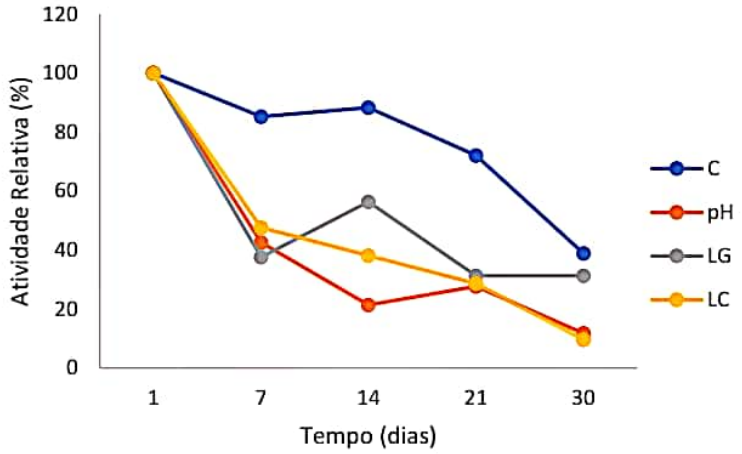
Digitalizado com CamScanner

Conforme observado também na avaliação das constantes cinéticas, o alto valor apresentado pelo Km (320 mM) indicou baixa afinidade pelo substrato ONPG, assim como a capacidade de estabelecer-se o complexo enzima-substrato (Fatarella et al., 2014), corroborando com os resultados da ausência da possibilidade de reciclos para esse meio.

5.3.5 Estabilidade ao armazenamento

Avaliar a estabilidade ao armazenamento das enzimas imobilizadas é importante para os processos industriais, visto que demanda o processo de imobilização quando comparado ao uso da enzima livre, que é encontrada comercialmente. A estabilidade de armazenamento do β-gal imobilizada em esferas de quitosana ativadas com genipina foram avaliadas por um período de 30 dias (Figura 19), em 4 diferentes processos de armazenagem: (1) esferas liofilizadas congeladas (LC) à -18 ºC, (2) esferas liofilizadas armazenadas em geladeira (LG) à 10 °C, (3) esferas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 em geladeira (pH) à 10 °C e (4) esferas congeladas (C) à -18 °C.

Figura 19 - Estabilidade de armazenamento das enzimas imobilizadas em diferentes métodos de conservação das esferas: congeladas, imersas em solução tampão, liofilizadas mantidas em geladeira e liofilizadas congeladas.



C (esferas congeladas), pH (esferas imersas em solução tampão), LG (esferas liofilizadas mantidas em geladeira), LC (esferas liofilizadas e congeladas).
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Analisando os resultados obtidos para a estabilidade ao armazenamento das enzimas imobilizadas, pode-se concluir que o método mais eficiente foi o do

Digitalizado com CamScanner

congelamento, visto que manteve uma atividade relativa maior que 70% em 21 dias de estocagem. Essa estabilidade de armazenamento pode estar relacionada à estrutura rígida da enzima imobilizada que foi adquirida após a formação de conexões covalentes multiponto entre a enzima e seu veículo de imobilização (RODRIGUES et al., 2013). A enzima com maior rigidez seria menos propensa ao desdobramento e desnaturação após armazenamento prolongado.

Possivelmente o congelamento manteve a estrutura da enzima imobilizada mais constante, sem perdas. O rearranjo da rede polimérica da quitosana durante o processo de congelamento pode ter contribuído para a formação e preservação de uma estrutura porosa (ZHANG et al., 2017).

O processo de liofilização remove a água ou solventes da estrutura e comprime os poros das matrizes poliméricas, e por vezes, pode gerar uma degradação da mesma. Com a degradação, pode haver a diminuição do número de sítios ativos, contribuindo também para a diminuição das atividades como observado (RISBUD et al., 2000). No caso da enzima imobilizada armazenada apenas em tampão pH 7,0 o que pode ter ocorrido é um excesso de água que pode ter lixiviado a enzima do suporte, diminuindo a atividade enzimática durante os dias de estocagem analisados.

Portanto, o método escolhido para armazenamento das esferas de quitosana imobilizadas com β-gal foi o de congelamento, visto que manteve atividade até 21 dias, possibilitando que a indústria utilize as enzimas imobilizadas por mais tempo, conservando-as para as próximas reações a serem biocatalisadas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Caracterizar as enzimas imobilizadas pode possibilitar predizer quais as condições extremas a qual elas podem suportar nos processos e na indústria. Os derivados enzimáticos foram caracterizados por TGA, MEV, DSC, TPA e cor, buscando entender melhor a natureza das estruturas formadas e as características obtidas na imobilização.

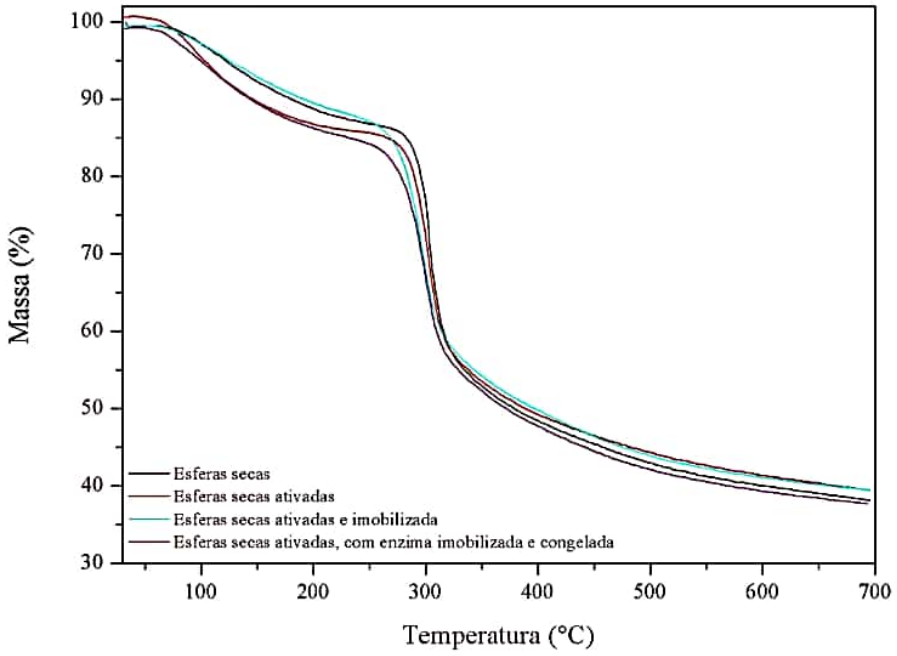
5.4.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

O TGA das amostras de esferas secas (ES), esferas secas ativadas (ESA), esferas secas ativadas imobilizadas (ESI); esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC) são apresentados na Figura 20 e o das esferas úmidas congeladas (EC); esferas

Digitalizado com CamScanner

úmidas congeladas ativadas (ECA); esferas úmidas congeladas ativadas e imobilizadas (ECI), são demonstrados na Figura 21.

Figura 20 - Análise de TGA nas esferas de quitosana utilizando o método de secagem: ES, ESA, ESI, ESC.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Conforme pode se observar na Figura 20, em um primeiro momento, houve uma degradação em cerca de 290 °C nas esferas secas e nas esferas ativadas com genipina, mostrando que as esferas ativadas possibilitaram uma estabilidade à degradação até esse pico de temperatura. Entre as amostras ES, ESA, ESI e ESC, foi observada mínima diferenciação, indicando que a ativação e a imobilização não afetaram a estrutura da quitosana, sendo assim esse biopolímero pode ser considerado adequado para o uso específico.

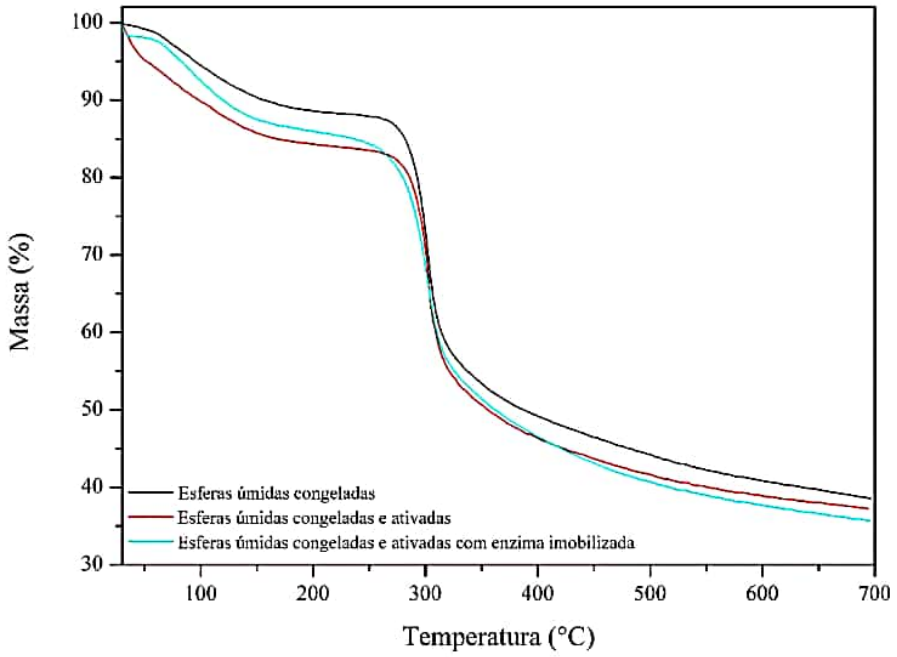
Flores et al. (2019) obtiveram a degradação da quitosana e da quitosana ativada em valores próximos a 290 °C, no entanto em quitosana ativada e imobilizada com a enzima β-gal observaram início de degradação em torno de 150 °C, apontando que o primeiro passo de degradação está relacionado à desidratação, especialmente para as amostras de quitosana-genipina-enzima, onde há uma despolimerização e decomposição

Digitalizado com CamScanner

pirolítica de cadeias de polissacarídeos com vaporização e eliminação de produtos voláteis.

As esferas secas mostraram-se estáveis à degradação pela temperatura, este comportamento era previsto considerando que as mesmas apresentaram uma boa estabilidade quando avaliadas as temperaturas de 10 e 37 °C (item 5.3.2). Essa proteção pode estar relacionada à estrutura formada entre a enzima e o suporte de quitosana ativado com genipina (MONAJATI et al., 2018), permitindo que a conformação do local catalítico permaneça intacta.

Figura 21 - Análise de TGA nas esferas de quitosana utilizando-as úmidas: EC, ECA e ECI.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Para a avaliação das esferas úmidas, pode-se observar que a degradação da quitosana (EC) e da quitosana ativada (ECA) foi em torno de 290 °C, no entanto, a perda na ativação foi maior do que no próprio suporte de quitosana. Para e quitosana ativada houve uma degradação em torno de 270 °C, evidenciando que pode ter ocorrido despolimerização e decomposição pirolítica de cadeias de polissacarídeos, de acordo com o relatado por FLORES et al. (2019).

Digitalizado com CamScanner

Esse fenômeno de enfraquecimento observado após o processo de ativação foi relatado em quitosana ativada com genipina, ácido tânico e glutaraldeído e revelaram que os derivados são termicamente estáveis até 220 °C (SINGH et al., 2017).

Considerando a avaliação de esferas secas e úmidas (Figuras 20 e 21, respectivamente), conclui-se que o processo de secagem foi eficiente pois demonstrou menos oscilações na degradação das esferas em seus estágios. A temperatura de 290 °C foi obtida como máxima para o processo de degradação das esferas.

As esferas secas apresentaram os melhores resultados possivelmente devido ao rearranjo da rede polimérica da quitosana que pode ter contribuído para a formação e preservação de uma estrutura porosa (ZHANG et al., 2017) enquanto as esferas úmidas provavelmente podem ter um excesso de água lixiviando a enzima do suporte, e possibilitando um menor estabilidade frente as variáveis como a temperatura, causando uma oscilação maior nas análises de TGA.

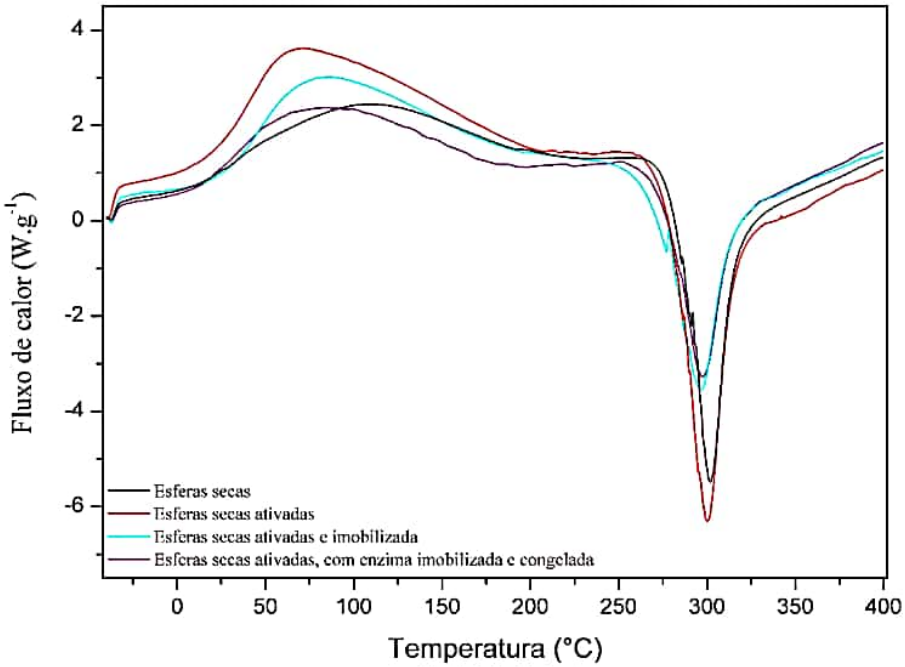
5.4.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A avaliação do DSC permitiu visualizar os picos endotérmicos e exotérmicos das esferas a base de quitosana. Na Figura 22 estão apresentadas as curvas de DSC para amostras de esferas secas (ES), esferas secas ativadas (ESA), esferas secas ativadas imobilizadas (ESI); esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC).

Os processos térmicos ocorreram entre 50 e 350 °C. Os picos exotérmicos com máximos entre 75 e 95 °C correspondem à decomposição térmica da quitosana. Os picos exotérmicos que ocorrem na faixa de 60 - 100 °C são devidas às reações de polimerização (BAPTISTIOLLI et al., 2014). Os picos endotérmicos ocorreram em temperaturas mais altas (275 a 300 °C) sendo atribuídos à energia necessária para dessorver a água. Espera-se que a interação das moléculas água-quitosana será mais forte nas partículas ativadas e maior temperaturas seriam necessárias para remover a água moléculas, no entanto para as amostras avaliadas esferas sem ativação e as ativadas apresentaram o pico endotérmico em temperaturas próximas, apontando que a ativação não interferiu na interação das moléculas de água com a quitosana.

Digitalizado com CamScanner

Figura 22 - Curvas de DSC para as amostras de amostras de esferas secas (ES), esferas secas ativadas (ESA), esferas secas ativadas imobilizadas (ESI); esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC).



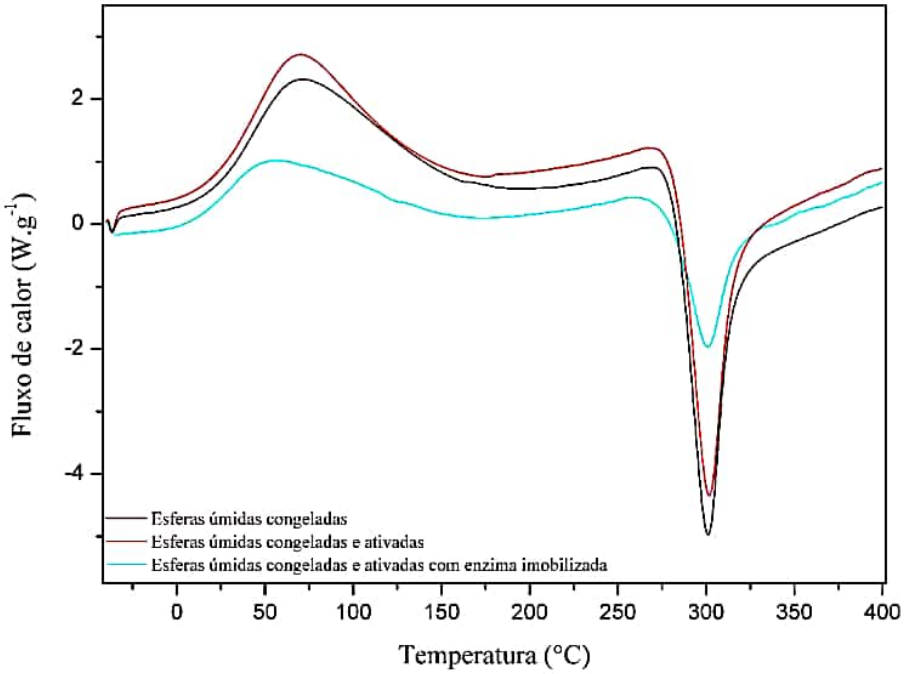
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Pode-se observar no Figura 22 que as esferas secas (ES), ativadas (ESA), imobilizadas (ESI) e congeladas (ESC), resultaram em comportamento semelhante pelas curvas apresentadas. Como exemplos de eventos endotérmicos que podem ocorrer em polímeros pode-se citar a fusão, a perda de massa da amostra por vaporização de água e produtos voláteis ou decomposição; já nos eventos exotérmicos podemos citar a cristalização, reações de polimerização, cura, oxidação, adsorção entre outros (BAPTISTIOLLI et al., 2014). A estabilidade térmica alcançada no DSC entre 275 e 300 °C corrobora com o que foi encontrado nas análises de TGA (item 5.4.1), visto que a estabilidade foi de 290 °C, estando os valores em concordância.

Na Figura 23 estão apresentadas as curvas de DSC para as esferas que foram preparadas úmidas e congeladas, na forma de esfera (EC), ativadas (ECA) e imobilizadas (ECI).

Digitalizado com CamScanner

Figura 23 - Curvas de DSC para as amostras de amostras de esferas úmidas congeladas (EC), esferas úmidas congeladas e ativadas (ECA) e esferas úmidas ativadas e imobilizadas (ECI).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os processos térmicos para as esferas úmidas ocorreram entre 30 a 325 °C. Os picos exotérmicos foram entre 50 a 70 °C. Para os picos endotérmicos entre 275 a 300 °C. Em comparação às esferas secas, os picos endotérmicos ocorreram antes e os endotérmicos foram próximos. Novamente, a estabilidade térmica alcançada no DSC para as esferas úmidas coincide com as análises de TGA das mesmas, sendo aproximadamente até 270 °C.

Klein et al. (2012), ao avaliarem macro e nanopartículas de quitosana ativadas com gluteraldeído encontraram picos endotérmicos em 220 °C, e uma estabilidade térmica de 170 °C, menor que a observada no presente estudo.

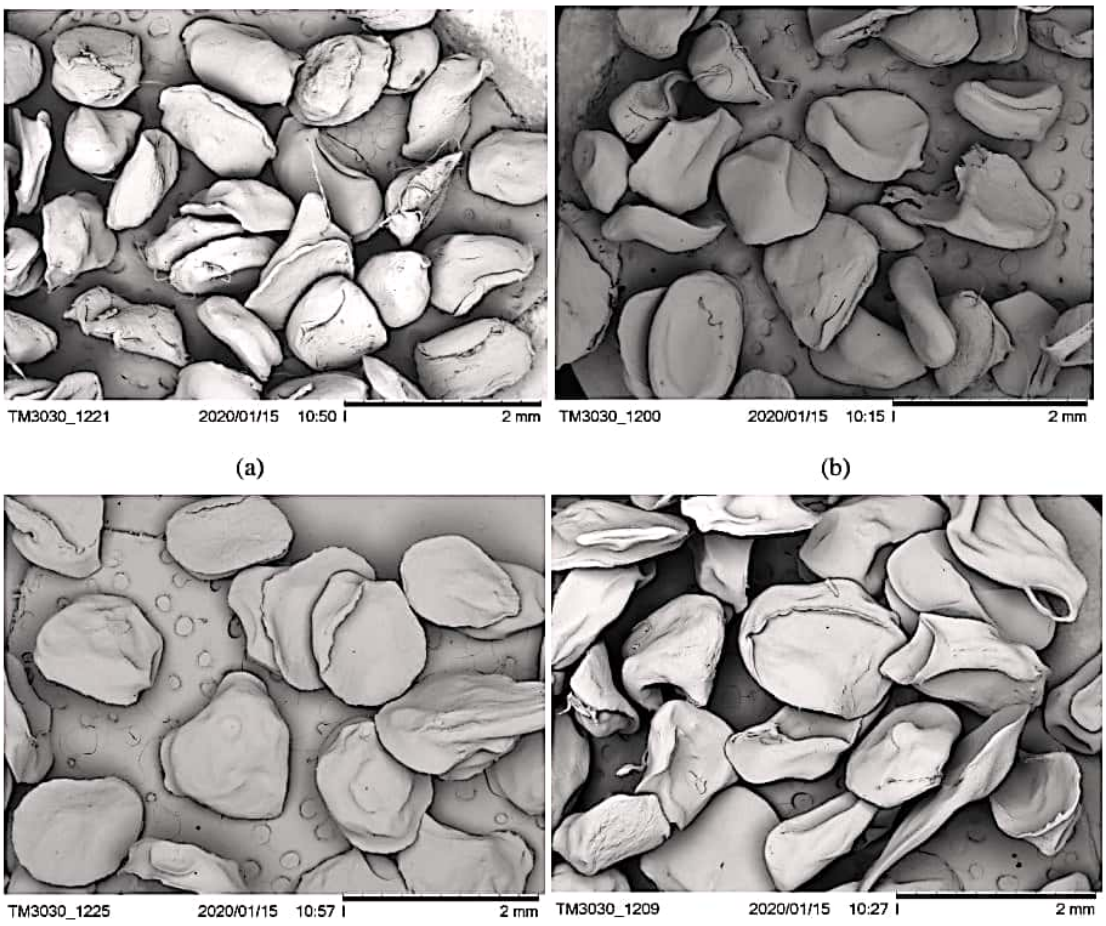
Conclui-se então que as esferas secas (Figura 22) frente às úmidas (Figura 23) possuem uma estabilidade melhor e com menos oscilações na degradação das esferas em seus estágios (esferas, ativação, imobilização).

Digitalizado com CamScanner

5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 24 apresenta o MEV das amostras de esferas secas (ES), esferas secas ativadas (ESA), esferas secas ativadas imobilizadas (ESI); esferas secas ativadas imobilizadas e congeladas (ESC).

Figura 24 - Análise de MEV para esferas de quitosana secas (a), esferas de quitosana secas ativadas (b), esferas de quitosana secas ativadas e imobilizadas (c) e imobilizadas congeladas (d) aproximadas 25 X.



(a) (b) (c) (d)

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Pode-se observar que as esferas mantêm a sua estrutura durante a ativação com genipina (ESA) e imobilização da enzima β- gal (ESI) e também durante o armazenamento por congelamento (ESC) em relação à esfera seca (ES). As amostras analisadas mostraram ter uma área de grande de superfície de contato, sem apresentar

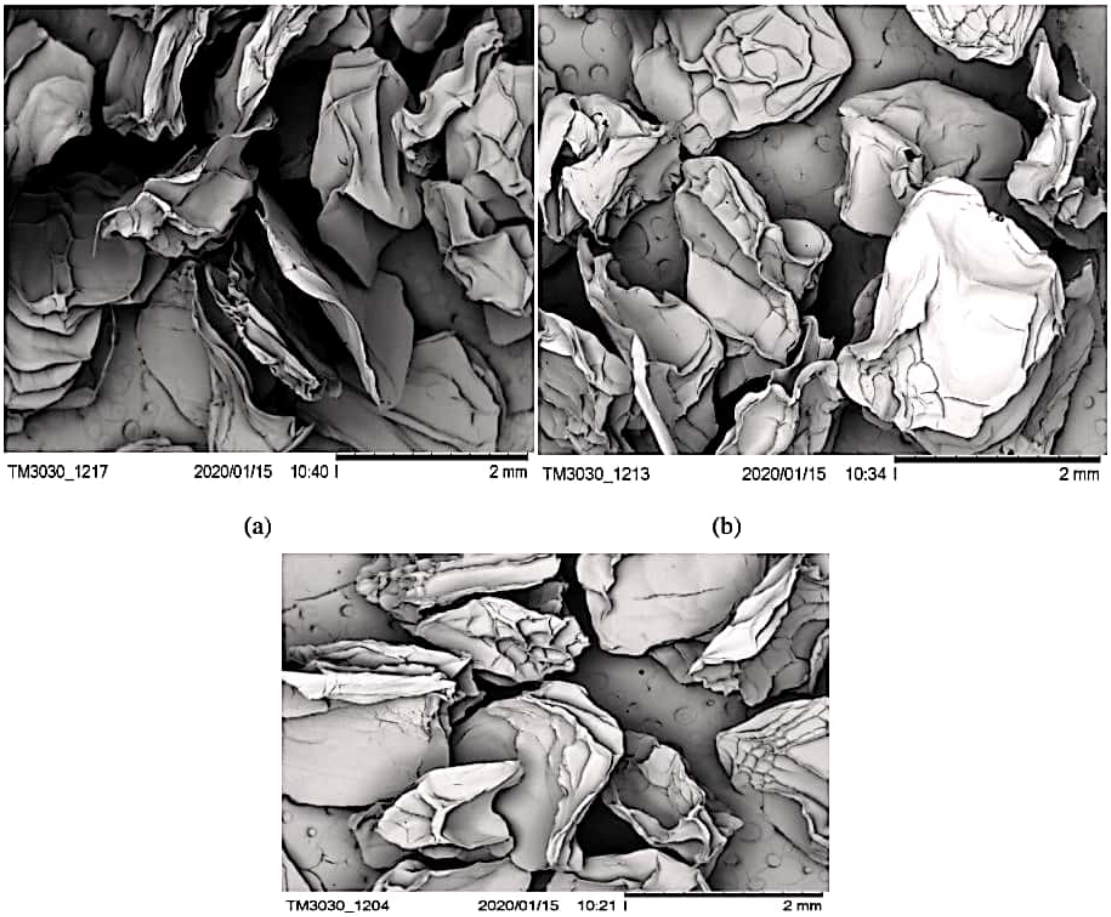
Digitalizado com CamScanner

rugosidades ou fissuras, possibilitando um maior contato para a ativação e a imobilização (Klein et al., 2012).

A ativação das esferas (ESA) pode mudar a maneira como a genipina reage e polimeriza, podendo gerar diferentes estruturas, cores e capacidades, como resistência mecânica (NERI-NUMA et al., 2017), que pode ser observada na Figura 24, onde a estrutura parece ser mais rígida quando ativada e após imobilização. No caso específico da quitosana, a adição de pequenas quantidades de genipina a alguns desses materiais pode aumentar significativamente a elasticidade do produto e sua resistência em meios ácidos (PENG et al., 2014).

Na Figura 25 são apresentados os MEV para as amostras de esferas úmidas congeladas (EC); esferas úmidas congeladas ativadas (ECA); esferas úmidas congeladas ativadas e imobilizadas (ECI).

Figura 25 - Análise de MEV para esferas de quitosana úmidas (a), esferas de quitosana úmidas ativadas (b), esferas de quitosana úmidas ativadas e imobilizadas (c).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Digitalizado com CamScanner

Observa-se na Figura 25 que as esferas úmidas (EC) apresentaram uma estrutura mais rugosa e com fissuras, após a ativação (ECA) a estrutura mudou. Em esferas úmidas após ativação, podem existir grupos reativos livres que, segundo Klein et al. (2016) poderiam realizar ligações com as enzimas na etapa subsequente (imobilização) e mudar a conformação da estrutura do imobilizado. Nota-se que a rugosidade aumentou após a ativação e a imobilização com a enzima β-gal (c).

As reações de ativação que visam modificações nas propriedades do biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular. O processo de ativação sofre influência tanto de algumas características físico-químicas da quitosana utilizada quanto das condições reacionais adotadas. Dessa forma, grau de desacetilação, massa relativa, temperatura e tempo reacional elevados, em geral, favorecem as reações e consequentemente promovem o aumento do grau de ativação. Com a elevação do grau, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (MUZZARELLI et al., 2009) e, portanto, quando as esferas foram utilizadas úmidas possivelmente houve menor elevação do grau de ativação, e assim houve as diferenças em relação as esferas secas.

Em comparação às esferas utilizadas secas, parece haver menos conformidade na estrutura das esferas úmidas, e também uma diminuição na área de contato. Isso pode ter afetado a imobilização da enzima e consequentemente seu rendimento conforme visto no item 5.1.4, Tabela 5. Por isso, o método de secagem das esferas foi mais eficaz que as utilizar úmidas, tornando-as mais homogêneas.

5.4.4 Análise do Perfil de Textura e Cor Instrumental

Avaliou-se também a textura após a ativação e imobilização das esferas de quitosana ativadas com genipina para verificar a possibilidade da mudança de estrutura com a ativação, visto que a genipina é capaz de gerar diferentes estruturas espaciais, cores e capacidades, como resistência mecânica (FLORES et al., 2019). Os resultados da análise de TPA estão expostos na Tabela 10.

Digitalizado com CamScanner

Tabela 10 - TPA das amostras de esferas de quitosana secas (ES), ativadas (ESA), imobilizadas (ESI) e congeladas (ESC) para o parâmetro de dureza.

Amostra	Dureza (N)
ES	0,30±0,04[c]
ESA	1,57±0,4[b]
ESI	2,53±0,38[a]
ESC	2,53±0,33[a]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As esferas de quitosana reticuladas com genipina apresentaram uma melhora em suas propriedades de dureza, quando analisadas as esferas de quitosana secas (ES) as mesmas forneceram os valores mais baixos (0,30 N) para o parâmetro avaliado. A presença do reticulador permite a formação de ligações covalentes que mantêm uma estrutura rígida nas esferas de quitosana (Bellé et al., 2018).

Bellé et al. (2018), em seus estudos encontraram valores de 0,55 N para a esfera de quitosana e 2,5 N para as esferas ativadas com 0,5% de genipina enquanto esferas ativadas com glutaraldeído obtiveram apenas 1 N. Assim, para obter melhor qualidade estrutural, a imobilização utilizando genipina como ativador em comparação com o glutaraldeído, apresentou melhores resultados, representando uma vantagem do ponto de vista econômico e ponto de vista toxicológico.

No caso específico da quitosana, a adição de pequenas quantidades de genipina a alguns desses materiais pode aumentar significativamente a elasticidade do produto e sua resistência em meios ácidos (PENG et al., 2014). Durante o processo de imobilização, a β-gal pode formar ligações covalentes multipontos com seu suporte de imobilização através da reação com as partes da quitosana reticulada. Essas ligações fazem com que a enzima atinja uma estrutura rígida (Rodrigues et al., 2013).

O congelamento parece não ter afetado a estrutura das esferas, sendo indicado como uma forma para armazenamento das esferas imobilizadas conforme item 5.3.5, visto que não houve diferença significativa entre ESI e ESC,

Além da propriedade de mudar a resistência mecânica a genipina pode formar cores distintas com o suporte, por isso, a cor das esferas foi também avaliada (Tabela 11 e Figura 26).

Digitalizado com CamScanner

Tabela 11 - Análise de cor das amostras de esferas de quitosana secas (ES), ativadas (ESA), imobilizadas (ESI).

Amostra	L*	b*
ES	46,98±0,22[a]	6,77±0,16[a]
ESA	35,22±1,21[b]	5,11±0,52[b]
ESI	29,73±0,84[c]	1,51±0,13[c]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 26 - Esferas de quitosana (ES), esferas de quitosana ativadas (ESA) e esferas de quitosana ativadas e imobilizadas com β-gal (ESI).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em relação ao parâmetro de cor L*, que relaciona as cores do branco ao negro, houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras. Percebe-se, pela Figura 26, que a enzima imobilizada possuiu uma coloração mais escura, o que condiz com o que é encontrado na literatura para a ativação com genipina (Klein et al., 2016).

A genipina pode produzir corantes, apesar de a mesma ser incolor ou amarelada quando isolada, quando reage com grupamentos amino (como o caso da reticulação com a quitosana) se torna um possível fonte de pigmento, que pode variar entre os tons violeta e o azul-escuro (Ono et al., 2007).

Para o parâmetro b* (amarelo ao azul) também houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras avaliadas, novamente o valor menor do b* é evidenciada na Figura 26 na amostra ESI, devido à formação do pigmento azul da reação ocorrida entre genipina e quitosana na ativação e imobilização da β-gal no suporte. A formação da coloração escura é um ponto positivo para imobilização, visto que evidencia que

Digitalizado com CamScanner

aconteceu a reação da genipina com grupamentos amino da quitosana e possibilitou uma reticulação do suporte para posterior imobilização de enzimas.

Digitalizado com CamScanner

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES

A imobilização da enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em suporte à base de quitosana ativada com genipina é uma estratégia viável para alternativas de biocatalisadores que possam ser utilizadas pela indústria alimentícia, com baixos teores de toxicidade, visto que a genipina tem menor teor tóxico que outros ativadores utilizados no processo de imobilização.

A genipina foi eficiente como agente ativador e reticulador do suporte de quitosana, propiciando aos imobilizados uma maior estabilidade frente a diferentes temperaturas e pHs e, ainda que usada em menor concentração, possibilitou uma maior resistência mecânica das esferas. Com isso, foi possível obter capacidade catalítica, estabilidade operacional e uma conformação diferenciada das esferas de quitosana ativas e imobilizadas.

A utilização do derivado imobilizado para o setor de lácteos tem viabilidade, visto que possibilita a hidrólise e a transgalatosilação da lactose, podendo ser utilizada em produtos zero lactose, prebióticos e funcionais, considerando os dados obtidos nesse estudo para o leite UHT. Além disso, a enzima imobilizada apresentou estabilidade térmica superior à enzima livre atuando em temperaturas de 10 °C, utilizada na indústria em alguns processos de produção de alimentos à base de leite.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos sugerem estudos adicionais com diferentes enzimas, diferentes massas, substratos diferentes, estrutura quaternária diferente, pois com condições de ativação variadas, é possível alterar a forma de genipina reticulada com o suporte e, portanto, alterar a matriz de suporte e, consequentemente, a conversão de substrato em produto (atividades enzimáticas). Além dos estudos da própria imobilização, este estudo possibilita a aplicação da enzima imobilizada em síntese controlada de lactulose (4-O-β-D-galactopiranosil-D-frutose) em leite para produção de iogurte e outros derivados lácteos.

Digitalizado com CamScanner

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T.L., PEIRCE, S., RUEDA, N., MARZOCCHELLA, A., GONÇALVES, L.R.B., ROCHA, M.V.P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Ion exchange of β-galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability". **Process Biochemistry**, Vol. 51, p. 875-880, 2016.

AZEVEDO, V.V.C., CHAVES, S.A., BEZERRA., D.C., LIA FOOK, M.V., COSTA., A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, n.3, p. 27-34, 2007.

BALTHAZAR, C.F.; PIMENTEL, T.C.; FERRÃO, L.L.; ALMADA, C.N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A.M.; NASCIMENTO, J.S.; SILVA, M.C.; FREITAS, M.Q.; SANT'ANA, A.S.; GRANATO, D.; CRUZ, A.G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviewsin Food Science and Food Safety**, v.16, p. 247-262, 2017.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas: Bookman, 2003.

BAPTISTIOLLI, A. M., GONDIM, D. R., SILVA JR, I. J., MATRICARDE-FALLEIRO, R. M., BRESOLIN, I. T. L. Caracterização de microesferas de quitosana/alginato epoxiladas com corantes imobilizados. Guarujá -SP: X Encontro Brasileiro sobre adsorção, 2014.

BELLÉ, A. S. **Extração de Genipina a partir do Jenipapo (*Genipa Americana Linnaeus*) para imobilização de enzimas**. 2017. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2017.

BELLÉ, A.S., HACKENHAAR, C.R., SPOLIDORO, L.S., RODRIGUES, E., KLEIN, M.P., HERTZ, P.F. "Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (Genipa americana L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels". **Food Chemistry**, Vol. 246, p. 266–274, 2018.

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

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E.C. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Blucher, 1 ed, 2001.

BRENA, B., PAULA, G.P., FRANCISC, B.V. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: **Guisan**, J.M. (Ed.), Immobilization of Enzymes and Cells, third ed. New York, 2013.

Digitalizado com CamScanner

BRENA, B.M., BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature review. In: **Guisán**, J.M. (Ed.), Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, 2006, Totowa, NJ, 420 p.

CANEVAROLO, S.V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, p 65 – 260, 2003.

CANTONE, S., FERRARIO, V., CORICI, L., EBERT, C., FATTOR, D., SPIZZO, 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, n. 15, p. 6262-6276, 2013.

CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, 9(2), pp.217–226, 2005.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quimica Nova**, v. 32, p. 175–187, 2009.

CASTIGLIONI, G.L. **Estudo da produção e utilização de lipase de Brukholderia cepacia na síntese enzimática de biodiesel**. 2009.Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) –Unicamp, Campinas, 2009.

CAVELLO, I.A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., CAVALITTO, S.F. Immobilization of a keratinolytic protease from Purpureocillium lilacinum on genipin activated-chitosan beads, **Process Biochem**. 49, p. 1332–1336, 2014.

CHEN, X. Y.; GÄNZLE, M. G. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? **International Dairy Journal**, v. 67, p. 61–72, 2017.

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

DICOSIMO, R., MCAULIFFE, J., POULOSE, A.J., BOHLMANN, G. "Industrial use of immobilized enzymes, Review article". **Chem. Soc. Rev.**, Vol. 42, p. 6437–6474, 2013.

DUARTE, L.S., DA SCHÖFFER, J., LORENZONI, A.S.G., RODRIGUES, R.C., RODRIGUES, E., HERTZ, P.F. "A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β-galactosidase". **Process Biochem.**, Vol. 55, p. 96–103, 2017.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. HHS Public Access. **International journal of advanced research**, v. 137, p. 10160–10163, 2016.

FACIN, B. R., MORET, B., BARRETA, D., BELFIORE, L.A., PAULINO, A.T. Immobilization and controlled release of β-galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, v. 179, p. 44–51, 2015.

Digitalizado com CamScanner

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the Aspergillus oryzae β-galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods, Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, v. 23, p. 495-506, 2017.

FATARELLA, E., SPINELLI, D., RUZZANTE, M., POGNI, R. "Nylon 6 film and nanofibercarriers: preparation and laccase immobilization performance". **J. Mol. Catal. Enzym.**, Vol. 102, p. 41–47, 2014.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2018.

FLORES, E. E. E., CARDOSO, F.D., SIQUEIRA, L.B., RICARDI, N.C., COSTA, T.H., RODRIGUES, R.C., KLEIN, M.P., HERTZ, P.F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. Elsevier, Elsevier Ltd, p. 1359-5113, 2019.

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

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; VOLPATO, G. V. SOUZA, C. F. V. Chelation by collagen in the immobilization of Aspergillus oryzae β-galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 303-310, 2018.

GUERRERO, C.; VERA, C.; SERNA, N.; ILLANES, A. Immobilization of Aspergillus oryzae β-galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresouce Techonology**, v. 232, p. 53-63, 2017.

GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes and cells. **Food Microbiology**, v. 22, p. 449, 2006.

GONZÁLES-DELGADO, I., LÓPEZ-MÚNOZ, M.J., MORALES, G., SEGURA, Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with b-galactosidase from Kluyveromyces lactis. **International Dairy Journal** 61, p. 211-219, 2016.

GOULAS, A., TZORTZIS, G. & GIBSON, G.R. Development of a process for the production and purification of α- and β-galactooligosaccharides from Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171. **International Dairy Journal,** 17(6), p.648–656, 2007.

HALDER, S.K., MAITY, C., JANA, A., GHOSH, K., DAS, A., PAUL, T., DAS MOHAPATRA, P.K., PATI, B.R., MONDAL, K.C. Chitinases biosynthesis by immobilized Aeromonas hydrophila SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation, **J. Biosci. Bioeng**. v.117, p. 170–177, 2014.

Digitalizado com CamScanner

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 107–122, 2011.

HETTIARACHCHY, N.S., FELIZ, D.J, EDWARDS, J.S, HORAX, R. "The use of immobilized enzymes to improve functionality". **Proteins in Food Processing**, p. 569-597, 2018.

HOBBS, C.A., KOYANAGI, M., SWARTZ, C., DAVIS, J., MARONPOT, R., RECIO, L., HAYASHI, S. "Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin ". **Food Chem. Toxicol.**, Vol. 118, p. 695–708, 2018.

HONGCAI, Z.; YU, H.; MEI, J.; ZHANG, Y.; DENG, Z. Preparation, characterization and in vitro release of β-galactosidase loaded polyelectrolyte nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 1-9, 2018.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. **Critical reviews in biotechnology**, 30(1), p. 41–62, 2010.

HWANG, E.T.; GU, M.B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 49-61, 2013.

ISPAS, C., SOKOLOV, I. & ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 393(2), pp.543–554, 2009.

JAMAL, F., QIDWAI, T., SINGH, D., PANDEY, P.K. "Biocatalytic activity of immobilized pointed gourd (Trichosanthes dioica) peroxidase–concanavalin A complex on calcium alginate pectin gel". **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, Vol. 74, p. 125–131, 2012.

JUANG, R.S., WU, F.C. & TSENG, R.L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**, 80(3), pp.187–193, 2001.

KANTAR WORD PANEL. Disponível em:<https://www.kantarworldpanel.com/br> Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

KAUSHAL, J., SINGH, G., ARYA, S.K. Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan – bentonite complex: a comparative study. **Biotechnol. Reports**, Vol. 18, 2018.

KAWACHI, Y., KUGIMIYA, S., NAKAMURA, H., KATO, K. Enzyme encapsulation in silica gel prepared by polylysine and itscatalytic activity. **Appl. Surf. Sci**. 314, 64–70, 2014.

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

Digitalizado com CamScanner

KISHORE, D., KAYASTHA, A.M. Optimisation of immobilization conditions for chickpea β-galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. **Food Chem**. Vol. 134, p. 1650–1657, 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 -d galactosidase immobilization". **Carbohydrate Polymers**, Vol. 137, p. 184–190, 2016.

KLEIN, M.P., FALLAVENA, L.P., SCHÖFFER, J.D., AYUB, M.A., RODRIGUES, R.C., NINOW, J.L., HERTZ, P.F. High stability of immobilized β-d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, 95(1), p.465–470, 2013.

KRIŽNIK, K. VASIĆ, Ž. KNEZ, M. LEITGEB. Hyper-activation of ß-galactosidase from Aspergillus oryzae via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles, **J. Clean. Prod**. 179, p. 225–234, 2018. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.117.

LEE, S., JUN, H., CHEUL, S., LEE, D. Genipin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by the suppression of HIF-1 α accumulation and VEGF expression, **Food Chem. Toxicol.,** v. 116, p. 70–76, 2018. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.005.

LIN, Y.H., TSAI, S.C., LAI, C.H., LEE, C.H., HE, Z.S., TSENG, G.C. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of Helicobacter pylori. **Biomaterials**, 34(18), pp.4466–4479, 2013.

LIU, H., LIU, J., TAN, B., ZHOU, F., QIN, Y., YANG, R. Covalent immobilization of Kluyveromyces fragilis b-galactosidase on magneticnanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1287–1295, 2012.

MA, X., QIAO, C., ZHANG, J., XU, J. Effect of sorbitol content on microstructure and thermal properties of chitosan films, Int. J. Biol. Macromol. 119, p. 1294–1297, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.060.

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

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

MENDES, A.A, DE 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**, 34(5), p.831–840, 2011.

Digitalizado com CamScanner

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M.J.J., WALDRON, K.C.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, **Biotechniques** 37, p. 790–802, 2004. https://doi.org/10.2144/04375RV01.

MONAJATI, M., BORANDEH, S., HESAMI, A., MANSOURI, D. Immobilization of L -asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: enzyme kinetics and stability studies, **Chem. Eng**. J. 354, p. 1153–1163, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.058.

MUZZARELLI, R.A.A. "Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedicaland pharmaceutical aids". **Carbohydrate Polymers**, Vol. 77, p. 1–9, 2009.

MUZZARELLI, R., EL MEHTEDI, M., BOTTEGONI, C., AQUILI, A., GIGANTE, A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. **Marine Drugs**, 13(12), p.7314–7338, 2015.

NERI-NUMA, I.A., PESSOA, M.G., PAULINO, B.N., PASTORE, G.M. "Genipin: a natural blue pigment for food and health purposes". **Trends Food Sci. Technol**., Vol. 67, p. 271-279, 2017.

NGUYEN, V. D.; STYEVKÓ, G.; MADARAS, E.; HAKTANIRLAR, G.; ANH T. M. TRAN; BUJNA, E.; DAM, M. S.; NGUYEN, Q. D. Immobilization of β-galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides, **Process Biochemistry**, 2019.

ONO, M., ISHIMATSU, N., MASUOKA, C., YOSHIMITSU, H., TSUCHIHASHI, R., OKAWA, M., KINJO, J., IKEDA, T., NOHARA, T. Three New Monoterpenoids from the Fruit of Genipa americana. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 55(4), p.632–634, 2007.

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

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

PENG, C., ZHAO, S.Q., ZHANG, J., HUANG, G.Y., CHEN, L.Y., ZHAO, F.Y. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (Sinapis alba) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chemistry,** 165, pp.560–568, 2014.

PLOU, F. J., COLINAS, B.R., POVEDA, A., BARBERO, J.J., BALLESTEROS, A.O. Microbial enzyme technology in food applications. In: ROSELL, C. M.; RAY R. C. β-Galactosidases for lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis, **CRC Press**, 2016. p. 121–144.

PRAZERES, S. F.; ZAPATA, F.; CANILHO, N.; PASC, A.; GÁRCIA-RUIZ, C.; MONTALVO, G. Probing the confinemen tof β-galactosidase intomeso-macro porous

Digitalizado com CamScanner

silicaby Raman spectroscopy. **Microporus and mesoporous Materials**, v. 278, p. 149-155, 2019.

RAI, A.K., SANJUKTA, S., CHOURASIA, R., BHAT, I., BHARDWAJ, P.K., SAHOO, D. "Production of bioactive hydrolysate using protease, β-glucosidase and α-amylase of Bacillus spp. isolated from kinema". **Bioresource Technology**, Vol. 235, p. 358-365, 2017.

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

RENTSCHLER, E., SCHUH, K., KREWINKEL, M., BAUR, C., CLAABEN, W., MEYER, S., KUSCHEL, B., STRESSLER, T., FISCHER, L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. **Journal of Dairy Science** 98, 1–9, 2015.

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 β-galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, 2017.

RIGO, E; NINOW, J. L ; TSAI, S. M ; DURRER, A. ; FOLTRAN, L. L. ; REMONATTO, D. ; SYCHOSKI, M. ; VARDANEGA, R. ; OLIVEIRA, D. ; TREICHEL, H. ; LUCCIO, M. Preliminary Characterization of Novel Extra-cellular Lipase from Penicillium crustosum Under Solid-State Fermentation and its Potential Application for Triglycerides Hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology** (Online), v. 5, p. 1592-1600, 2012.

RISBUD, M. V., HARDIKAR, A.A., BHAT, S.V., BHONDE, R.R. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 23–30, 2000.

RODRIGUES, D.S., MENDES, A.A., ADRIANO, W.S., GONÇALVES, L.R.B., GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 51(3–4), pp.100–109, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, R.C., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., TORRES, R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization". **Chemical Society Reviews**, Vol. 42, p. 6290-6307, 2013.

RUEDA, N., SANTOS, C.S., RODRIGUEZ, M.D., ALBUQUERQUE, T.L., BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Journal of Molecular CatalysisB : Enzymatic Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads : A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.

Digitalizado com CamScanner

SANGWAN, V., TOMAR, S.K., SINGH, R.R., SINGH, A.K., ALI, B. Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, 2011.

SANTOS, J.C.S.; BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., RODRIGUES, R.C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2015. "Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes". **ChemCatChem**, v. 7, p. 2413-2432, 2015.

SANTOS, S. M. L., CECÍLIA, J.A., VILARRASA-GÁRCIA, E., JUNIOR, I.J.S., RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E., AZEVEDO, D.C.S. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 53–64, 2016.

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

SHANMUGAM, M.K., SHEN, H., TANG, T.R., ARFUSO, F., RAJESH, M., WANG, L., PREM, ABIAN, J., CHER, B., BISHAYEE, A. Potential role of genipin in cancer therapy, **Pharmacol. Res**. v.133, p. 195–200, 2018. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.007.

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

SINGH, P., MEDRONHO, B., ALVES, L., DA SILVA, G.J., MIGUEL, M.G., LINDMAN, B. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bactéria. **Carbohydr. Polym.**, v.175, p.87–95, 2017.

SONG, Y.S., LEE, H.U., PARK, C., KIM, S.W. "Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β-galactosidase and glucose isomerase". **Carbohydrate Research**, 369, p. 1–5, 2013.

SOUZA, C.J.F., ROJAS, E.E.G. AND TRINDADE, C.S.F. "Lactase (b-galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity". **Food Hydrocolloids**, Vol. 83, p. 88-96, 2018.

SUNG, H. W., HUANG, R. N., HUANG, L. L. H., TSAI, C. C. In vitro evaluation ofcytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissuefixation. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, 10(1), 63–78, 1999.

TORRES, D. P. M., GONÇALVES, M.P.F, TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, R.L. Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 438–454, 2010.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Improved biocatalysts based on Bacillus circulans β-galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in

Digitalizado com CamScanner

whey processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 57–64, 2012.

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

VASILEVA, N., IOTOV, V., IVANOV, Y., GODJEVARGOVA, T., KOTIA, N. Immobilization of b-galactosidase on modified polypropilene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 51(5), p.710–719, 2012.

VIDYA, B., PALANISWAMY, M., GOPALAKRISHNAN, V.K. Screening and Optimization of B -Galactosidase From Fungal Strains By Using Agro Residues. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3(6), p.1809–1821, 2014.

WAHBA, M.I. "Processed gellan gum beads as covalent immobilization carriers". **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, Vol. 14, p. 270–278, 2018.

WANG, W., JIANG, Y., ZHOU, L., GAO, J. Comparison of the properties of lipaseimmobilized onto mesoporous resins by different methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 164(5), 561–572, 2011.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; CESCO, C. T.; ARTIFON, S. E. S.; PAULINO, A. T. Reutilização de β-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica modificada na hidrólise de lactose. 2° WORKSHOP DE COMPOSTOS BIOATIVOS E QUALIDADE DE ALIMENTOS, 2018, Santa Maria. **Anais eletrônicos**... Santa Maria: UFSM. Disponível em: <http://wcba.ufsm.br/anais/index.php/pt-br/>. Acesso em: 8 nov. 2019.

ZAAK, H., PEIRCE, S., DE ALBUQUERQUE, T., SASSI, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R." Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize β-galactosidase from Aspergillus oryzae". **Catalysts**, Vol. 7, p. 250, 2017.

ZADOW, J.G. Economic considerations related to the production of lactose and lactose by-products. **FIL-IDF Secretariat General,** v. 289, 1993.

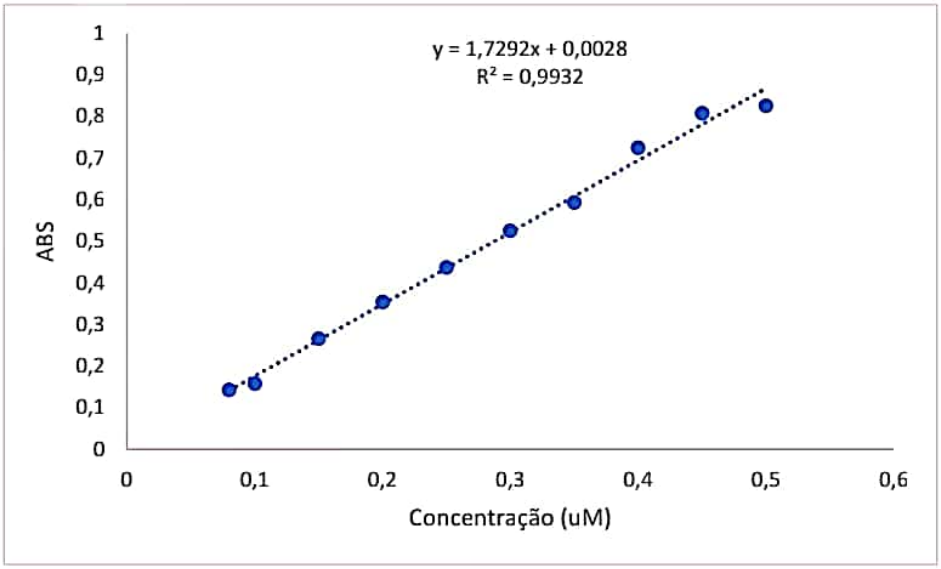
ZHANG, W., ABBASPOURRAD, A., CHEN, D. CAMPBELL, E., ZHAO, H., LI, Y., LI, Q., WEITZ, D.A. Osmotic Pressure Triggered Rapid Release of Encapsulated Enzymes with Enhanced Activity. Advanced Functinal Materials, p. 1–7, 2017.

ZUCCA, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., SANJUST, E. Agarose and its derivatives assupports for enzyme immobilization. **Molecules** 21, 1577, 2016. https://doi.org/10.3390/molecules21111577.

Digitalizado com CamScanner

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURA A1 – Curva de Calibração de ONP.



Fonte: Elaborado pela autora.

Digitalizado com CamScanner

APÊNCIDE B - DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE EM SUPORTE DE QUITOSANA ATIVADA COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO EM LÁCTEOS

Por quê?

- ✓ A imobilização enzimática é uma alternativa para bioprocessos tendo como intuito melhorar ainda mais a dinâmica dos processos, visando aumentar a estabilidade e seletividade, proporcionar a recuperação e ainda obter produtos específicos.
- ✓ A quitosana tem vantagem entre os suportes de imobilização pois oferece características desejáveis, incluindo não toxicidade, biocompatibilidade, capacidade biodegradável, ser barata e versátil, sendo ideal para uso em bioprocessos.
- ✓ A genipina é utilizada como agente de ativação de suporte por ser menos citotóxica que outros agentes utilizados, podendo ser utilizada em processos alimentícios, em busca de alternativas biodegradáveis.

Quem já fez?

- ✓ Bellé *et al.* (2018) utilizaram partículas de quitosana ativadas com genipina para a enzima β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*.
- ✓ Flores *et al.* (2019) utilizaram esferas de quitosana ativadas com genipina para β-galactosidase de *Aspergillus oryzae.*

Hipóteses

- ✓ A imobilização da enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em suporte a base de quitosana ativada com genipina será eficiente?
- ✓ O biocatalisador produzido é uma alternativa viável para aplicação em lácteos zero lactose com características prebióticas e/ou para produção de lactulose.

Como fazer?

- ✓ Preparo do suporte através da avaliação da forma, tempo e temperatura de ativação, concentração de ativador, secagem após ativação, carga enzimática;
- ✓ Parâmetros de reação enzimática pelo planejamento experimental com duas variáveis independentes;
- ✓ Parâmetros da enzima imobilizada: pH e temperatura ótima, estabilidade térmica, constantes cinéticas, estabilidade operacional e de armazenamento;
- ✓ Caracterização pelas análises de TGA, DSC, MEV, TPA e cor.

Respostas

- ✓ Condições de preparo que permitam fácil recuperação, rendimento de imobilização e atividades enzimáticas;
- ✓ Otimização de parâmetros para melhorar rendimento de imobilização e atividades enzimáticas;
- ✓ Obter melhores resultados nas estabilidades e condições das enzimas imobilizadas.

Digitalizado com CamScanner