



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CAMPUS DE CUITÉ

ELISANGELA BATISTA DA SILVA

**ESTUDO DA COIMOBILIZAÇÃO DE LACTASE E NEUTRASE EM SUPORTE DE
QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES
METODOLOGIAS VISANDO À HIDRÓLISE DA LACTOSE E PROTEÍNAS
PROVENIENTES DO SORO DE QUEIJO**

CUITÉ - PB

2015

ELISANGELA BATISTA DA SILVA

**ESTUDO DA COIMOBILIZAÇÃO DE LACTASE E NEUTRASE EM SUPORTES DE
QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES
METODOLOGIAS VISANDO À HIDRÓLISE DA LACTOSE E PROTEÍNAS
PROVENIENTES DO SORO DE QUEIJO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À BANCA DE
MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E
BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE CAMPINA GRANDE - PARAÍBA PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

ORIENTADOR: PROF. DR. WELLINGTON SABINO ADRIANO

CUITÉ - PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586e Silva, Elisangela Batista da.

Estudo da coimobilização da lactase e neutrase em suporte de quitosana e alginato de sódio: comparação de diferentes metodologias visando à hidrólise da lactose e proteínas provenientes do soro de queijo. / Elisangela Batista da Silva. – Cuité: CES, 2015.

84 fl.

Dissertação (Curso de Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Dr. Wellington Sabino Adriano.

1. Bioquímica. 2. Soro de queijo. 3. Lactase. 4. Neutrase. 5. Coimobilização. 6. Quitana. 7. Alginato de sódio. I. Título.

CDU 577.1

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ELISANGELA BATISTA DA SILVA, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E BIOTECNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – PB CAMPUS DE CUITÉ-PB.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano (Orientador)

Prof^a Ms. Yyyyyyy

Prof. Ms. Zzzzzzz

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu esposo, a minha filha, a minha mãe e minha sogra pelo apoio, compreensão e amor incondicional em todos os momentos desta e de outras caminhadas, e em especial a Deus que é a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pelas alegrias proporcionadas, por mais essa conquista e por me iluminar o meu caminho durante os desafios propostos e nas horas de dificuldades.

Mas tudo só foi possível pelo amor e apoio da minha família.

Ao meu esposo, Severino Valério, que sempre me compreendeu nos momentos difíceis, enxugou minhas lágrimas, compartilhou de meus sorrisos, e por ter paciência comigo e ter me incentivado para realização desse mestrado.

A minha filha, Laís Gabrielle, pela paciência e incentivo, peço-lhes desculpas pelos momentos de ausência durante sua infância e principalmente adolescência.

A minha mãe, Clemilda, por me dá o dom da vida e pelo apoio nos momentos necessários.

A minha sogra, Cecé, por tomar de conta das preciosidades da minha vida marido e filha e por ter paciência comigo quando estava em casa.

Ao professor, Wellington Adriano, pela orientação, dedicação, paciência e confiança na realização dessa pesquisa, que foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) pela oportunidade de fazer parte da história desta importante instituição pública de ensino e pesquisa, composta de cidadãos em busca de conhecimento e formadora de profissionais de qualidade.

As colegas de laboratório Cristiane e Geoclécia que me ajudaram bastante com seus aprendizados.

Aos meus amigos que me apoiaram e me incentivaram durante toda essa jornada.

A CAPES, pelo auxílio financeiro, possibilitando a dedicação ao curso.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e torceram pelo desenvolvimento e concretização deste trabalho, muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

Enzimas são proteínas biocatalisadoras, aumentam a velocidade de reação sem alterar o equilíbrio. Apresentam alta eficiência durante as reações bioquímicas no metabolismo dos seres vivos. O soro de queijo pode apresentar-se aplicado na dieta de alguns animais; como também serem descartado nos efluentes. O extrato seco do soro de leite corresponde à lactose, proteínas, sais minerais e gordura, dos quais a lactose é o material energético utilizado em processos biotecnológicos (indústria farmacêutica e alimentícia) e as proteínas destacam-se devido ao valor nutricional. A hidrólise é um método promissor para a indústria de alimentos, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos hidrolisados, aumentando assim a disponibilidade de nutrientes aos produtos lácteos e a nível mundial e atenuação por intolerantes a lactose. A imobilização de enzimas é uma técnica cada vez mais utilizada a fim de melhorar a aplicação industrial de enzimas permitindo um melhor controle da produção e redução de custos. Objetivou-se estudar coimobilização de lactase e neutrase em suporte de quitosana comparando metodologias visando à hidrólise da lactose e proteínas do soro de queijo, além de promover o reaproveitamento de produtos regionais mais baratos como suportes a base de quitosana e alginato de sódio. Inicialmente prepararam-se os suportes a serem aplicados no estudo com quitosana 4% (m/v) e alginato de sódio 2,5% (m/v) ativados com glutaraldeído 5% (v/v). Na primeira etapa, determinaram-se o rendimento e atividade de imobilização e coimobilização, atividade recuperada e atividade aparente dos melhores derivados obtidos. Para a segunda fase, os catalisadores imobilizados e coimobilizados foram estudados quanto à estabilidade térmica e operacional, tempo de meia vida, grau de hidrólise e concentração de glicose. Os resultados para os derivados formados a partir da quitosana foram satisfatórios obtendo um rendimento de coimobilização para a neutrase (76,53%) e para a lactase (91,30%). Suportes de alginato de sódio não apresentaram boa adequação para imobilização e coimobilização obtendo-se rendimentos nulos. Houve um aumento na estabilidade térmica e tempo de meia vida nos derivados de quitosana. Na comparação do grau de hidrólise entre a neutrase livre, imobilizada e coimobilizada obteve-se um melhor desempenho da enzima imobilizada (20%) em 80 minutos de reação. Quando se comparou a conversão de glicose com lactase livre, imobilizada e coimobilizada a melhor resultado foi a lactase livre (15g/L) em 30 minutos de reação. A estabilidade operacional da neutrase em cinco ciclos consecutivos ocorreu uma queda de (46%) no grau máximo de hidrólise, já a lactase em seu quinto ciclo de reutilização em bateladas foi obtido perda de (16,4%) na concentração de glicose. Dessa forma, obtiveram-se bons derivados de lactase e neutrase coimobilizada possibilitando a reutilização da enzima, reduzindo custos de processo.

Palavras – chave: Soro de queijo, Lactase, Neutrase, Imobilização, Coimobilização, Quitosana, Alginato de sódio.

ABSTRACT

Enzymes are proteins biocatalisadoras, increase reaction speed without changing the balance. They feature high efficiency during the biochemical reactions in the metabolism of living beings. The cheese whey may be present in the applied diet some animals; but also be disposed in the effluent. The dry extract of whey corresponds lactose, proteins, minerals and fat, of which lactose is the energetic material used in biotechnological processes (pharmaceutical and food industry) and proteins stand out due to their nutritional value. Hydrolysis is a promising method for the food industry, it allows the development of new hydrolysed products, thereby increasing the availability of nutrients for milk products and worldwide and mitigation for the lactose intolerant. The immobilizing enzymes is an increasingly used technique to improve the industrial application of enzymes allowing better control of production and cost reduction. The objective was to study coimobilização lactase and neutrase in chitosan support methodologies aimed at comparing hydrolysis of lactose and whey proteins, and promote the reuse of cheaper local products as supports the basis of chitosan and sodium alginate. Initially prepared brackets to be applied to the study of 4% chitosan (w/v) and sodium alginate (2.5% w/v) activated with glutaraldehyde (5% v/v). In the first stage, they were determined income and immobilization activity and coimobilizada, recovered activity and apparent activity of the best obtained derivatives. For the second phase, the immobilized catalysts and coimobilizada were studied for thermal and operational stability, half-life, degree of hydrolysis and the glucose concentration. The results for the derivatives formed from chitosan were obtained satisfactory yield coimobilizada for neutrase (76.53%) and lactase (91.30%). Sodium alginate holders did not show good fit for immobilization and coimobilizada obtaining zero income. There was an increase in the thermal stability and half-life in the chitosan derivatives. Comparing the degree of hydrolysis between free Neutrase, and immobilized coimobilizada obtained a better performance of the immobilized enzyme (20%) at 80 minutes of reaction. When comparing the conversion of glucose to free lactase, immobilized and coimobilizada the best result was the free lactase (15g/L) in 30 minutes of reaction. The operational stability of Neutrase in five consecutive cycles there was a fall (46%) maximum degree of hydrolysis, longer lactase in its fifth reuse cycle in batches loss was obtained (16.4%) in glucose concentration. Thus, there were obtained good derivatives lactase and coimobilizada neutrase enabling reuse of the enzyme, reducing processing costs.

Keywords: Cheese whey, Lactase, Neutrase, Immobilization, Coimobilização, Chitosan, Sodium alginate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química da lactose. CAMPBELL (2000).....	23
Figura 2:	Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA et al., 2004).....	31
Figura 3:	Estrutura dos biopolímeros de celulose e quitosana (BERGER et al.,2004).....	35
Figura 4:	Estrutura química do alginato – G (ácido gulurônico) e M (ácido manurônico) (LEONARD et al. 2004).....	36
Figura 5:	Fluxograma mostrando os métodos utilizados.....	39
Figura 6:	Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 4% (m/v).....	40
Figura 7:	Fluxograma mostrando a preparação das partículas de alginato de sódio 2,5% (m/v).....	41
Figura 8:	Partículas de quitosana ativadas com glutaraldeído 5% (v/v).....	41
Figura 9:	Partículas de alginato de sódio ativadas com glutaraldeído 2,5% (v/v).....	42
Figura 10:	Fluxograma do procedimento de imobilização da enzima em diferentes suportes.....	42
Figura 11:	Fluxograma do procedimento de imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase em diferentes suportes.....	44
Figura 12:	Fluxograma do procedimento de imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase em diferentes suportes.....	45
Figura 13:	Fluxograma do procedimento de imobilização da lactase e neutrase simultaneamente em diferentes suportes.....	45
Figura 14:	Representação gráfica da estabilidade térmica da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU}.g^{-1}$ de suporte em pH 8,0 e temperatura de 60°C, (■) neutrase livre; (●) neutrase imobilizada e (▲) neutrase coimobilizada.....	59
Figura 15:	Representação gráfica da estabilidade térmica da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU}.g^{-1}$ de suporte em pH 8,0 e temperatura de 60°C, (■) neutrase livre e (●) neutrase imobilizada.....	60
Figura 16:	Representação gráfica da estabilidade térmica da lactase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16U_{LAC}.g^{-1}$ de suporte (60°C e pH 7,0 adicionado	

- 2mM de MgCl₂ e 0,1mM de MnCl₂), (■) lactase livre; (●) lactase imobilizada; (▲) lactase coimobilizada.....62
- Figura 17:** Perfil do grau de hidrólise da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v), com substrato caseína 4% (m/v), com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 8,0 e temperatura de 50°C, (■) neutrase livre; (●) neutrase imobilizada e (▲) neutrase coimobilizada.....64
- Figura 18:** Perfil comparativo do grau de hidrólise da neutrase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v), com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 8,0 e temperatura de 50°C com substrato caseína 4% (m/v) (●) e substrato solução de caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) (▲).....65
- Figura 19:** Perfil da concentração de glicose da lactase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 7,0 e temperatura 37°C adicionado 2mM de MgCl₂ e 0,1mM de MnCl₂), (■) lactase livre; (●) lactase imobilizada; (▲) lactase coimobilizada.....66
- Figura 20:** Perfil comparativo da concentração de glicose da lactase coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte a temperatura de 37°C e pH 7,0 adicionado 2mM de MgCl₂ e 0,1mM de MnCl₂ , com substrato (●) lactose 5% (m/v) e (▲) solução de lactose 5% + caseína 4% (m/v).....67
- Figura 21:** Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da neutrase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $110 \pm 103,7U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte coimobilizado, pH 8,0, temperatura de 50°C e tempo reacional de 80 minutos. Massa do derivado: 0,5g.....68
- Figura 22:** Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da lactase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $10 \pm 8U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte coimobilizado, pH 7,0 e temperatura de 37°C e tempo reacional 80 minutos.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Aplicações biotecnológicas da enzima β -galactosidase.....	27
Tabela 2:	Classificação dos suportes conforme a composição (GALVÃO, 2004).....	33
Tabela 3:	Parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (ATrec) atividade recuperada e (Aap) atividade aparente.....	52
Tabela 4:	Parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão borato de sódio 20 mM pH 8,0 e mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (ATrec) atividade recuperada e (Aap) atividade aparente.....	53
Tabela 5:	Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$, mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16U_{LAC}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (ATrec) atividade recuperada e (Aap) atividade aparente.....	54
Tabela 6:	Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de alginato de sódio ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão borato 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$ mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16U_{LAC}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (ATrec) atividade recuperada e (Aap) atividade aparente.....	56
Tabela 7:	Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo ($T_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.....	58

Tabela 8: Parâmetros de estabilidade térmica de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte sendo ($T^{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.....59

Tabela 9: Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de quitosana com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de MgCl₂ e 0,1mM de MnCl₂ mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16U_{LAC}\cdot g^{-1}$ de suporte sendo ($T^{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
Kg	Quilograma
U _{LAC}	Unidades de Lactase
U _{NEU}	Unidades de Neutrase
m/v	massa/volume
v/v	volume /volume
nm	nanômetro
M	molar
mM	micromolar
[GLI]	Concentração de glicose, mg.mL ⁻¹
[Tyr]	Concentração de tirosina, mg.mL ⁻¹
R	Rendimento de imobilização
B	Beta - formas anoméricas da enzima β-galactosidase
At	Atividade hidrolítica, U.mL ⁻¹
A _{Trec}	Atividade recuperada
A _{TI}	Atividade teoricamente imobilizada
A _{ap}	Atividade aparente
T _{1/2}	Tempo de meia-vida, min ou h
FE	Fator de estabilização
V _t	Volume no reator, mL
V _e	Volume da enzima, mL
Me	Massa do derivado, g
Th	Tempo de hidrólise, min
A _{to}	Atividade inicial da enzima, U.mL ⁻¹
A _{tf}	Atividade do sobrenadante após imobilização, U.mL ⁻¹
A _{td}	Atividade do derivado, U.mg ⁻¹
GH	Grau de hidrólise, %
V _b	Volume da base, mL
[b]	Concentração da base, N
α	Grau médio de dissociação dos grupos α-NH ₂
mp	Massa da proteína na amostra, g

<i>htot</i>	Número de ligações peptídicas totais em uma proteína
Kd	Constante de dissociação
I N S C L	Imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase
I L S C N	Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase
I L N S	Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	21
2.1.	Soro do queijo.....	21
2.2.	Lactose.....	23
2.3.	Caseína.....	24
2.4.	Enzimas.....	24
2.4.1	Lactase.....	26
2.4.2	Neutrase.....	28
2.5	Imobilização Enzimática.....	29
2.6	Coimobilização.....	30
2.7	Métodos de Imobilização Enzimática.....	31
2.8	Suportes para imobilização Enzimática.....	33
2.8.1	Quitosana.....	35
2.8.2	Alginato de Sódio.....	36
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	MATERIAIS.....	38
4.1.1	Suportes.....	38
4.1.2	Reagentes utilizados para o tratamento dos suportes.....	38
4.1.3	Enzimas.....	38
4.1.4	Agente ativante.....	38
4.1.5	Substratos.....	38
4.1.6	Reagentes para análise da glicose.....	38
4.2	MÉTODOS.....	39
4.2.1	Preparação das partículas de quitosana 4% (m/v).....	39
4.2.2	Preparação das partículas de alginato de sódio 2,5% (m/v).....	39
4.2.3	Ativação dos suportes de quitosana para imobilização e coimobilização das enzimas.....	40
4.2.4	Ativação do suporte de alginato de sódio para imobilização e coimobilização das enzimas.....	41

4.2.5	Procedimento de imobilização.....	41
4.2.5.1	Procedimento de imobilização da neutrase.....	42
4.2.5.2	Procedimento de imobilização da lactase.....	42
4.2.6	Procedimento de coimobilização.....	43
4.2.6.1	Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase.....	43
4.2.6.2	Imobilização de neutrase seguida da coimobilização da lactase.....	44
4.2.6.3	Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente.....	44
4.2.7	Ensaio da atividade enzimática.....	45
4.2.7.1	Determinação da atividade hidrolítica da lactase livre.....	45
4.2.7.2	Determinação da atividade hidrolítica da neutrase livre.....	46
4.2.7.3	Determinação da atividade hidrolítica da lactase imobilizada e coimobilizada.....	46
4.2.7.4	Determinação da atividade hidrolítica da neutrase imobilizada e coimobilizada.....	47
4.2.8	Determinação dos parâmetros de imobilização e coimobilização.....	48
4.2.8.1	Determinação do rendimento de imobilização (R%).....	48
4.2.8.2	Atividade recuperada (ATrec).....	48
4.2.9	Determinação do grau de hidrólise da caseína.....	48
4.2.10	Reação com lactose.....	49
4.2.11	Ensaio de estabilidade térmica.....	49
4.2.12	Estabilidade operacional.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1	Atividade hidrolítica da enzima solúvel.....	51
5.2	Atividade hidrolítica da neutrase imobilizada e coimobilizada por ligação covalente em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v).....	51
5.3	Atividade hidrolítica da lactase imobilizada e coimobilizada por ligação covalente em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v).....	54
5.4	Estabilidade térmica e tempo de meia vida dos derivados obtidos.....	57
5.4.1	Estabilidade térmica e tempo de meia vida da neutrase.....	57
5.4.2	Estabilidade Térmica e tempo de meia vida da lactase.....	61
5.5	Grau de hidrólise da neutrase.....	62
5.6	Concentração de Glicose.....	66
5.7	Estabilidade operacional.....	67
6.	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é considerada uma das grandes descobertas dos processos na biotecnologia, e em particular o processo envolvendo a sua imobilização. As enzimas são biocatalisadoras de natureza protéica ou glicoprotéica que atuam na aceleração das reações bioquímicas; possuem a capacidade de reduzir a energia de ativação sem causar alterações no equilíbrio das reações e se diferenciam de outros catalisadores bioquímicos por apresentarem um alto grau de especificidade além de seu poder de catálise ser realizado em condições brandas, temperaturas e pressões amenas e na maioria das vezes em soluções aquosas. Esse comportamento das enzimas permite uma redução no custo final do processo, no consumo energético e reduz a formação de produtos indesejáveis, isso devido a sua alta especificidade que resulta em um bom rendimento no processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução de resíduos na natureza (CASTRO et al., 2004).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadoras, devido a sua especificidade e alto poder catalítico, a sua aplicação na indústria não é imediata, pois esses biocatalisadores são caros e como são solúveis e estão presentes em baixa concentração no meio, sua reutilização após o uso dificilmente será economicamente viável. As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por microrganismos. A tecnologia enzimática surgiu como área de investigação tecnológica durante a década de 60, estudando a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

Em geral, a técnica de imobilização enzimática vem sendo cada vez mais utilizada a fim de melhorar a aplicação industrial de enzimas permitindo um melhor controle da produção e redução de custos. Sabe-se, porém, que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes de imobilização de enzimas, mas sim uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações.

O mercado industrial de enzimas está em constante crescimento em função das tecnologias de produção, avanços na área de engenharia de proteínas, bem como a diversificação do campo de aplicação. Mundialmente o mercado tecnológico das enzimas divide-se em três principais seguimentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos; enzimas técnicas destinadas à indústria têxtil; fabricação de produtos de limpeza e as empregadas na produção de ração animal.

A aplicação de técnicas de bioconservação e reutilização enzimática é uma alternativa atraente para o melhor aproveitamento de resíduos provenientes do soro do queijo que é o principal subproduto da indústria laticínea e devido ao seu elevado poder poluente e a dificuldade de sua eliminação, algumas empresas estão buscando alternativas para o reaproveitamento dos componentes do soro, principalmente das proteínas e lactose.

Levando-se em consideração a tais aspectos, uma das alternativas para resolver o problema de desperdício, poluição e custo elevado no tratamento de efluentes, seria a transformação dos resíduos protéicos, em produtos comercializáveis. Com o auxílio da tecnologia de hidrólise do soro do queijo transformando-o em produtos de amplas utilidades. A maioria dos hidrolisados protéicos de soro de queijo existentes são obtidos pela hidrólise das proteínas por enzimas solúveis. Uma das aplicações mais importantes dos hidrolisados de proteína é a sua utilização como fonte de nitrogênio na formulação de dietas enterais destinadas à alimentação infantil e de adultos enfermos (GUADIX et al., 2000).

O emprego de enzimas imobilizadas torna-se um processo economicamente viável, e se faz necessário considerar o tipo de suporte empregado assim como o método de imobilização utilizado. A imobilização em suportes de materiais orgânicos apresenta ampla aceitação e aplicabilidade, pois o seu baixo custo, menor limitação quando a biodegradação e biocompatibilidade trazendo ao meio ambiente vantagens por ser um material renovável não gerando resíduos que poluem os efluentes, justificando-se dessa forma estudos que avaliem a aplicação deste resíduo para a elaboração de produtos de valor agregado, conferindo-lhe um valor mais nobre.

Ressalta-se que este trabalho é de extrema importância para o nordeste, como também para o país, uma vez que o mesmo permitirá o desenvolvimento de catalisadores enzimáticos usando suportes regionais de baixo custo como a quitosana e alginato de sódio. Visto que o suporte a base de quitosana é procedente de carapaças de crustáceos, um subproduto da indústria pesqueira do nordeste e com excelentes propriedades químicas que favorecem a imobilização de enzimas, e também o suporte à base de algina que é um composto derivado de algas marinhas, além disso, estes catalisadores serão aplicados na hidrólise de lactose e neutrase proveniente do soro de queijo.

Com este estudo, objetivou-se estudar a coimobilização de lactase e neutrase em suportes de quitosana e alginato de sódio fazendo uma comparação de diferentes metodologias visando à hidrólise da lactose e neutrase proveniente do soro de queijo, além de promover uma alternativa de reaproveitamento de produtos regionais de menor custo, como

também pode auxiliar na contribuição da expansão e diversificação da tecnologia enzimática, trazendo potenciais socioeconômicos por meio do desenvolvimento de novas tecnologias.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Soro do queijo

O soro de queijo, também chamado de soro de leite, ou tecnicamente chamado de “lactossoro”, é um resíduo procedente da fabricação de queijos ou da extração da caseína e tem-se mostrado como um problema de despejo no meio ambiente devido a sua elevada carga orgânica e difícil biodegradabilidade o que ocasiona também um desperdício de material protéico e de enzimas em especial a lactase que é o produto da hidrólise da lactose.

O soro de queijo pode apresentar três principais destinos. O primeiro é o seu processamento até produtos derivados finais os quais incluem: iogurtes, sorvetes, bebidas lácteas e alimentos infantis; o segundo é aplicação do mesmo diretamente na alimentação de alguns animais e o terceiro destino é o seu tratamento para em seguida ser rejeitado nos esgotos, pois o mesmo apresenta um alto poder de poluição (BRANDÃO, 1994).

De acordo com Almeida et al., (2003) se o soro de queijo for jogado de forma direta nos rios ou esgotos públicos, resulta em um grande problema ambiental devido ao seu elevado teor de matéria orgânica, apresentando uma demanda bioquímica de oxigênio – DBO de 30 a 50 g de oxigênio/L e uma demanda química de oxigênio – DQO de 50 a 80 g de oxigênio/L.

Na fabricação de 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite e 9 kg de soro são gerados (BALDASSO, 2008), ou seja, o soro apresenta aproximadamente 85-90% do volume de leite utilizado na fabricação do queijo (DIAS e SUZART, 2007; BARBOSA et al., 2010). O soro é originado durante o processo de coagulação do leite para a fabricação do queijo e sua porção aquosa retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite (PADILHA, 2007). Entre eles estão à lactose (4,5- 5%), as proteínas solúveis (0,6-0,8%), os lipídios (0,4-0,5%) e traços de sais minerais (CARVALHO et al., 2013).

Dos componentes presentes no soro, a lactose e as proteínas solúveis são de grande importância devido ao seu valor nutricional. A lactose está integralmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite, representando aproximadamente a metade dos sólidos não gordurosos os quais contribui para o valor energético do leite que representa aproximadamente 30% das calorias fornecidas pelo leite são devidas à lactose. As proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais e a lactose por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos e como componentes que podem ser utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (DIAS; LING, 2008).

As proteínas do leite são subdivididas em caseína (80%), que é a principal proteína do leite e as proteínas do soro (20%), que se encontram completamente dissolvidas na água do leite, são formadas pelas frações: albumina do soro, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e protease-peptonas (TRONCO, 2003).

As proteínas do soro vêm sendo aproveitadas e tem sido amplamente aceita no mercado de ingredientes alimentares (AFONSO, 2008). São de naturezas globulares e solúveis em água e durante a produção do queijo essas proteínas e boa parte da lactose permanecem em solução (BALDASSO, 2008). O aproveitamento de proteínas do soro como ingredientes em alimentos funcionais está aumentando, assim como a capacidade tecnológica para produzir concentrados de proteínas de soro (BALDASSO, 2008).

Cerca de 50% do soro produzido mundialmente já se encontra industrializados na forma de bebidas fermentadas, sucos, aditivos para panificação e utilização na produção animal. Outra parte é comercializada desidratada sob forma de pó como fonte energética e nutritiva (ALMEIDA et al., 2001). Atualmente no Brasil, o soro de queijo vem sendo utilizado na alimentação animal ou processado em pó para a produção de biscoitos e alimentos lácteos, principalmente bebidas lácteas (BARBOSA et al., 2010).

São grandes os esforços para aproveitamento de resíduos agroindustriais em todo mundo, em particular, o soro, pela abundância de produção, características nutricionais e elevada capacidade poluente, sendo considerado o constituinte de maior importância dos derivados lácteos. Além disso, o soro tem grande importância quando visto sob dois aspectos: como agente de poluição, por se tratar de um resíduo; e como produto nobre, devido à presença de proteínas solúveis, lactose e sais (BARBOSA et al., 2010).

Uma das alternativas estudadas nos últimos anos é a recuperação desses subprodutos mediante aplicação de processos utilizando membranas dos nutrientes de alta qualidade que tem o soro de queijo transformando-o em pó (BYRNE e FITZPATRICK, 2002), como também a realização da hidrólise por meio de enzimas específicas. As aplicações de hidrolisados de proteína como fonte de aminoácidos livres e de pequenos peptídeos são inúmeras. Dentre elas podemos destacar: formulação de dietas enterais, utilização em suplementos esportivos, sorvetes, bebidas lácteas, misturas para sucos, confecção de marcadores de massa molecular, utilização em medicamento entre outras (MARQUES, 2009).

2.2 Lactose

A lactose é o componente que se apresenta em maior concentração no extrato seco do leite, podendo variar de 4,5 a 5,2 g% conforme alimentação e intervalos de lactação. É também o principal carboidrato do leite de vaca (SCHLIMME e BUCHHEIM, 2002). A lactose é um dissacarídeo formado pelos radicais β -D-galactose e α -D-glicose que estão conectados através da ligação glicosídica β -1,4. A estrutura química da lactose está representada na figura 1.

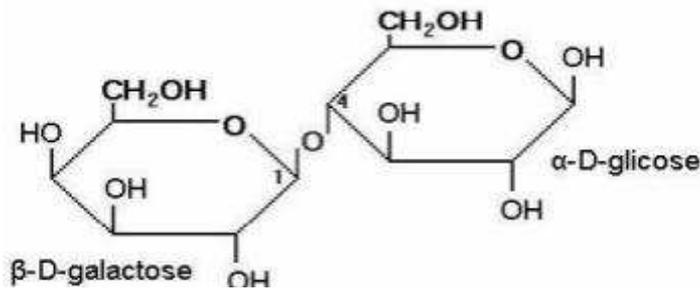


Figura 1 – Estrutura química da lactose. CAMPBELL (2000)

A lactose é caracterizada por um pó branco, cristalino, solúvel em água, insolúvel em álcool e éter, que se apresenta principalmente no leite, e por isso é denominado também de açúcar do leite. Contudo a sua utilidade em produtos lácteos é bastante limitada devido ao seu baixo poder adoçante, à sua baixa solubilidade, forte tendência a adsorver sabores e odores e possui incapacidade de ser fermentado por diversos microorganismos (BRITO, 2007).

A lactose é um importante componente abundante no leite e do soro de leite, utilizados nos produtos alimentares, e é bastante limitada devido a sua baixa solubilidade e indigestibilidade em muitos indivíduos. Por esta razão, a lactose é frequentemente hidrolisada antes da utilização. A hidrólise é uma reação necessária para a digestão da lactose que é realizada pela enzima lactase.

O processo de hidrólise pode ser realizado por ácidos ou pelo tratamento enzimático com enzimas. A hidrólise ácida da lactose do soro pode ser empregada na produção de um hidrolisado que é fonte de carbono para a produção de etanol por fermentação de microorganismos. A hidrólise enzimática da lactose presente no soro ou na lactose pura tem sido aplicada em diversas configurações dependendo do reator e das propriedades das enzimas a serem utilizadas (HATZINKOLAU et al., 2005).

Os monossacarídeos de glucose e galactose formados a partir da hidrólise da lactose por β -galactosidase ou lactase é um procedimento de grande importância na indústria

alimentar, devido aos efeitos benéficos sobre a assimilação dos alimentos que contenham lactose, bem como as vantagens na aplicação industrial, seja ela tecnológica ou ambiental (JURADO et al., 2002).

A hidrólise da lactose é um processo que agrega valor ao soro do queijo, o qual passará de um efluente a subproduto e resolverá assim problemas causados pela lactose. Além disso, a lactose na sua forma não hidrolisada é inadequada a pessoas que apresentam intolerância a esse dissacarídeo. Entretanto, grande parte da população mundial não pode desfrutar dos benefícios proporcionados pelo leite devido a algum grau de rejeição aos produtos e seus derivados. Apesar de ser pouco diagnosticada, a intolerância à lactose é um problema comum, estimado em 20 a 25% na população brasileira. (FREITAS, 2007).

De acordo com Schlimme e Buchheim (2002), a hidrólise da lactose é cada vez mais importante para o consumo humano, pois modifica a solubilidade da lactose, o dulçor, o poder redutor e a fermentabilidade e consegue-se, sobretudo, fazer com que seja digerível pelos consumidores intolerantes a esse carboidrato, pois seus derivados são de grande importância nutricional. Assim, a hidrólise da lactose agrega valor ao soro evitando o seu descarte sem tratamento e reduz os custos gastos com tratamento de efluentes.

2.3 Caseína

A caseína é o principal componente protéico do leite, constituindo aproximadamente 80% da fração de proteínas do leite (LAMOTHE et al., 2007; MICHAELIDOU, 2008; OLALLA et al., 2009).

Extensas pesquisas estão sendo realizadas *in vitro* e em modelos animais e tem sugerido que os peptídeos derivados da caseína não são apenas nutrientes, mas também uma excelente fonte de peptídeos de baixo peso molecular com potencial atividade biológica (LAMOTHE et al., 2007). Esta proteína pode ser aplicada em diferentes áreas, tais como: fabricação de queijos, fórmulas infantis, fabricação de revestimentos de papel, adesivos, tintas, cimentos, têxteis e cosméticos (MIER et al., 2008).

2.4 Enzimas

Enzimas são macromoléculas de natureza protéica ou glicoprotéica, apresentam atividade intracelular ou extracelular, que atuam acelerando as reações bioquímicas, reduzindo a energia de ativação necessária para converter o substrato no produto, sem alterar

o equilíbrio da reação. Elas convertem uma substância chamada de substrato para outra chamada de produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. A velocidade de reação catalisada por uma enzima é aumentada devido à redução de energia de ativação necessária para converter o substrato em produto.

De acordo com Oliveira (2007), enzimas são catalisadores de reações na sua maioria inorgânicos, e possuem vantagens de serem facilmente encontradas na natureza e que também apresentam maior atividade catalítica e alta especificidade, além de elevada sensibilidade ao controle catalítico. É definida como um biocatalisador, de natureza protéica e define algumas propriedades, tais como: especificidade de substrato, dependência da temperatura e pH (FABER, 2004). As enzimas são as moléculas preferíveis a outros catalisadores químicos, pois elas apresentam propriedades como: estabilidade, atividade e especificidade (FURLONG, 2000; GALVÃO, 2004).

A estabilidade é a capacidade catalítica de uma enzima e depende de sua estrutura nativa, a qual é conservada por forças de interação. Durante as reações podem ocorrer alterações no ambiente reacional e podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e causando perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Sendo assim, a estabilidade da enzima pode ser afetada caso ocorra variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

A atividade enzimática é dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de determinadas condições. A atividade da enzima pode ser calculada com a enzima na forma pura, e em tais condições que permitam que a velocidade da reação seja máxima, o que denota que o substrato deve estar em elevada concentração, de modo a permitir que toda a enzima esteja convertida em um complexo ativado.

A especificidade de uma enzima consiste na capacidade da enzima ser seletiva a ligações, substratos ou grupos de substratos e se baseia nas interações que ocorrem entre a molécula do substrato ou na presença de agente inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas.

No setor industrial as enzimas utilizadas são quase em sua totalidade produzidas por microrganismos. O uso de enzimas se torna atraente quando permite que pequenas quantidades sejam suficientes para catalisar reações específicas devido a sua grande eficácia em condições suaves. Sua alta seletividade faz com que as enzimas sejam extremamente úteis em processos que envolvam oxidações, condensações ou hidrólises, principalmente se o produto final for designado a fins alimentícios e diversos estudos com enzimas tem-se

intensificado a fim de desenvolver e melhorar a tecnologia enzimática, como a área de alimentos, biocombustíveis, farmacêutica, dentre outras (ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009). Na década de 60 a tecnologia enzimática apareceu como área de investigação, com o processo de imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

Assim, as enzimas são geralmente comercializadas na presença de aditivos ou na forma imobilizada que tem a capacidade de proteger a proteína da inativação durante a estocagem (ZANIN E MORAES, 2004) e sua utilização na forma imobilizada pode ser economicamente vantajosa, pois a imobilização da enzima promove um aumento significativo na estabilidade e possibilidade de sua reutilização (HERNAIZ e CROUT, 2000).

2.4.1 Lactase

A enzima β -galactosidase é codificada pela Enzyme Commission sob o número 3.2.1.23 (KLEIN, 2010), é uma proteína habitualmente chamada de lactase, é produzida maioria pelos seres vivos e estão distribuídas na natureza de acordo com suas multiplicidades de funções. A β -galactosidase é classificada como uma hidrolase, que se trata de uma enzima onde a água participa na quebra das ligações covalentes do substrato (SANTIAGO et al., 2004). São encontradas basicamente em microorganismos, como bactérias, leveduras, fungos e no trato intestinal dos mamíferos (VINHAL, 2001).

Apesar das várias fontes de lactase existentes, nem todas são aceitas ou reconhecidas como seguras quando a enzima está sendo empregada na tecnologia alimentícia. A levedura *Kluyveromyces lactis* é a principal fonte comercial de β -galactosidase, porque seu habitat natural é o ambiente do leite, e destaca marcante atividade na hidrólise de lactose (GÉKAS e LOPEZ, 1985).

A legislação brasileira destaca por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos tem por obrigação ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006).

A enzima β -galactosidase é cada vez mais utilizadas na indústria de laticínios. A sua capacidade como ótimo biocatalisador para a hidrólise da lactose do leite e soro permite a produção de produtos lácteos com baixo teor de lactose para pessoas intolerantes a este açúcar, aproximadamente 75% da população mundial, e serve para reciclagem do soro para utilizá-lo como aditivos para a alimentação humana e de animais (LADERO et al., 2006).

A hidrólise da lactose presente no leite e em seus derivados através da de β -galactosidase pode promover inúmeros benefícios a citar: aliviar sintomas de intolerância à lactose; promover melhorias tecnológicas no processo, minimizando ou eliminando problemas relacionados com a baixa solubilidade e baixo dulçor da lactose. Além disso, a hidrólise enzimática da lactose pode ser realizada tanto por enzimas livres como por imobilizadas e que pode gerar uma redução significativa no tempo de processos fermentativos, na fabricação de iogurtes e queijos, por exemplo. Outro benefício de grande importância é a possibilidade de agregar valor aos rejeitos produzidos pela indústria produtora de queijo, cujo descarte inadequado constitui um grave problema ambiental (PANESAR et al., 2010; PRAZERES et al., 2012).

Na tecnologia de alimentos esta enzima é amplamente empregada devido a sua variável aplicação em ingredientes com lactose ser reduzida em alimentos. A β -galactosidase apresenta diversas potencialidades de aplicabilidade, que se encontram sintetizada na tabela 1.

Produção de leite com baixo teor de lactose
Obtenção de produtos derivados do leite com baixa concentração de lactose
Produção de iogurtes adoçados
Incorporação em medicamentos para combater a intolerância à lactose
Obtenção de concentrados para sorvetes com baixa concentração de lactose
Produção de xaropes alimentares
Tratamento enzimático na produção de queijo
Processamento da lactose contida no soro e permeado de soro

Tabela 1 – Aplicações biotecnológicas da enzima β -galactosidase (OLIVEIRA, 2005)

A β -galactosidase é comercialmente disponível e utilizada em processos de larga escala. Existem basicamente duas formas de utilização dessa enzima, na forma solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada e na forma imobilizada, que ocorre em operação contínua. Na sua forma livre ou solúvel as enzimas apresentam algumas propriedades peculiares, tais como a sua não reutilização, alta sensibilidade, vários agentes desnaturantes e presença de efeitos sensoriais ou efeitos toxicológicos, podem dificultar a efetiva utilização de enzimas (GÉKAS e LOPEZ, 1985; NIJPELS et al., 1981).

Muitas destas restrições indesejáveis podem ser superadas por meio da utilização de enzimas imobilizadas. Devido ao alto custo da enzima, o sistema de imobilização continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres. A lactase quando

imobilizada possuem vantagens que permitem a sua reutilização, facilitando o controle de processo e otimização do rendimento e na qualidade do produto, como também não se misturam com o produto final, tornando-se mais estáveis. No entanto, apresentam algumas limitações que devem ser consideradas como à perda de atividade catalítica durante a imobilização, problemas na transferência de massa, discriminação física entre o catalisador e o fluido (SALIS et al., 2003).

2.4.2 Neutrase

Aproximadamente 60% das enzimas utilizadas nos setores industriais são as proteases, vastamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Na indústria alimentar essas proteases são utilizadas como auxiliares no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, laticínios, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada eflavorizantes (FURLAN e OETTERER, 2002).

Algumas proteases são produzidas por microorganismos, dentre os mais comuns são dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (DINIZ & MARTIN, 1999). A neutrase é uma endopeptidase produzida a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* e esta enzima tem sido relatada como uma potente proteinase para a hidrólise de proteínas (BEAK e CADWALLADER, 1995; SHAHIDI et al., 1995).

A Neutrase (EC 3.4.24.28) é uma protease bacteriana comercial apropriada para a produção de pequenas peptídeos (KAMMOUN et al., 1999), uma enzima que atrai interesse considerável principalmente na indústria de alimentos, devido a sua variedade de aplicações possíveis, como por exemplo: produção de proteínas de alimentos funcionais por hidrólise de feijão mungo (LI et al., 2005), glúten de milho (APAR et al., 2007), proteína do soro de queijo (SHIN et al., 2007), hidrólise da proteína do peixe tilápia (RAGHAVAN E KRISTINSSON, 2008), e de soja (BAO et al., 2008), na melhoria da textura e no sabor dos produtos lácteos (KUMAR et al., 2000), e na síntese de peptídeos em meios orgânicos (CLAPÉS et al., 1997). Além disso, a enzima neutrase pode ser empregada como antioxidantes de origem natural e aumentar a informação sobre o mecanismo de efeito antioxidante (DRYAKOVA, 2010) e anti-inflamatório (SENEVIRATHNE, 2010).

A neutrase hidrolisa proteínas do soro de queijo, um subproduto altamente poluente que é descartado pelas indústrias de laticínios e com o processo de hidrólise pode-se obter derivados com melhores propriedades funcionais. Estes derivados apresentam-se aptos para a

preparação de alimentos para pessoas que necessitam de dietas especiais ou com falhas congênitas no metabolismo de proteínas.

A imobilização da enzima neutrase oferece vantagens consideráveis, com a possibilidade de processamento contínuo, a reutilização da enzima, redução de autodigestão, como também poderá potencializar sua aplicação no setor industrial.

2.5 Imobilização Enzimática

A utilização de enzimas na indústria alimentícia vem crescendo gradativamente, porém seu uso apresenta custo elevado. Com o intuito de reduzir esse valor e possibilitar o emprego da tecnologia enzimática em diferentes segmentos industriais, alguns estudos buscam métodos para desenvolver e aprimorar a imobilização de enzimas.

O termo imobilização é empregado para descrever a retenção ou confinamento de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente delimitadas ou localizadas numa certa região do espaço, especificamente em suportes. No caso das enzimas, a sua imobilização em um suporte, pode proceder em melhorias no seu comportamento catalítico, e, reduzir a sua inativação por distorção de sua estrutura nativa (sítio ativo) pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, o que se torna um atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial (BRADY e JORDAAN, 2009; MENDES, et al., 2011a).

A grande vantagem da aplicação de enzimas imobilizadas é em comparação a sua forma livre, a possibilidade de reutilização do biocatalizador imobilizado, além disso, a utilização de enzimas imobilizadas facilita a sua separação no meio reacional, não havendo contaminação do seu produto final, visto que, em sua forma imobilizada não é solúvel no meio de reação o que evita a necessidade de separar as enzimas e as impurezas do sistema de reação que se segue durante o processamento. Dessa forma, numerosas técnicas e suportes têm sido desenvolvidos com a finalidade de aprimorar a imobilização de enzimas e otimizar sua aplicação (GROSOVÁ et al., 2008).

Enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas e apresentam vantagens na sua reutilização como: facilidade de recuperação da enzima e do produto, reutilização do suporte e a redução dos custos com o processo contínuo, facilidade durante a interrupção das reações enzimáticas, grande variedade de reatores com enzimas imobilizadas e em muitos casos pode ocorrer o melhoramento no desempenho do biocatalisador (GROSOVÀ et al., 2008; KRAJEWSKA, 2004).

O processo de imobilização de uma enzima pode ser obtido mediante uma suspensão em solução tampão e em suportes adequados para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se economicamente viável. Deve-se considerar o tipo de suporte empregado assim como o método utilizado durante a imobilização. O suporte e a enzima não são superfícies que se complementam e logo após a primeira ligação entre eles, a enzima perde sua seu poder de flexibilidade.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta, pois permite a sua reutilização e pode reduzir a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, o que pode ser atrativo e importante para o setor industrial, pois para que a aplicação de enzimas no setor industrial seja propícia faz-se necessário a obtenção de biocatalisadores ativos e estáveis termicamente (LOPEZ-GALLEGO et al., 2005).

Dessa forma, durante o processo de imobilização, deve-se atentar para algumas questões como: mudanças na estrutura conformacional da enzima que levem a sua imobilização numa forma inativa; perda da atividade catalítica e perdas de massa de enzima; efeitos difusionais ou de transferência de massa, em decorrência de limitações entre substrato/enzima e do produto para o seio da solução; o custeio da imobilização deve ser compensado com vida útil do biocatalisador (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011a).

Com o objetivo de tornar viável a sua aplicação industrial, a tecnologia de imobilização enzimática deve-se considerar os seguintes parâmetros: custo de imobilização, retenção da atividade enzimática, estabilidade térmica da enzima, estabilidade da atividade enzimática em diferentes pHs, número de ciclos da enzima, características de resistência e custeio do suporte (BON, 2008).

2.6 Coimobilização

Coimobilizar ou multi-imobilizar é uma técnica que consiste na imobilização de diferentes biorreceptores em um mesmo suporte ou região. De acordo com Logan e Clark (2007) a multi-imobilização de biorreceptores em suportes sólidos pode suceder pela imobilização de diferentes biorreceptores em áreas específicas do suporte, por meio de qualquer estratégia de imobilização seja ela covalente, adsorção, armadilhamento ou afinidade. Sendo assim, podemos salientar as seguintes vantagens da coimobilização:

- Esta aplicação promove a detecção de íons de metais pesados através da utilização de diferentes enzimas, com diferentes sensibilidades a íons específicos, resultando

na medição da toxicidade total de uma amostra qualificando os resultados esperados (SOLDATKIN et al., 2012);

- Permite uma simplificação de etapas em processos que exijam múltiplas etapas reduzindo tempo e custos (TABOADA-PUIG, 2011);
- Aumento na sensibilidade do biossensor (CHEN et al., 2011);
- Reduz a distância entre sítios catalíticos de reações em cascata, reduzindo os efeitos de difusão e diminuindo efeitos sobre compostos intermediários instáveis mimetizando os canais metabólicos existentes nas células (SCHOFFELEN e HEST, 2012).

2.7 Métodos de Imobilização Enzimática

A imobilização enzimática consiste numa etapa minuciosa e necessária para a construção de um biossensor eficaz. Na busca por novas tecnologias, tem-se pesquisado a utilização de catalisadores biológicos imobilizados em suportes diversos. Existem diversas maneiras de imobilizar uma enzima qualquer que seja o suporte, dependendo da finalidade e do sistema a ser utilizado. Nesse contexto é possível definir as principais formas de imobilização enzimática: imobilização no interior do suporte; por meio de membrana e a imobilização na superfície de um suporte por meio de adsorção, de ligação covalente cruzada ou covalente (ALDRY et al., 2012).

Os métodos básicos de imobilização estão demonstrados na figura abaixo

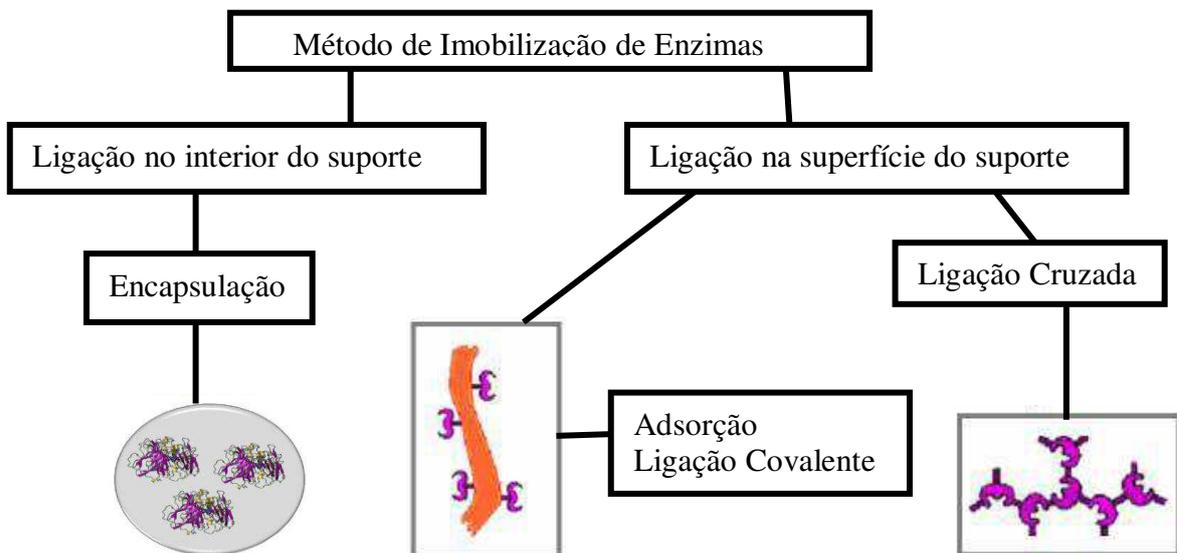


Figura 2– Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA et al., 2004)

No método de encapsulação as enzimas podem ser aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, microcápsulas, filmes ou através da separação por membranas, na qual a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável. A separação por membranas pode acarretar limitações difusionais intensas (BARON, 2008). Esse método é muito simples, e possui a capacidade de dar maior estabilidade de armazenamento ao biossensor, evitando desnaturação e aumento nos atributos operacionais do mesmo.

A imobilização por adsorção representa a maneira mais simples e rápida e é muito empregada para imobilizar enzimas. Esse procedimento consiste em dissolver a enzima em uma solução, e em seguida colocá-la em contato com a superfície do suporte por um determinado período de tempo. Logo depois, o material excedente, não adsorvido é removido após ser enxaguado. Nesse método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; MOLDES; SANROMÁN, 2012; ZHENG et al., 2012; ZHOU et al., 2012). Este tipo de imobilização proporciona uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e, dessa forma, não promove a perda da atividade catalítica (VINU et al., 2005).

A ligação covalente cruzada ou cross-linking aborda a utilização de um agente externo durante o procedimento de imobilização. Esse agente consiste no uso de reativos bifuncionais que proporcionam uniões intermoleculares entre enzima, resultando em ligações irreversíveis, capazes de resistir a condições extremas de pH e temperatura (ARROYO, 1998). Uma das vantagens dessa técnica é que ela cria uma interação enzima-enzima mais sólida evitando lixiviação da mesma, entretanto, por essa mesma razão barreiras de difusão podem ser criadas, aumentando o tempo de resposta do eletrodo. A imobilização por ligação cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Esta é uma técnica utilizada amplamente na estabilização de muitas enzimas. Como desvantagens do método estão à baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade (SHELDON, et al., 2007).

O método de ligação covalente é o mais utilizado para o processo de imobilização enzimática. Neste método a enzima é aprisionada no suporte através da ligação covalente entre os grupos funcionais reativos do suporte e os grupos reativos terminais da enzima. A força desta ligação é elevada e normalmente abrange vários resíduos da enzima

proporcionando uma elevada rigidez na estrutura da mesma (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009; MILETIĆ et al., 2009). Essa rigidez tem por finalidade manter a estrutura da enzima inalterada em presença de agentes desnaturantes como variação de temperatura, solventes orgânicos, pH extremos e outros (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009; MILETIĆ et al., 2009). A ligação covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método de imobilização mais interessante do ponto de vista industrial.

Para esses métodos devemos considerar duas características importantes, a estabilidade no armazenamento e a estabilidade operacional. Além disso, para a seleção dos métodos é necessário levar em conta a atividade, regeneração e inativação do biocatalisador, custo do procedimento de imobilização e as propriedades hidrodinâmicas para a enzima imobilizada (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011a; ILLANES et al., 2012).

2.8 Suportes para imobilização Enzimática

Para que seja possível realizar a imobilização de enzimas, diferentes suportes têm sido empregados como matrizes para esse processo. De acordo com Galvão (2004), os suportes empregados para imobilização de enzimas abarcam uma grande variedade de materiais, como matrizes inorgânicas (naturais e sintéticos) e orgânicas (minerais e fabricados). A tabela 2 apresenta a classificação de suportes de imobilização de acordo com sua composição.

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

Tabela 2 – Classificação dos suportes conforme a composição (GALVÃO, 2004).

Os suportes para imobilização podem ainda ser classificados como porosos ou não porosos. Os porosos apresentam grande área superficial interna disponível para a imobilização e apresentam capacidade de proteger a enzima contra turbulências externas, já os suportes não porosos incluem a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas

eliminam o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido (GALVÃO, 2004). Dessa forma, nota-se que a morfologia do suporte para realizar a imobilização de enzimas é muito importante, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permite ter uma grande área superficial intensa para a imobilização da enzima e os interstícios com diâmetro suficiente para possibilitar o fácil acesso da enzima e do substrato (VIEIRA, 2009).

Para Vieira (2009), o suporte necessita ser quimicamente resistente nas condições de ativação durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação, e assim possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo que permitam a ligação da enzima sem desnaturá-la. Vale destacar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo mudar sua estabilidade frente ao pH e temperatura.

Durante o processo de imobilização a enzima é normalmente prendida a um suporte por ligações químicas, isto favorece a estabilidade do biocatalisador diminuindo a desativação da enzima (CARPIO et al., 2000). Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas tanto suas propriedades físicas como também químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. De acordo com Mendes et al.,(2011) as principais características a serem analisadas para seleção de um suporte para uma determinada aplicação:

- ✓ Área superficial;
- ✓ Permeabilidade;
- ✓ Insolubilidade;
- ✓ Capacidade de regeneração;
- ✓ Morfologia e composição;
- ✓ Natureza hidrofílica ou hidrofóbica;
- ✓ Resistência ao ataque microbiano;
- ✓ Resistência mecânica;
- ✓ Custo.

A morfologia do suporte é de grande relevância, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permitirá ter uma grande área superficial interna para a imobilização da enzima e os poros deve apresentar diâmetro suficiente que permita o fácil acesso da enzima e do suporte. Por esta razão, torna-se importante a seleção de um suporte que contenha uma concentração de grupos reativos suficiente para promover uma boa adsorção e um método de ativação adequado que permita obter uma concentração ideal de grupos reativos na superfície

do suporte para interagir com os grupos ativos da enzima, preservando e conservando a estrutura enzimática (BOLIVAR et al., 2009).

2.8.1 Quitosana

Na biotecnologia existem diversos suportes orgânicos naturais empregados na imobilização de enzimas dos quais se destaca a quitosana. A aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas deve-se às suas diferentes fontes como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras, incluindo também a presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, os quais permitem sua utilização em diferentes métodos de imobilização (KUMAR et al., 2000; BERGER et al., 2004).

A quitosana é um polissacarídeo essencialmente constituído por uma estrutura molecular similar a celulose, distinguindo somente nos seus grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004). Ver figura 3.

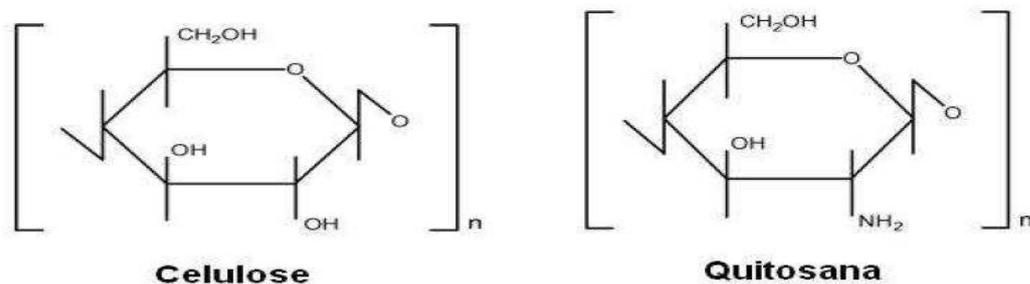


Figura 3 - Estrutura dos biopolímeros de celulose e quitosana (BERGER et al.,2004)

A quitosana é um produto natural, de baixo custo comercial, renovável e biodegradável e apresenta grande importância econômica e ambiental. Segundo Mendes et al., (2011), é obtida a partir da desacetilação da quitina, segundo polímero mais abundante na natureza e o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e em alguns insetos, como também na parede celular de alguns fungos.

As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos são considerados como poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado e estocado (VIEIRA, 2009).

Os materiais a base de quitina e quitosana apresentam conjunto único de características como: biocompatibilidade, biodegradabilidade de produtos inofensivos, não toxicidade, inércia fisiológica, propriedades antibacterianas, agentes quelantes de metais

pesados, íons com propriedades de formação de gel e de hidrofiliçidade, e afinidade notável para as proteínas (KRAJEWSKA, 2004). Devido à presença dessas características, os materiais oriundos de quitina e quitosana ou a base deles estão viáveis para ser amplamente explorados na biotecnologia, especialmente em muitas aplicações, entre outros, como suportes de imobilização de enzimas.

2.8.2 Alginato de Sódio

O alginato é um biopolímero, proveniente do ácido algínico, encontrado na natureza, extraído principalmente de algas marinhas marrons, pertencentes à classe *Phaeophyceae*, que constituem a principal fonte de obtenção de alginatos. Possui como benefício ser não tóxico para imobilização de células e é aceito como aditivo alimentício (LEE e HEO, 2000). O alginato de sódio ou algina é composta principalmente pelo sal sódico do ácido algínico, polímero linear do ácido L-gulurônico (G) e do ácido D-manurônico (M). Este último é o principal componente, mas há alguma variação, dependendo da alga que ela se origina e está representado na figura 4.

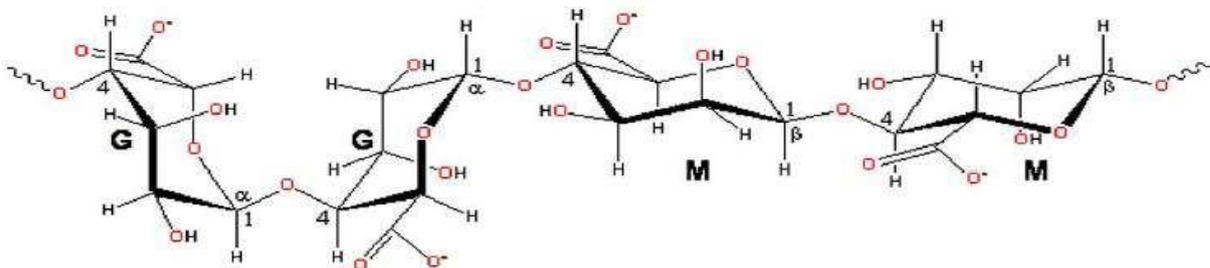


Figura 4 – Estrutura química do alginato – G (ácido gulurônico) e M (ácido manurônico) (LEONARD et al. 2004).

O alginato de sódio apresenta-se na forma de pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, na cor branca amarelada, na solubilização em água forma uma solução coloidal viscosa e seus sais apresentam propriedades úteis na produção de géis (ADRIANO, 2008). Os quais podem ser usados na indústria alimentícia, farmacêutica e fabricação de cosméticos, como também compreende aplicação na geleificação para vários fins como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas. (ADRIANO, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a coimobilização da enzima lactase e proteases em um mesmo suporte de quitosana e alginato de sódio com uma comparação de diferentes metodologias visando à hidrólise da lactose e das proteínas proveniente do soro de queijo.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar da coimobilização das enzimas lactase e neutrase para utilização na indústria de leite para hidrólise da lactose e de proteínas;
- Estabelecer e discutir quais os principais métodos de análise, para quantificar o rendimento de coimobilização a serem implantados no laboratório;
- Ampliar a estabilidade das enzimas, assim como a sua reutilização, gerando menores custos para a indústria;
- Adicionar valor ao soro de leite para promover o aproveitamento do rejeito industrial (soro de queijo), que contém proteínas e lactose;
- Comparação da enzima livre com a enzima imobilizada e coimobilizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Suportes

Foram utilizados como suportes para imobilização a quitosana em pó apresentando um grau de desacetilação de 85,2%, adquirido junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará e o Alginato de Sódio adquirido comercialmente da Vetec – São Paulo.

4.1.2 Reagentes utilizados para o tratamento dos suportes

Para tratamento dos suportes, utilizaram-se os seguintes reagentes: ácido clorídrico 37% (m/v), hidróxido de sódio P.A., fosfato de potássio monobásico P.A. , fosfato de potássio dibásico P.A., cloreto de manganês P.A., cloreto de magnésio P.A., dentre outros reagentes, todos de grau analítico e marcas diversas.

4.1.3 Enzimas

- β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluveromyces lactis*, Lactozyme* 2600L, $1074 \pm 41,32 \text{ U}_{\text{LAC}} \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato, da marca Sigma Chemical Company (St Louis).
- Protease de *Bacillus amyloliquefaciens* 0.8U/g, $75790 \pm 6,126 \text{ U}_{\text{NEU}} \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato, da marca Sigma Chemical Company (St Louis).

4.1.4 Agente ativante

Glutaraldeído a 5% (v/v) comercializado pela Vetec - São Paulo.

4.1.5 Substratos

Utilizaram-se lactose P.A e caseína obtida do leite bovino, adquiridas junto a Sigma Chemical Company (St Louis).

4.1.6 Reagentes para análise da glicose

A concentração de glicose das amostras foi determinada pelo método enzimático colorimétrico empregando kit enzimático para determinação de glicose (Labtest, Diagnóstico), com leitura da absorbância a 550nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2 MÉTODOS

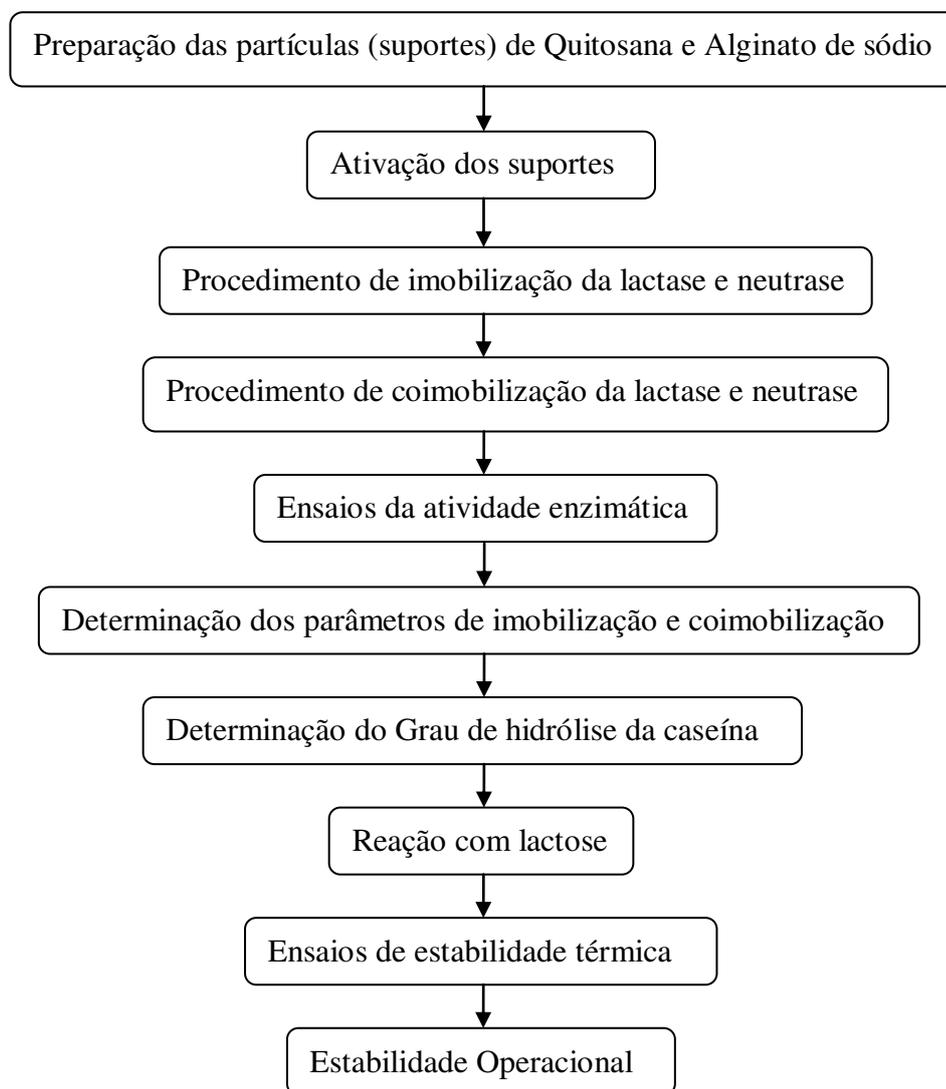


Figura 5 – Fluxograma mostrando os métodos utilizados

4.2.1 Preparação das partículas de quitosana 4% (m/v)

A quitosana em pó foi dissolvida em solução de ácido acético 5% v/v. A solução resultante foi homogeneizada por 30 minutos sob agitação mecânica constante, logo após, o xarope formado, foi lentamente gotejado à solução de NaOH 0,1M na razão de 1/10 (v/v) e mantido sob agitação moderada por um período de 4 h a temperatura ambiente. Após este procedimento o suporte obtido foi filtrado e lavado exaustivamente com água destilada até a neutralidade. O procedimento para obtenção das partículas de quitosana 4% (m/v) está esquematizado através da figura 6.

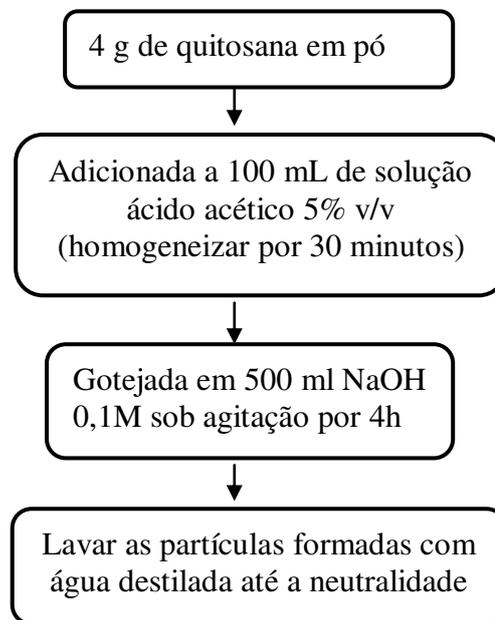


Figura 6 – Fluxograma mostrando a preparação das partículas de quitosana 4% (m/v)

4.2.2 Preparação das partículas de alginato de sódio 2,5% (m/v)

O alginato de sódio em pó foi dissolvido em água até 2,5% m/v. A solução resultante foi mantida em agitação mecânica constante por 30 minutos, posteriormente, a solução formada foi lentamente gotejada em solução de 500 mL de CaCl₂ em 2% (m/v) água e mantido sobre agitação moderada por um período de 4 horas. Logo após, as partículas foram lavadas exaustivamente com água destilada.

A figura 7 ilustra o procedimento de preparação das partículas de alginato de sódio 2,5% (m/v).

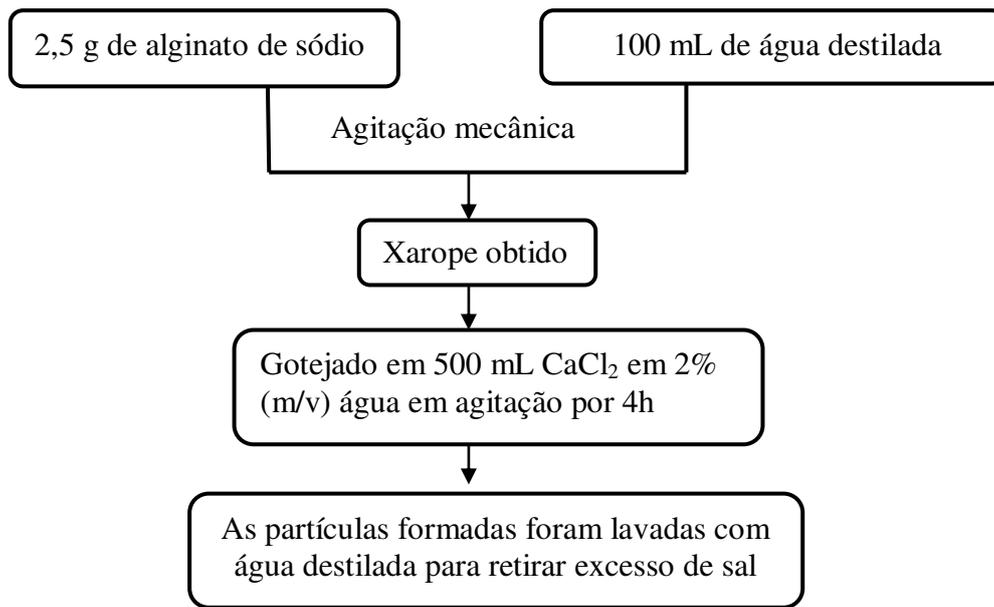


Figura 7 - Fluxograma mostrando a preparação das partículas de alginato de sódio 2,5% (m/v)

4.2.3 Ativação dos suportes de quitosana para imobilização e coimobilização das enzimas

A ativação do suporte de quitosana foi realizada com glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 8,0 por 30 minutos a 25°C para a neutrase e em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0 adicionado 2mM MgCl₂ e 0,1 mM MnCl₂ em agitação por 30 minutos a 25°C para a lactase. Após a ativação, as partículas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e filtrado a vácuo. A figura 8 mostra os suportes de quitosana após ativação com glutaraldeído 5% (v/v).



Figura 8 - Partículas de quitosana ativadas com glutaraldeído 5% (v/v)

4.2.4 Ativação do suporte de alginato de sódio para imobilização e coimobilização das enzimas

A ativação do suporte de alginato de sódio foi realizada com glutaraldeído 2,5% v/v em tampão borato de sódio 0,1M, pH 8,0 por 30 minutos a 25 °C para a neutrase e tampão borato de sódio 0,1M, pH 7.0 adicionado 2mM MgCl₂ e 0,1 mM MnCl₂ em agitação por 30 minutos a 25 °C para a lactase. Após a ativação, as partículas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e filtrado a vácuo. A figura 9 representa as partículas de alginato de sódio após ativação com glutaraldeído 2,5% (v/v).



Figura 9 - Partículas de alginato de sódio ativadas com glutaraldeído 2,5% (v/v)

4.2.5 Procedimento de imobilização

Após preparação e ativação dos suportes, realizou-se o procedimento de imobilização das enzimas, conforme esquematizados na figura 10.

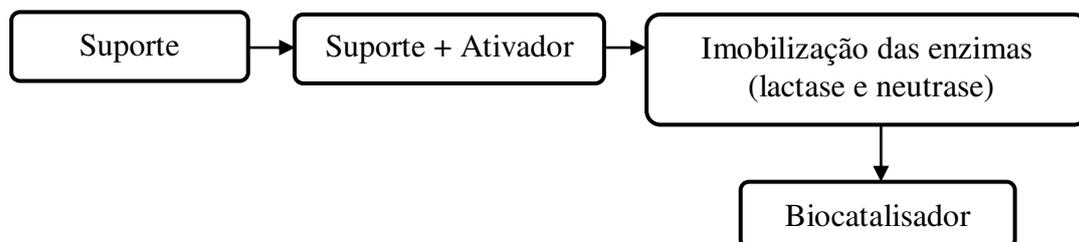


Figura 10 - Fluxograma do procedimento de imobilização da enzima em diferentes suportes

Para certificar-se que durante o processo de imobilização e coimobilização as atividades enzimáticas não decresciam, durante o período de incubação foi acompanhado paralelamente a possível queda da atividade, reservando uma pequena alíquota da solução enzimática utilizada para imobilização e verificada sua atividade hidrolítica seguindo os itens 3.2.7.1 e 3.2.7.2.

4.2.5.1 Procedimento de imobilização da neutrase

Uma vez ativados, as massas dos suportes foram medidas e adicionados 9,0 mL de uma solução tampão com carga enzimática oferecida de $221U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte e colocados sob agitação por 3h a 25°C. Para determinar as soluções tampões e pH para cada tipo de suporte e enzima, foram realizados testes prévios e determinada as melhores condições a seguir: solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 8,0 para suporte quitosana e solução tampão borato de sódio 0,02M em pH 8,0 para o suporte de alginato de sódio. Após a imobilização os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual.

4.2.5.2 Procedimento de imobilização da lactase

Uma vez ativados, as massas dos suportes foram medidas e adicionados 9,0 mL de uma solução tampão com carga enzimática oferecida de $20U_{LAC}\cdot g^{-1}$ de suporte e colocados sob agitação por 3h a 25°C. Para determinar as soluções tampões e pH para cada tipo de suporte e enzima, foram realizados testes prévios e determinada as melhores condições a seguir: solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 7,0 adicionado 2mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$ para suporte quitosana e solução tampão borato de sódio 0,02M em pH 7,0 adicionado 2mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$ para o suporte de alginato de sódio. Após a imobilização os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual.

4.2.6 Procedimento de coimobilização

Depois de realizada imobilização da neutrase ou lactase, realizou-se a coimobilização das enzimas, de acordo com os procedimentos abaixo:

4.2.6.1 Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase

Uma vez ativados, as massas dos suportes foram medidas e adicionados 9,0 mL de uma solução tampão com carga enzimática de oferecida de $20U_{LAC}.g^{-1}$ de suporte e colocados sob agitação por 3h a $25^{\circ}C$. Após a imobilização, os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual. Posteriormente, aos suportes contendo lactase imobilizada foram adicionados 9,0 mL de uma solução neutrase com carga oferecida de $221U_{NEU}.g^{-1}$ e colocados em agitação por mais 3h a $25^{\circ}C$, em tempo total de 6 h de processo. Para determinar as soluções tampões e pH para cada tipo de suporte e enzima, foram realizados testes prévios e determinada as melhores condições a seguir: solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 8,0 para suporte quitosana e solução tampão borato de sódio 0,02M em pH 8,0 para o suporte de alginato de sódio. Após a imobilização, os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual. Ver esquema na Figura 11.

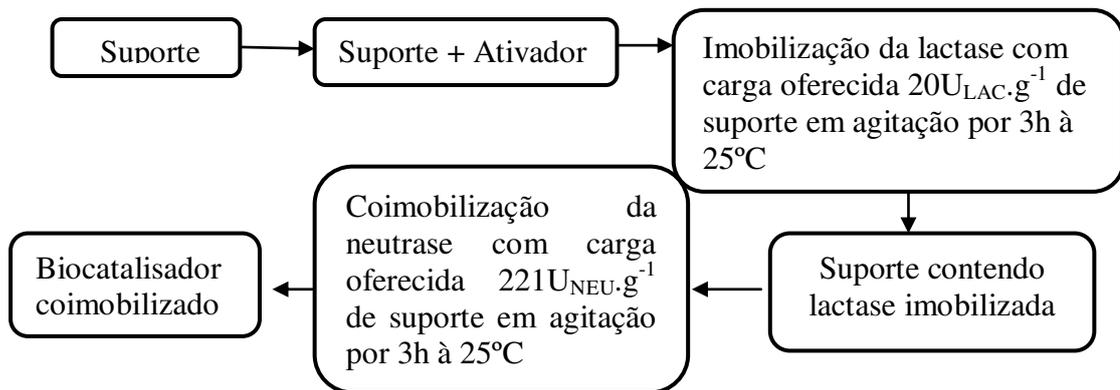


Figura 11 - Fluxograma do procedimento de imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase em diferentes suportes

4.2.6.2 Imobilização de neutrase seguida da coimobilização da lactase

Uma vez ativados, as massas dos suportes foram medidas e adicionados 9,0 mL de uma solução tampão com carga enzimática oferecida de $221U_{NEU}.g^{-1}$ de suporte e colocados sob agitação por 3h a $25^{\circ}C$. Após a imobilização os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual. Posteriormente, aos suportes contendo lactase imobilizada foram adicionados 9,0 mL de uma solução de lactase com carga oferecida de $20U_{LAC}.g^{-1}$ e colocados em agitação por mais 3h a $25^{\circ}C$ em um tempo total de 6 h de

processo. Para determinar as soluções tampões e pH para cada tipo de suporte e enzima, foram realizados testes prévios e determinada as melhores condições a seguir: solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 8,0 para suporte quitosana e solução tampão borato de sódio 0,02M em pH 8,0 para o suporte de alginato de sódio. Após a imobilização os derivados obtidos foram lavados com solução tampão para eliminação da enzima residual. Ver esquema na Figura 12.

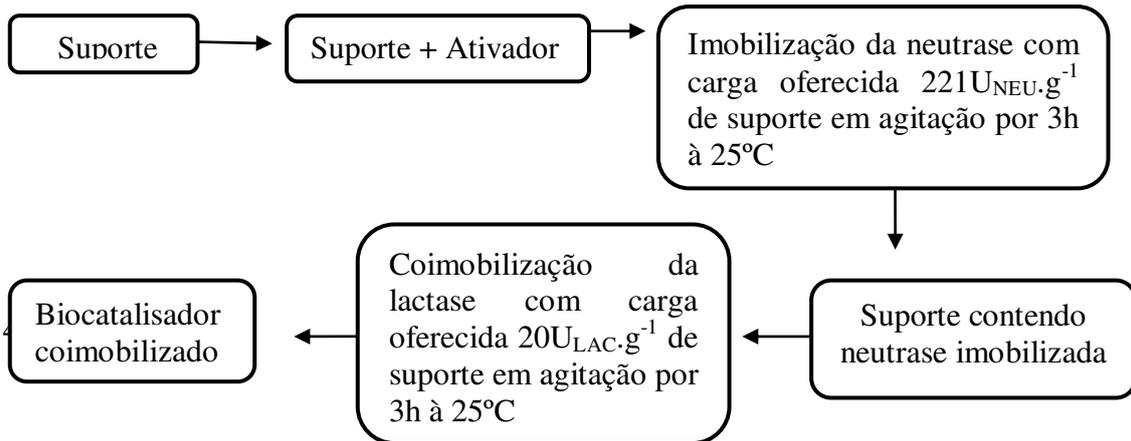


Figura 12 - Fluxograma do procedimento de imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase em diferentes suportes

4.2.6.3 Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

Uma vez ativados, as massas dos suportes foram medidas e adicionados 9,0 mL de uma solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 7,0 adicionado 2mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$, com cargas iniciais de $221U_{NEU}.g^{-1}$, $20U_{LAC}.g^{-1}$ e colocados sob agitação por 3h a $25^\circ C$. Após a imobilização, os derivados obtidos foram lavados com solução tampão fosfato de potássio 0,02M em pH 7,0 adicionado 2mM $MgCl_2$ e 0,1 mM $MnCl_2$ para eliminação da enzima residual. Ver esquema na Figura 13.

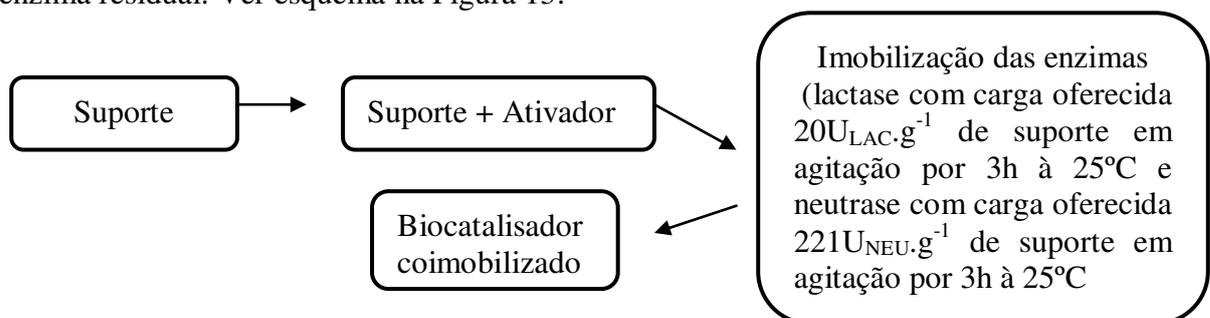


Figura 13 - Fluxograma do procedimento de imobilização da lactase e neutrase simultaneamente em diferentes suportes

4.2.7 Ensaios da atividade enzimática

4.2.7.1 Determinação da atividade hidrolítica da lactase livre, imobilizada e coimobilizada

A atividade da lactase foi determinada pela hidrólise da lactose. A reação foi conduzida em reator termostaticado contendo 5,0 mL de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2mM de $MgCl_2$ e 20 μ L de amostra da enzima previamente diluída e 0,2g do derivado imobilizado ou coimobilizado (Torres et al, 2006). A reação foi mantida a 37°C por 10 minutos e interrompida pela adição de uma solução de 0,9 M de NaOH. Glicose produzida foi quantificada pelo método GOD-PAP (Trinder, 1969).

A atividade hidrolítica da lactase foi quantificada através da concentração de glicose ($g.L^{-1}$) formada, quantificada espectrofotometricamente a 550nm. Para o branco utilizou-se apenas a lactose 5% (m/v) sem a presença da enzima.

Uma unidade de lactase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições descritas acima. A atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{[GLI] \left(\frac{mg}{ml} \right) \times Vr (mL) \times 5,5 \left(\mu \frac{mol}{mg} \right)}{Th (min) \times [Ve (mL) ou Me(mg)]} \quad (1)$$

Sendo $[GLI]$ (concentração de glicose); Vr (volume no reator); Th (tempo de hidrólise); Ve (volume da enzima); Me (massa da enzima) e 5,5 (fator de conversão de mg de glicose para μ mol de glicose).

4.2.7.2 Determinação da atividade hidrolítica da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada

A atividade da neutrase foi determinada pela hidrólise da caseína comercial. A reação de hidrólise foi conduzida em uma reator termostaticado contendo 10 mL de caseína 2% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 8,0 e 20 μ L da amostra da enzima previamente diluída e 0,2g de derivado imobilizado ou coimobilizado. A reação foi mantida a 50 °C por 10 minutos e interrompida com a precipitação através da adição de 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17% (m/v). Após centrifugação, atividade hidrolítica da neutrase foi quantificada através da concentração de tirosina formada, essa quantificação foi realizada através da curva de calibração de tirosina variando concentração de (0,01 a 0,1mg/mL)

usando como solvente o fosfato de potássio 0,1M e pH 7,0 e medido a absorvância espectrofotometricamente em comprimento de onda de 275nm. Para o branco, utilizou-se apenas a caseína 4% (m/v) sem a presença da enzima.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de tirosina por minuto, nas condições experimentais.

Com o valor da absorvância medido pelo espectrofotômetro se obteve a concentração de tirosina [Tyr] (produto da hidrólise) pela equação (2):

$$[Tyr](g/L) = \frac{Abs+0,01543}{8,45857} \quad (2)$$

Substituindo o valor encontrado pela equação (2) na equação (3), tem-se a atividade enzimática (At).

$$At(U/mL) = \frac{[Tyr]\left(\frac{mg}{mL}\right) \times Vr(mL)}{[Ve(mL) \text{ ou } Me(mg)] \times Tr(\text{min})} \quad (3)$$

Onde: Vr (volume do reator); Ve (volume da enzima); Me (massa da enzima) e Tr (tempo de reação).

4.2.8 Determinação dos parâmetros de imobilização e coimobilização

Ao término da imobilização foram retiradas alíquotas para quantificação da atividade inicial, residual e do derivado. Com esses valores obtidos determinaram-se os parâmetros de imobilização descritos a seguir.

4.2.8.1 Determinação do rendimento de imobilização (R%): é definido como o percentual de atividade enzimática que desapareceu no sobrenadante e foi imobilizada no suporte (equação 4).

$$R (\%) = \frac{Ato\left(\frac{U}{mL}\right) - Atf\left(\frac{U}{mL}\right)}{Ato\left(\frac{U}{mL}\right)} \times 100 \quad (4)$$

Sendo Ato (atividade oferecida no tempo zero) e Atf (atividade teórica de imobilização)

4.2.8.2 Atividade recuperada (ATrec): consiste na relação entre a atividade da enzima aparente, obtida pela medida direta da atividade do derivado é a diferença entre atividade no sobrenadante antes e depois da imobilização (equação 7), que pode ser considerada como atividade teórica derivada (RODRIGUES, 2008).

$$ATrec (\%) = \frac{Atd(U/mg)}{Ato\left(\frac{U}{mL}\right) - Atf\left(\frac{U}{mL}\right)} \times 100 \quad (5)$$

Sendo: Atd (atividade do derivado); Ato (atividade inicial de enzima) e Atf (atividade do sobrenadante após imobilização).

4.2.9 Determinação do grau de hidrólise da caseína

A reação foi conduzida em um reator de 50 mL onde foram adicionados 20 mL de caseína a 4% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 8,0 e temperatura de 55°C. Após termostatização do substrato foi adicionada neutrase livre, imobilizada e coimobilizada com carga oferecida de 1000U_{NEU} em cada experimento com tempo de hidrólise de 80 minutos. O pH foi controlado com NaOH 0,9 M e o volume da base consumida ao longo do tempo foi anotada e depois convertido em grau de hidrólise através da equação abaixo (ADLER-NISSEN, 1986).

Para o cálculo do grau de hidrólise (GH) utilizou-se a equação 8:

$$GH(\%) = Vb(mL) \times [b](N) \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{mp(g)} \times \frac{1}{htot} \times 100 \quad (6)$$

Sendo: GH: grau de hidrólise (%), ou seja, o percentual de ligações peptídicas clivadas ao longo da reação; Vb : volume da base (mL) adicionada para manter o pH ao longo da reação; $[b]$ = concentração da base (N); α = grau médio de dissociação dos grupos α -NH₂; mp = massa da proteína na amostra (g) e $htot$ = número de ligações peptídicas totais em uma proteína.

4.2.10 Reação com lactose

A concentração de glicose foi acompanhada pela hidrólise da lactose. A reação foi conduzida em reator de 50 mL contendo 40 mL de solução de lactose 5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 contendo 0,1 mM de MnCl₂ e 2mM de MgCl₂ e temperatura de 37°C. Após termostatização do substrato foi adicionado à lactase livre, imobilizada e coimobilizada com carga oferecida de 20U_{LAC} em cada experimento. Amostras da reação foram coletadas em intervalos de tempo de 0 a 55 minutos de hidrólise. A concentração de glicose foi quantificada pela equação 1 citada anteriormente.

4.2.11 Ensaio de estabilidade térmica

Amostra de enzimas livre, imobilizadas e coimobilizadas foram adicionadas em tampão fosfato de potássio de 0,1M em pH 8,0 a 60°C para a neutrase e em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 contendo 0,1 mM de MnCl₂ e 2mM de MgCl₂ para lactase, posteriormente, foram incubadas em banho termostático à 60°C em intervalos de tempo pré definidos. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e resfriadas rapidamente em banho de gelo para interromper a reação de inativação e suas atividades residuais, analisadas.

O modelo de ordem - 1 proposto por Belver (2008) foi ajustado aos pontos experimentais e em seguida calculados a constante de desativação térmica (Kd) para cada derivado. Medindo-se, enfim, a atividade da enzima livre, imobilizada e coimobilizada.

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

Calculou-se o tempo de meia vida da enzima ($t_{1/2}$) que é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial, expresso em unidade de tempo, foi calculado a partir da Equação 10, utilizando o parâmetro Kd (constante de desativação térmica) estimada a partir da equação 8:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \times (1 - \alpha)} \quad (8)$$

Calculou-se também o Fator de Estabilização (FE), tendo os valores do tempo de meia vida da enzima solúvel e do derivado é possível calcular o fator de estabilização da enzima imobilizada e coimobilizada. O fator de estabilidade é definido como a razão entre os tempos de meia vida do derivado e da enzima solúvel conforme equação 9.

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ derivado}}{t_{1/2} \text{ enzima solúvel}} \quad (9)$$

4.2.12 Estabilidade operacional

Com o propósito de aplicar os derivados desenvolvidos em processo de hidrólises contínuas, bateladas sequenciais foram realizadas utilizando-se os suportes coimobilizadas de modo a avaliar a reusabilidade dos biocatalisadores.

Lactase: a reação foi conduzida em um reator de 50 mL e foi adicionado em cada batelada 30 mL da solução de [caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v)] e 0,5g do derivado coimobilizado com carga oferecida $10 \pm 8U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte, sendo o mesmo derivado reutilizado em 5

bateladas sequenciais. Cada reação permaneceu em intervalo de tempo de 0 a 30 minutos à temperatura de 37°C e se quantificou a porcentagem de glicose pela equação 1.

Neutrase: a reação foi conduzida em um reator de 50 mL e foi adicionado em cada batelada 30 mL da solução de [caseína 4% (m/v) e lactose 5% m/v)] e 0,5g do derivado coimobilizado com carga oferecida $110 \pm 103 U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte , sendo o mesmo derivado reutilizado em 5 bateladas sequenciais. Cada reação permaneceu em intervalo de tempo de 0 a 80 minutos à temperatura de 37°C e a porcentagem do grau de hidrólise foi calculada pela equação 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos para o processo de imobilização e coimobilização das enzimas neutrase e lactase em suportes desenvolvidos a partir de quitosana e alginato de sódio e serão avaliados parâmetros tais como: rendimento de imobilização, atividade recuperada, atividade teórica de imobilização e atividade do derivado, assim como também, caracterização das enzimas solúveis. Em seguida, apresentar-se-ão as aplicações dos melhores derivados, com suas devidas aplicações, objetivando dados relacionados ao grau de hidrólise, concentração de glicose, fatores de estabilização térmica e operacional.

5.1 Atividade hidrolítica da enzima livre

Lactase – A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial β -Galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, apresentou um valor de $1074 \pm 41,32 U_{LAC}.mL^{-1}$ de extrato enzimático, determinado em triplicata. Para tal resultado, utilizou-se tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 contendo 0,1 mM de $MnCl_2$ e 2mM de $MgCl_2$.

Neutrase - A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial (Neutrase) Protease de *Bacillus amyloliquefaciens* adquirida da Novozymes Latin America Ltda., apresentando uma atividade de $75790 \pm 6,126 U_{NEU}.mL^{-1}$ de extrato enzimático, determinado em triplicata. Para tal resultado, utilizou-se tampão fosfato de potássio pH 8,0.

5.2 Atividade hidrolítica da neutrase imobilizada e coimobilizada por ligação covalente em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v)

Os suportes preparados foram ativados com glutaraldeído e utilizados para imobilização e coimobilização da neutrase de acordo com os itens 4.2.5.1, 4.2.6.1, 4.2.6.2 e 4.2.6.3, em pH 8,0 e temperatura ambiente.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos referentes aos parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de quitosana. As respostas analisadas foram: (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Tabela 3. Parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5 U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Biocatalisador	R (%)	A_{Trec} (%)	A_{ap} ($U_{NEU} \cdot g^{-1}$ suporte)
Imobilização	55,38	16,41	61,44
I N S C L*	76,53	26,57	66,73
I L S C N**	73,66	11,77	26,79
I L N S***	71,26	19,09	69,81

* Imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase; ** Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase; *** Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

Observa-se que os suportes formados à base de quitosana ativados com glutaraldeído mostraram-se adequados para o processo de imobilização e coimobilização da neutrase, visto que os resultados foram satisfatórios conforme mostra a tabela 3. Esse episódio se deve a ótima combinação do suporte de quitosana e ao método de ativação utilizado, o qual torna o suporte de quitosana com maior número de grupos aldeídos os quais se ligam aos grupos amino da enzima. De acordo com Adriano (2008) os grupos aldeído quando produzidos após a ativação com glutaraldeído apresentam-se muito reativos e pode imobilizar a enzima após a ligação com o grupo amina.

Comparando os dados obtidos na tabela 3, os experimentos de imobilização e coimobilização realizados com a neutrase mostram que o processo de imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase, ofereceu melhor rendimento de imobilização (76,53%) e melhor atividade recuperada (26,57%) em relação aos demais experimentos realizados, pois quanto melhor o rendimento ocorrido na imobilização, menor será o volume de catalisador gasto em reator e este apresenta uma maior carga de enzima imobilizada. Para Schoffelen e Hest (2012) a coimobilização tem a capacidade de minimizar as distâncias entre espaços nas reações em cascata, reduzindo efeitos de difusão e os efeitos sobre compostos intermediários instáveis, o que poderá melhorar os parâmetros de imobilização e coimobilização, como o ocorrido no experimento acima.

Porém, comparando-se as atividades aparentes dos derivados, percebemos que a imobilização simultânea da lactase e neutrase teve uma melhor atividade aparente ($69,81 U_{NEU} \cdot g^{-1}$ sup) quando comparadas aos outros métodos de coimobilização, isto indica

que durante a imobilização simultânea das duas enzimas houve uma melhor atividade para o tal catalisador.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos referentes aos parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio. As respostas analisadas foram: (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Tabela 4. Parâmetros de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão borato de sódio 20 mM pH 8,0 e mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5 U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Biocatalisador	R (%)	A_{Trec} (%)	A_{ap} ($U_{NEU} \cdot g^{-1}$ suporte)
Imobilização	64,46	17,01	45,95
I N S C L*	0	0	0
I L S C N**	0	0	0
I L N S***	0	0	0

* Imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase; ** Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase; *** Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

Pode-se observar na Tabela 4 que durante a imobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio se obteve atividade enzimática, resultando em parâmetros satisfatórios, tendo um rendimento de 64,46%. Ortega (2009) ao imobilizar Neutrase em suporte de alginato ativado com glutaraldeído obteve rendimento de imobilização experimental de 58,63%. Durante a realização dos procedimentos de: imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase; imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase e imobilização simultânea das enzimas no mesmo suporte, os derivados obtidos não apresentaram atividade enzimática, sendo os resultados dos parâmetros estudados não satisfatórios, obtendo-se resultados nulos. Provavelmente durante a coimobilização pode ter ocorrido inativação das enzimas e de acordo com Mendes (2009), durante a imobilização pode ter ocorrido efeitos de distorções na estrutura ativa da enzima e ou/ efeitos de partição do substrato em relação ao produto, como também pode ocorrer efeitos do microambiente que podem afetar fortemente a estrutura tridimensional ou a conformação espacial das enzimas e esses efeitos podem ser: concentração de água, pH do meio, interações hidrofóbicas, presença de sais e alterações na temperatura. Como também a presença de íons pode ter acarretado a inativação da lactase.

Durante os experimentos realizados com a enzima lactase, foram adicionados íons metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+}), pois ela é uma enzima completamente dependente desses íons. No processo de imobilização metais e as enzimas estão envolvidos em uma reação de forma reversível que promove a formação de um complexo enzimático. Esse complexo enzima-íon metálico é 50% mais ativo do que a enzima quando está sozinha (LADERO et al., 2002).

Como o suporte utilizado para a coimobilização foi o alginato de sódio, provavelmente no decorrer dos processos, ocorreu à competição entre os íons havendo um sequestro dos íons (Mg^{2+} e Mn^{2+}) da enzima pelo suporte que causou a inatividade da enzima. Segundo Davis et al (2003) o alginato apresenta uma seletividade por íons metálicos divalentes, a qual está descrita a seguir: $Mg < Mn = Fe < Co < Ni < Zn < Ca < Cd < Sr < Cu < Pb < Ba$, ou a atividade da lactase foi inibida pelo íons Na^+ que compõe o suporte. Na presença de metais pesados (Cu, Zn, Hg) essa enzima pode ser inativada ou inibida pelo Na^+ e o Ca^{2+} (VITOLLO, 2001; CARMINATTI, 2001; BARBOSA; ARAÚJO, 2007).

Haider e Husain (2007) utilizaram alginato como meio para a oclusão de lactase, mas comprovaram que este procedimento de imobilização de enzimas apresenta algumas limitações, tais como o problema do substrato e do produto na difusão dentro e fora das esferas de alginato. Sendo assim, conclui-se que a escolha da metodologia de coimobilização não se mostrou aplicável para o suporte de alginato de sódio.

5.3 Atividade hidrolítica da lactase imobilizada e coimobilizada por ligação covalente em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v)

Os suportes foram ativados com glutaraldeído e utilizados para imobilização e coimobilização da lactase de acordo com os itens 4.2.5.2, 4.2.6.1, 4.2.6.2 e 4.2.6.3, em pH 7,0 e temperatura ambiente. A tabela 5 mostra os resultados relativos aos parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de quitosana. As respostas analisadas foram: (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Na tabela 5 evidencia-se a comparação de diferentes metodologias de imobilização e coimobilização das enzimas. No processo de imobilização da lactase seguida de coimobilização da neutrase apresentou o rendimento mais aproximado quando comparado a imobilização da lactase (91,30% - 100%). Em relação à atividade recuperada, na imobilização da neutrase seguida da imobilização da lactase, mostrou-se com o resultado mais aproximado ao da enzima imobilizada (29,57% - 22,59%). Nessa mesma coimobilização apresentou

também uma atividade de imobilização (34,85% - 40,91%) e atividade aparentes (10,30% - 9,24%) quase semelhantes à imobilização. Logo, entre as metodologias analisadas, a que mais se destacou foi à imobilização da neutrase seguida da lactase, pois apresentou os parâmetros similares a enzima imobilizada.

Tabela 5. Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$, mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16 U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Biocatalisador	R (%)	A_{Trec} (%)	A_{ap} ($U_{LAC} \cdot g^{-1}$ suporte)
Imobilização	100	22,59	9,24
I N S C L*	76,67	29,57	10,30
I L S C N**	91,30	2,86	0,91
I L N S***	70	76,43	16,21

* Imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase; ** Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase; *** Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

Na tabela 5, nota-se ainda que o tempo de incubação, 3h para a imobilização, mostrou-se suficiente para que toda carga enzimática oferecida fosse imobilizada, como observado por Vieira (2009), visto que, a imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse reagente ativante (ALONSO, 2005).

Observa-se também que a escolha do pH 7,0 para imobilização e coimobilização da enzima lactase baseia-se no fato deste ser o que apresenta melhores resultados para a enzima solúvel como mostrado em Bezerra (2012). Além do que, em pH 7,0 o glutaraldeído e a enzima formam ligações covalentes devido à reatividade do glutaraldeído, explicando-se assim também a queda da atividade recuperada, relacionando ao procedimento de imobilização da lactase seguida de neutrase em um tempo total de 6 horas em comparação as demais.

A tabela 6 apresenta os resultados relativos aos parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de alginato de sódio. As respostas analisadas foram: (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Tabela 6. Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de alginato de sódio ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão borato 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$ mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16U_{LAC}\cdot g^{-1}$ de suporte, sendo (R) rendimento de imobilização, (A_{Trec}) atividade recuperada e (A_{ap}) atividade aparente.

Biocatalisador	R (%)	A_{Trec} (%)	A_{ap} ($U_{LAC}\cdot g^{-1}$ suporte)
Imobilização	0	0	0
I N S C L*	0	0	0
I L S C N**	0	0	0
I L N S***	0	0	0

* Imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase; ** Imobilização da lactase seguida da coimobilização da neutrase; *** Imobilização da lactase e neutrase simultaneamente

Pode-se observar na Tabela 6 que mesmo utilizando o tampão borato de sódio suplementado com íons Mn^{2+} , Mg^{2+} com pH adequado para a enzima, durante a imobilização e coimobilização da lactase em suporte de alginato de sódio, a atividade enzimática dos derivados obtidos não foram satisfatórios, obtendo resultados nulos para os parâmetros estudados, como foi verificado por Bezerra(2012), ou o método de imobilização por ligação cruzada não foi apropriado para imobilizar e coimobilizar a lactase ou a presença de íons sódio podem ter alterado o processo de coimobilização.

De acordo com Vieira (2006) as lactases provenientes de leveduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio presente no leite e por pequenas concentrações de sódio.

Como foi verificado por Vieira (2009) e Freitas (2013) a presença de íons sódio encontrado na estrutura do suporte de alginato, promove um desfavorecimento na atividade enzimática, impedindo a análise por imobilização utilizando esse derivado. Portanto para se alcançar bons resultados em um processo de imobilização e coimobilização da enzima, é importante atentar-se a várias características a cerca do substrato e produto desejado de enzima, como também são importantes verificar a interação entre enzima/suporte, agente ativador e a metodologia de imobilização e coimobilização, com isso, possivelmente possa resultar em melhores respostas.

5.4 Estabilidade térmica e tempo de meia vida dos derivados obtidos

Com os melhores derivados obtidos foi estudada a influência da temperatura de 60°C na estabilidade das enzimas livres, imobilizadas e coimobilizadas conforme o item 4.2.11.

A estabilidade térmica é uma característica muito importante, pois dependendo do seu coeficiente de expansão térmica, o suporte pode sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura. De acordo com Kennedy (1987) os suportes termicamente sensíveis, quando submetidos a variações de temperatura, podem sofrer distorções ou modificações em sua estrutura, destruindo o sítio ativo da enzima.

Fatores de estabilidade (FE) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dos derivados e o tempo de meia vida da enzima livre nas mesmas condições do ensaio. As tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados referentes aos parâmetros analisados para as enzimas livres, imobilizadas e coimobilizadas para os derivados obtidos. As respostas analisadas foram os fatores de estabilidade (FE) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas.

5.4.1 Estabilidade térmica e tempo de meia vida da neutrase

A tabela 7 mostra a estabilidade térmica a 60 °C da enzima neutrase livre, imobilizada e coimobilizada ao longo do tempo para os biocatalisadores analisados, mostra também os valores estimados para as constantes de desativação térmica K_d , utilizando o modelo de desativação primeira ordem (BELVER et al.,2002). A Tabela 7 mostra ainda os valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e do Fator de Estabilização (FE).

Tabela 7. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, sendo ($T_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.

Biocatalisador	Kd	T_{1/2} (H)	FE
Livre	0,085	0,14	1
Imobilizado	0,031	0,37	2,64
Coimobilização	0,023	0,50	3,57

A escolha do método de ativação e tipo de coimobilização (imobilização da neutrase seguida da coimobilização da lactase) dos suportes realizados no experimento da tabela 7 foram satisfatórias, visto que durante o procedimento de coimobilização houve um aumento significativo tanto no tempo de meia vida (0,37h) como também na estabilidade térmica em relação à enzima na forma livre (2,64). Chinellato (2013) em seu trabalho realizou a imobilização da neutrase em quitosana ativada com glutaraldeído e percebeu que o processo de imobilização favorece o aumento da estabilidade, tempo de meia vida e reduziu o Kd. Para Adriano (2008), suportes ativados com glutaraldeído promovem ligações estáveis entre os grupos de amina de suportes e resíduo de amina de proteínas devido a sua alta reatividade, promovendo uma melhor estabilidade enzimática. E de acordo com Schebor et al., (1997) a estabilidade térmica das enzimas é importante para definir condições precisas durante suas aplicações em biotecnologia e processamento de alimentos.

A imobilização pode atribuir uma estabilidade adicional para uma variedade de enzimas, sendo que essa estabilidade é influenciada pelo número de ligações que são formadas entre a enzima e o suporte, a natureza das ligações (covalentes, não-covalentes), o grau de aprisionamento das moléculas de enzima ao suporte nas condições de imobilização (DANISMAN et al., 2004; CAO, 2005). A metodologia de coimobilização utilizada foi por ligação covalente a qual influenciou positivamente na estabilização do biocatalisador. Para Berger et al., (2004) e Mendes et al., (2011) a imobilização por ligação covalente que ocorre entre os grupos amino do polímero (suporte de quitosana) e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura e conseqüentemente melhorando a estabilidade da enzima para sua aplicação em processos biotecnológicos industriais.

A figura 14 mostra a representação gráfica da análise da estabilidade térmica da enzima neutrase livre, imobilizada e coimobilizada. No gráfico é possível observar que a temperatura influencia consideravelmente na estabilidade da enzima e que para ter um bom desempenho em sua estabilidade faz-se necessário conhecer qual a temperatura adequada para cada enzima. A temperatura de 60°C a neutrase observa-se que a enzima em sua forma livre possui menor resistência a essa temperatura quando comparada a forma imobilizada e coimobilizada o que mostra que a técnica utilizada para os experimentos de imobilização e coimobilização contribuíram para o melhoramento da estabilidade dos biocatalisadores.

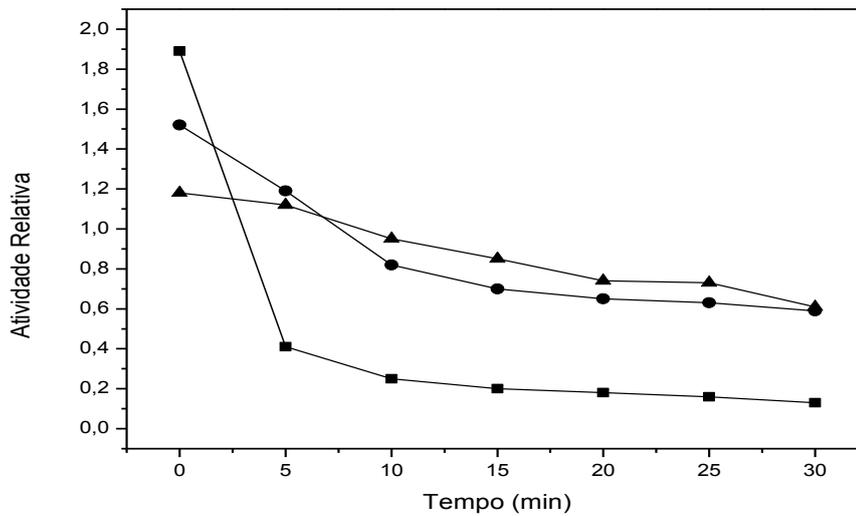


Figura 14: Representação gráfica da estabilidade térmica da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NET} \cdot g^{-1}$ de suporte em pH 8,0 e temperatura de 60°C, (■) neutrase livre; (●) neutrase imobilizada e (▲) neutrase coimobilizada.

A tabela 8 mostra a estabilidade térmica a 60 °C da enzima neutrase livre, imobilizada e coimobilizada ao longo do tempo para os biocatalisadores analisados, mostra também os valores estimados para as constantes de desativação térmica K_d , utilizando o modelo de desativação primeira ordem (BELVER et al.,2002). A Tabela 8 mostra ainda os valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e do Fator de Estabilização (FE).

Tabela 8. Parâmetros de estabilidade térmica de imobilização e coimobilização da neutrase em suporte de alginato de sódio ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0 mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte sendo ($T_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.

Biocatalisador	K_d	$T_{1/2}$ (H)	FE
Livre	0,085	0,14	1
Imobilizado	0,028	0,41	2,93
Coimobilização	-	-	-

Como pode ser verificado na tabela 6 mesmo com a adição dos íons 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$ não foi possível calcular o tempo de meia vida nem o fator de estabilidade do derivado durante o processo de coimobilização, visto que com a metodologia utilizada não foi possível obter atividade enzimática durante a coimobilização das enzimas em suportes de alginato de sódio.

Embora da grande heterogeneidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método exclusivo aplicável para todas. Isto se deve às diferentes características e composição química das enzimas, diferentes propriedades do substrato e do produto e a finalidade de aplicação para o produto obtido. Sendo assim, para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte numa imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (BASSETTI, 1995).

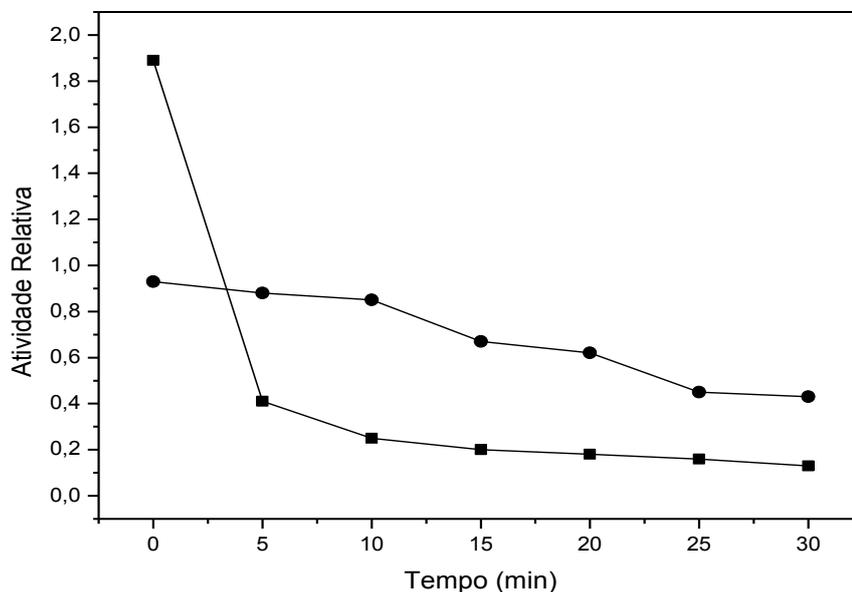


Figura 15: Representação gráfica da estabilidade térmica da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $221 \pm 207,5 U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte em pH 8,0 e temperatura de 60°C, (■) neutrase livre e (●) neutrase imobilizada.

A figura 15 mostra a representação gráfica da análise da estabilidade térmica da enzima neutrase livre e imobilizada e não foi possível a coimobilização em suporte de alginato de sódio. A temperatura de 60°C observa-se que a enzima em sua forma livre em 5 minutos de reação houve uma queda brusca na sua atividade relativa, já em sua forma imobilizada a enzima apresentou uma melhor resistência térmica.

5.4.2 Estabilidade Térmica e tempo de meia vida da lactase

A tabela 9 mostra a estabilidade térmica a 60 °C da enzima lactase livre, imobilizada e coimobilizada ao longo do tempo para os biocatalisadores analisados, mostra também os

valores estimados para as constantes de desativação térmica K_d , utilizando o modelo de desativação primeira ordem (BELVER et al.,2002). A Tabela 9 mostra ainda os valores do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e do Fator de Estabilização (FE).

Tabela 9. Parâmetros de imobilização e coimobilização da lactase em suporte de quitosana com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$ mantidas sob agitação constante por 3 e 6 horas à 25°C com carga oferecida $20 \pm 16U_{LAC}.g^{-1}$ de suporte sendo ($T_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a temperatura de 60 °C.

Biocatalisador	K_d	$T_{1/2}(H)$	FE
Livre	0,011	0,02	1
Imobilizado	0,005	0,04	2
Coimobilização	0,004	0,05	2,5

O tempo de meia vida e o fator de estabilidade são parâmetros essenciais para determinar o bom desempenho do biocatalisador e esses parâmetros enzimáticos podem ser melhorados dramaticamente se uma técnica adequada de imobilização e coimobilização forem empregadas corretamente.

Os resultados apresentados na tabela 9 indicam que o tratamento dos derivados com glutaraldeído foi eficaz na manutenção e aumento da estabilidade da enzima coimobilizada quando comparada a sua forma livre (2,5 – 1,0) e que os resultados obtidos de imobilização estão de acordo com os trabalhos de Oosterom (1998), Letca (2004) e Haider e Husain (2007), que analisaram em seus trabalhos uma maior estabilidade da enzima imobilizada em relação a sua forma livre quando utilizaram o processo de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído. Freitas (2013) estudou a estabilidade térmica da *Kluyveromyces lactis* a 60°C da enzima solúvel e imobilizada ao longo do tempo para os biocatalisadores analisados a enzima imobilizada apresenta uma maior estabilidade térmica e melhor tempo de meia vida que a enzima livre.

Pode-se ainda observar que houve um aumento no tempo de meia vida da enzima coimobilizada quando comparada a enzima livre (0,05h - 0,01h). Para Lima e Bezerra (2012) o tempo de meia vida da enzima imobilizada é um importante parâmetro, pois permite que o derivado mantenha sua atividade por um longo período de tempo quando aplicados em reatores contínuos e descontínuos utilizados nos processos industriais.

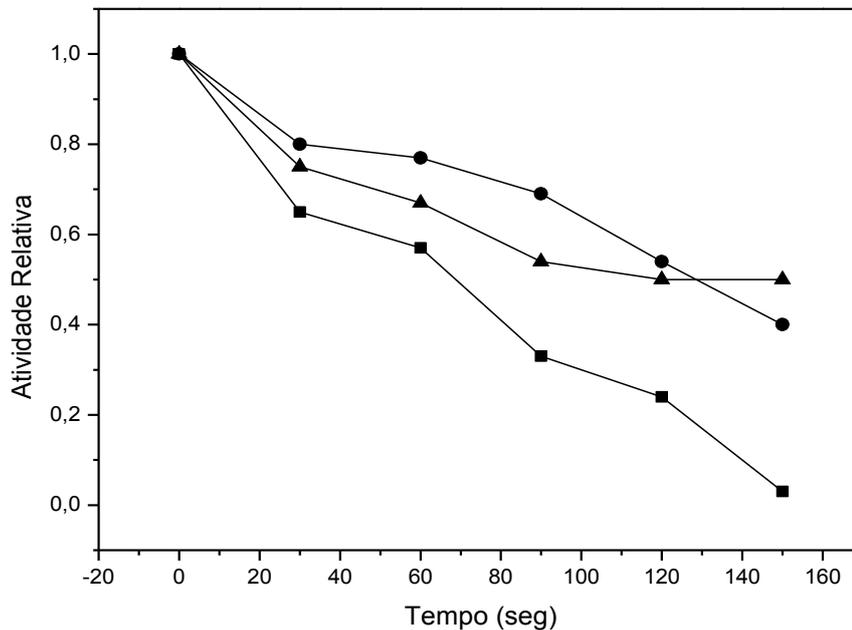


Figura 16: Representação gráfica da estabilidade térmica da lactase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte ($60^{\circ}C$ e pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$), (■) lactase livre; (●) lactase imobilizada; (▲) lactase coimobilizada.

A figura 16 mostra a representação gráfica da estabilidade térmica da lactase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v). Através da análise pode-se perceber que a lactase em sua forma livre apresenta uma menor estabilidade e em aproximadamente 150 segundos ocorre a sua desnaturação com atividade relativa de (0,0) quando comparada a lactase imobilizada e coimobilizada as quais ainda apresentam atividade relativa respectivamente de (0,4 e 0,5).

5.5 Grau de hidrólise da neutrase

Defini-se grau de hidrólise a porcentagem do número total de ligações peptídicas em uma proteína que foi rompida durante o processo de hidrólise, levando-se em consideração a especificidade da enzima empregada e a quantidade de resíduos que apresenta substrato para esta enzima (ADLER-NISSEN, 1986).

O acompanhamento da adição de base ou ácido ao longo da reação de hidrólise mantendo-se o mesmo pH é a técnica utilizada pelo método do pHstato para, assim, em seguida se calcular o grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986). Desta forma, utilizando de

equipamentos para quantificação no método pHstato, como os titulados automáticos, os quais fornecem o volume de base ou ácido consumido ao longo do tempo e conseqüentemente, pode-se ter a evolução da hidrólise, por meio do grau de hidrólise, no tempo. (PRETTO, 2012). Existem trabalhos quantitativos de hidrólise de proteínas que destaca a necessidade de ter uma medida de extensão da degradação hidrolítica, pois uma grandeza que traduz bem a ação catalítica de uma protease é o número de ligações peptídicas irrompidas durante a reação.

Uma das primeiras aplicações do número de ligações peptídicas rompidas como medida de eficiência do grau de hidrólise e foi citada por Calvery, 1933. Desde então, esta técnica tem se tornado padrão para muitos trabalhos sobre hidrólise de proteínas.

Muitos autores tem mostrado que a extensão na qual as propriedades funcionais de uma proteína podem ser alteradas por hidrólise é muito dependente do grau de hidrólise na qual as proteínas foram submetidas. A partir do conhecimento da especificidade das proteases e da sequência primária de proteína pura utilizadas é possível chegar a valores teóricos para o grau máximo de hidrólise com essas enzimas (GALVÃO, 2004).

Diversos métodos podem ser aplicados para estimar o grau de hidrólise de uma reação. A quantificação pode ser realizada determinando-se o teor de nitrogênio liberado durante a hidrólise; determinando-se os grupos aminos livres liberados durante a hidrólise, ou, através o método pHstato, no qual os prótons liberados durante o processo hidrolítico são titulados e, então, relacionados ao grau de hidrólise (GALVÃO, 2004).

O princípio da técnica do pHstato basea-se no fato de que a hidrólise é desenvolvida em pH neutro ou alcalino, na qual ocorre a dissociação de prótons de grupos aminos (GALVÃO, 2004). A liberação de prótons conduz a redução do pH do meio, assim, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pela quantidade de base requerida para manter o pH constante durante a reação (AILER-NISSEN, 1986).

Com o objetivo de quantificar as reações através da hidrólise, com o melhor derivado obtido calculou-se o grau de hidrólise em função do tempo da enzima neutrase.

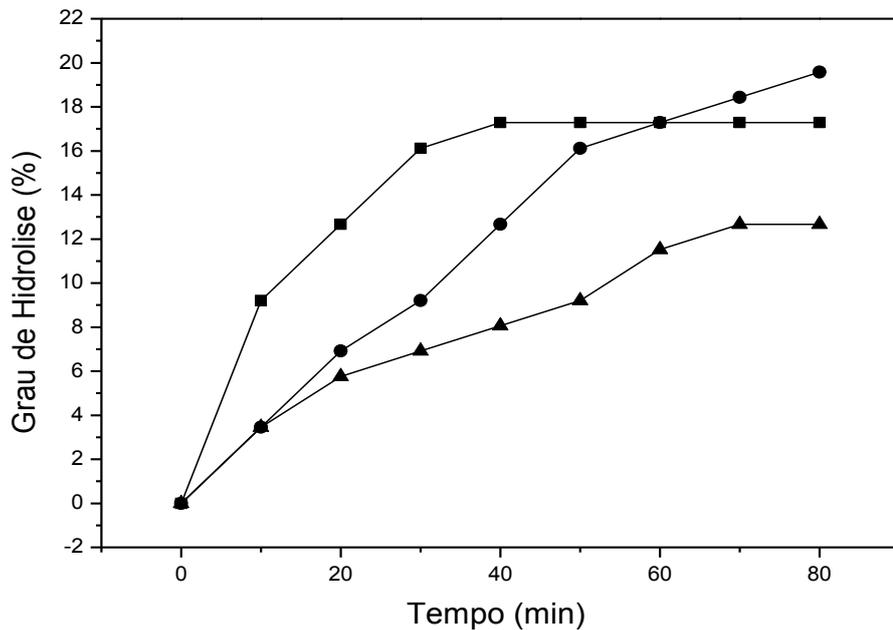


Figura 17: Perfil do grau de hidrólise da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v), com substrato caseína 4% (m/v), com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 8,0 e temperatura de 50°C, (■) neutrase livre; (●) neutrase imobilizada e (▲) neutrase coimobilizada.

Os resultados dos ensaios realizados para se verificar o grau de hidrólise da neutrase livre, imobilizada e coimobilizada estão mostradas na figura 17. Como pode-se observar, ao longo de 80 minutos de hidrólise e a temperatura de 50°C, conforme se aumenta o tempo de reação, aumenta-se o grau de hidrólise reacional da neutrase, como também percebe-se que há um período de tempo em que a enzima começará a sofrer processo de inativação.

Em análise da figura 17, nota-se que até em aproximadamente 40 minutos a neutrase livre obteve o seu máximo valor de grau de hidrólise (16%) e que a partir deste instante, a essa temperatura, observa-se que a enzima passa a sofrer inativação térmica, sendo que após 60 minutos de reação de hidrólise, seu desempenho passa também, pior do que ocorre na reação quando realizada com a enzima imobilizada.

Pode-se observar ainda na figura 17, que em 10 minutos de reação a neutrase imobilizada e coimobilizada atingiram o mesmo grau de hidrólise. Quando imobilizada a enzima atingiu seu máximo grau de hidrólise (20%) em 80 minutos de reação e que durante esse período de tempo o grau de hidrólise cresceu gradativamente. Já a enzima coimobilizada atingiu seu máximo grau de hidrólise (12,3%) em 70 minutos de reação e que após esse período a enzima passa a sofrer o processo de inativação térmica.

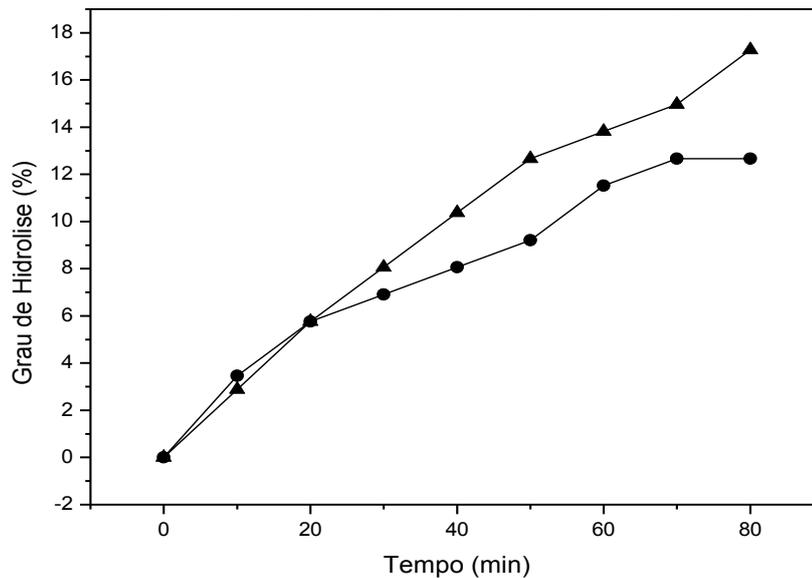


Figura 18: Perfil comparativo do grau de hidrólise da neutrase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v), com carga oferecida de $221 \pm 207,5U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 8,0 e temperatura de 50°C com substrato caseína 4% (m/v) (●) e substrato solução de caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) (▲).

A figura 18 mostra o perfil comparativo do grau de hidrólise da neutrase coimobilizada em quitosana, tendo como substrato caseína 4% (m/v) e uma solução contendo caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v). Percebe-se que em 20 minutos de reação ambos os substratos atingiram o mesmo grau de hidrólise aproximadamente (6%), o substrato contendo somente caseína atingiu seu máximo grau de hidrólise (12%) em um período de tempo de 70 minutos de reação, já a hidrólise realizada com solução de caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) obteve seu grau de hidrólise crescente mesmo após 80 minutos de reação. Isso indica que a solução contendo caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) atingiu um melhor grau de hidrólise para a neutrase quando coimobilizada com a lactase.

5.6 Concentração de Glicose

Os resultados dos ensaios realizados para se medir a concentração de glicose na reação catalisada pela lactase, imobilizada e coimobilizada estão mostradas na figura 19.

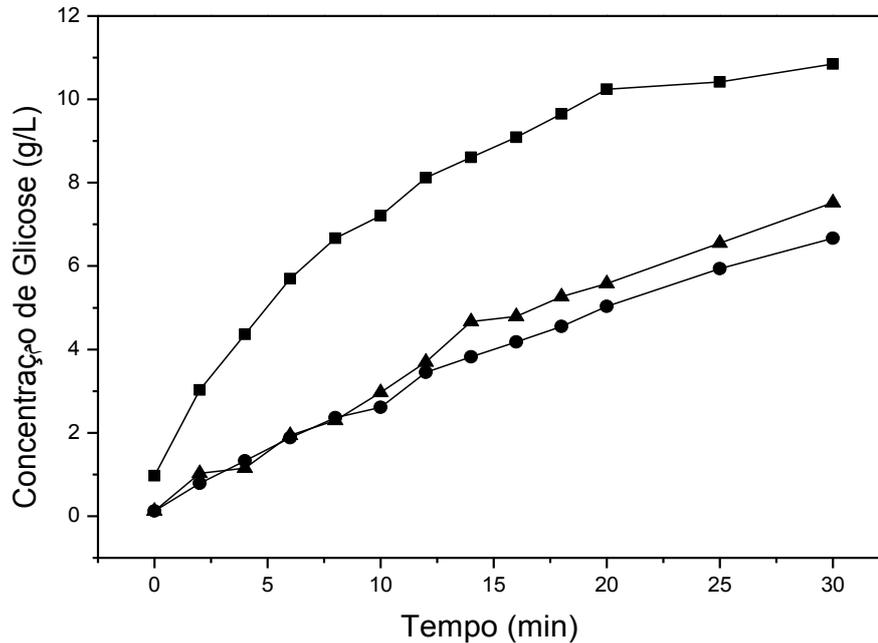


Figura 19: Perfil da concentração de glicose da lactase livre, imobilizada e coimobilizada em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16 U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte, pH 7,0 e temperatura $37^{\circ}C$ adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$), (■) lactase livre; (●) lactase imobilizada; (▲) lactase coimobilizada.

Na figura 19 observa-se que entre 0 a 17 minutos a lactase imobilizada e coimobilizada atingiram aproximadamente a mesma concentração de glicose como pode ser verificado na figura acima. Observa-se também que durante 30 minutos de reação houve aumento da concentração de glicose tanto para a lactase livre, imobilizada e coimobilizada e que a concentração de glicose da enzima livre foi superior a imobilizada e coimobilizada.

A figura 20 mostra o perfil comparativo da concentração de glicose da lactase coimobilizada em suporte de quitosana, tendo como substrato caseína 4% (m/v) e uma solução contendo caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v). Percebe-se que a concentração de glicose comportou-se de forma crescente com o aumento do tempo nos experimentos realizados. A figura mostra também que quando a reação foi realizada com solução do substrato contendo caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) a concentração de glicose foi influenciada de forma significativa atingindo no período de 30 minutos uma concentração de aproximadamente (7,3g/L de glicose), já o substrato contendo somente caseína atingiu sua máxima concentração de glicose aproximadamente (14g/L) em 30 minutos. Isso indica que a solução do substrato quando composta por caseína 4% (m/v) e lactose 5% (m/v) ocorrerá uma influencia significativa na concentração de glicose das reações.

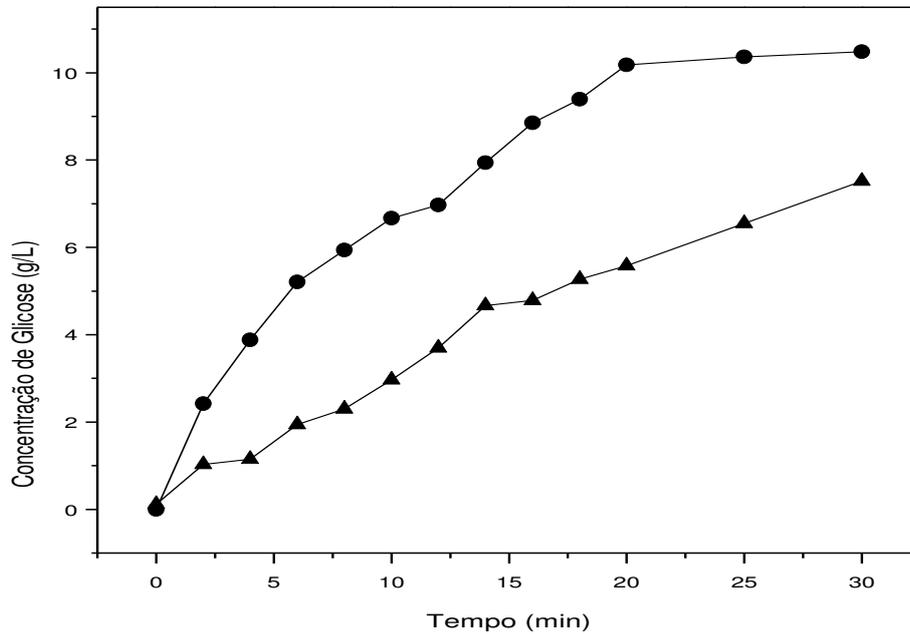


Figura 20: Perfil comparativo da concentração de glicose da lactase coimobilizada em suporte de quitosana ativada com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $20 \pm 16U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte a temperatura de 37°C e pH 7,0 adicionado 2mM de $MgCl_2$ e 0,1mM de $MnCl_2$, com substrato (●) lactose 5% (m/v) e (▲) solução de lactose 5% + caseína 4% (m/v).

5.7 Estabilidade operacional

Objetivando a aplicação dos biocatalizadores em reatores de sistemas em continuidade de maior interesse para utilização na indústria, realizaram-se testes de estabilidade operacional por meio de seguidas bateladas para testes de reutilização dos biocatalizadores coimobilizados. Desta forma, a nível industrial, promove-se uma grande economia, pois a enzima em sua forma solúvel é de grande custo para a indústria.

No desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a apresentação da estabilidade operacional. Se a enzima imobilizada for capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso, então os processos com enzimas imobilizadas podem ser mais econômicos que os processos com a enzima livre. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional dos processos sucedido do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os experimentos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

A viabilidade da reutilização das enzimas coimobilizadas foram analisadas durante uma sequência de cinco bateladas, utilizando-se o derivado de quitosana ativado por glutaraldeído. Os resultados são mostrados nas figuras 21 e 22.

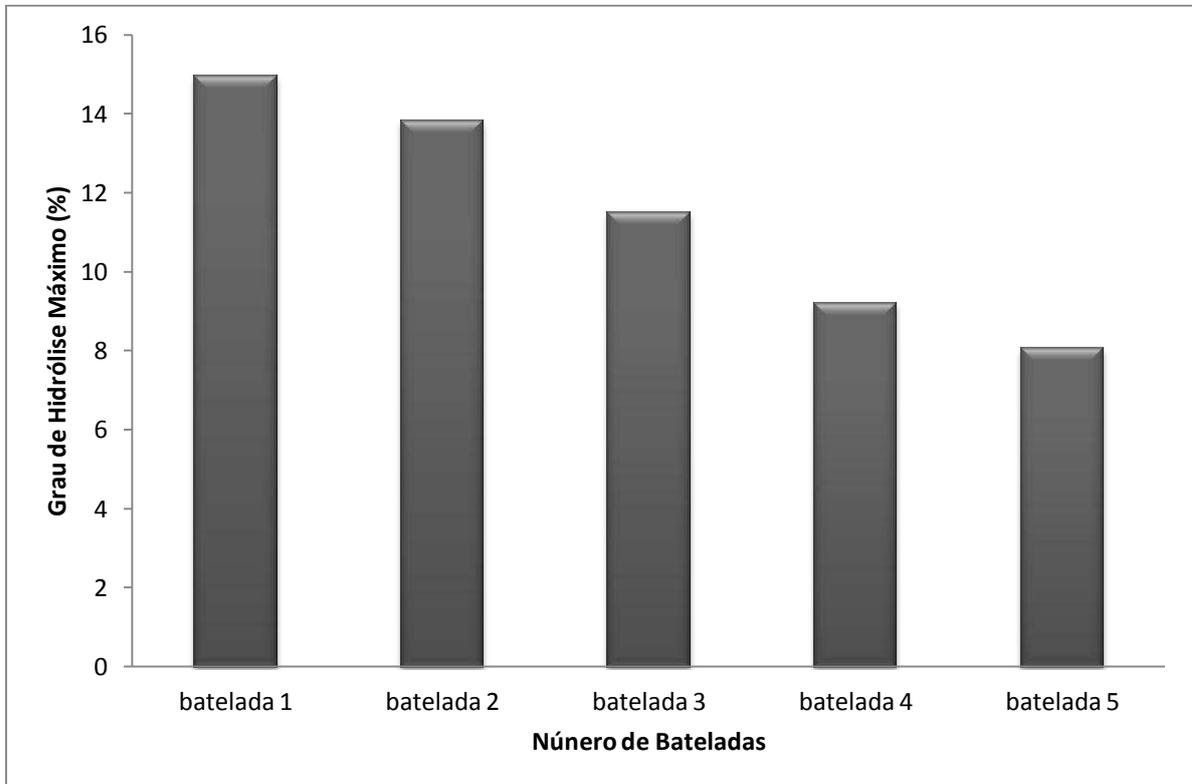


Figura 21: Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da neutrase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $110 \pm 103,7U_{NEU} \cdot g^{-1}$ de suporte coimobilizado, pH 8,0, temperatura de 50°C e tempo reacional de 80 minutos. Massa do derivado: 0,5g.

Analisando-se os dados da figura acima, pode-se verificar que durante o experimento houve uma diminuição no percentual do grau de hidrólise máximo em cada batelada realizada. Nota-se que quando se compara a primeira batelada com a segunda houve uma queda no percentual do grau de hidrólise de (7,7%), e quando comparada a primeira e a quinta batelada ocorreu uma queda de aproximadamente (46%) no grau máximo de hidrólise. Vieira (2009) em seu trabalho sobre a imobilização da lactase em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído estudou a estabilidade da enzima imobilizada em seu quarto ciclo de estudo obteve uma redução de 17% na atividade enzimática.

Na figura 21 nota-se também que a neutrase se comportou de maneira instável, pois quanto maior a estabilidade térmica da enzima solúvel, mais vantajosa sua imobilização e reutilização. Sendo assim, é possível perceber que a hidrólise realizada nesse método de

coimobilização requer ainda muitos estudos para otimização do uso delas, mas os resultados aqui mostrados são promissores e justificam continuidade dos estudos nessa direção.

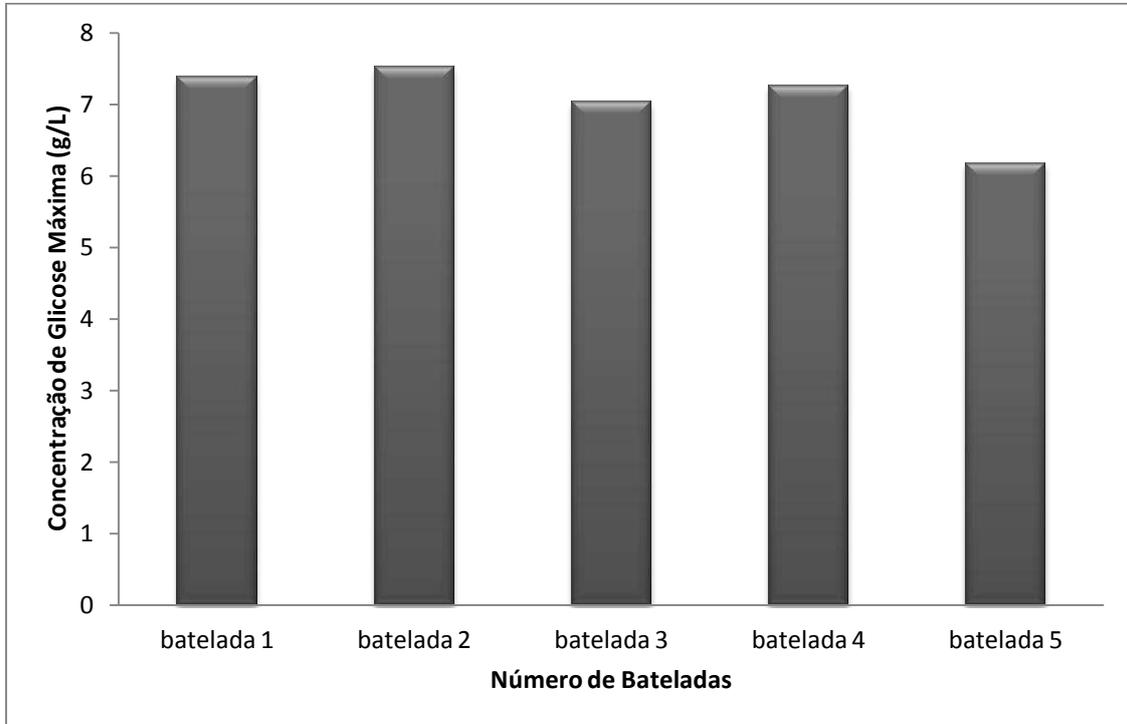


Figura 22: Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da lactase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $10 \pm 8U_{LAC} \cdot g^{-1}$ de suporte coimobilizado, pH 7,0 e temperatura de 37°C e tempo reacional 80 minutos.

Na figura 22, observa que houve um excelente desempenho no experimento, pois nas bateladas repetidas observa-se que a enzima coimobilizada continua ativa e produzindo glicose mesmo após sua reutilização.

Quanto aos perfis apresentados na figura acima para a obtenção da concentração de glicose nas cinco bateladas seguidas, é possível verificar a eficácia do método experimental utilizado, visto que ao final do quinto ciclo de reutilização em bateladas foi obtido uma perda de aproximadamente (16,4%) da concentração de glicose presente. Vieira (2009) utilizando um derivado de quitosana ativada com glutaraldeído, em sua pesquisa, foi obtido uma perda de 17% ao final do quarto ciclo de reutilização em batelada o que acarretou numa boa estabilidade operacional da enzima lactase. Chinelate (2013) em seu estudo sobre a imobilização da neutrase em suporte de quitosana ativados com glutaraldeído realizou seu experimento sobre a estabilidade operacional em dez ciclos consecutivos e no quinto ciclo a atividade relativa apresentou uma queda de 25%.

Esses resultados, portanto, indicam ser bastante promissor para o uso de enzimas coimobilizadas para redução de custos com catalisador, e que evidentemente, a viabilidade econômica só poderá ser definida após estudos de otimização dos processos de imobilização.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foram aplicadas metodologias para imobilização e coimobilização da neutrase e lactase em diferentes suportes orgânicos de baixo custo disponíveis na região Nordeste do Brasil. Tais como quitosana e alginato de sódio ativados com o reagente químico glutaraldeído. Estudaram-se os melhores derivados, sendo os resultados obtidos bem satisfatórios, como os citados a seguir.

Os resultados para os derivados formados a partir da quitosana foram satisfatórios obtendo um rendimento de coimobilização para a neutrase (76,53%) isso indica que o método de coimobilização utilizado foi eficaz para o experimento. Para a lactase obteve-se um rendimento de coimobilização de (91,30%) o método também foi satisfatório, isso indica que a suplementação de íons bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} durante todas as etapas de imobilização e coimobilização, foi importante para manter a enzima ativa, sendo, pois importantes co-fatores da lactase.

Suportes de alginato de sódio não apresentaram boa adequação para imobilização e coimobilização obtendo-se rendimentos nulos, possivelmente o método de imobilização e coimobilização não foi eficiente para ambas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada e coimobilizada em biocatálises é necessário escolher o procedimento mais adequado, mais barato e mais sustentável e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional, assim, a busca por melhor desempenho catalítico e operacional continua.

Houve um aumento na estabilidade térmica a 60°C e tempo de meia vida dos derivados de quitosana houve aumento tanto para a neutrase quanto para lactase. Na comparação do grau de hidrólise entre a neutrase livre, imobilizada e coimobilizada obteve-se um melhor desempenho da enzima imobilizada (20%) em 80 minutos de reação. Quando se comparou a conversão de glicose com lactase livre, imobilizada e coimobilizada a melhor resultado foi à lactase livre (15g/L) em 30 minutos de reação.

A estabilidade operacional da neutrase com suporte de quitosana ativada com glutaraldeído realizada em cinco ciclos consecutivos mostrou que uma perda de (46%) no grau máximo de hidrólise, possivelmente pelo fato de estar ocorrendo limitações difusionais ou ocorrência de possíveis alterações conformacionais na estrutura da proteína durante o processo de coimobilização. Enquanto a estabilidade operacional da lactase no mesmo suporte, em seu quinto ciclo de reutilização em bateladas foi obtido perda de (16,4%) na

concentração de glicose, esse resultado evidencia que o processo de coimobilização acarretou boa estabilidade operacional à enzima lactase.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos nesse estudo, os derivados obtidos podem ser empregados para fins alimentícios na hidrólise da lactose e caseína presente no leite ou soro, pois a imobilização e coimobilização torna-se uma importante estratégia para estabilizar a enzima e outra vantagem pertinente é a fácil purificação do produto formado, pois a enzima está insolubilizada permitindo fácil separação e reutilização como também, futuras aplicações industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Enzimic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science. Barking: Elsevier Applied Science, p. 427, 1986.

ADRIANO, W. S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

AFONSO, W. O. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevados teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica**. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

ALMEIDA, E. S. et al. **Remediação do efluente da indústria de queijos combinando processo biológico (produção de proteínas celulares) e processo físico-químico (ozônio)**. In: Congresso Brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 2003. Joinville/PR: ABES, 14 a 19 de setembro de 2003. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes22/cxcii.pdf>. Acessado em: 25 nov. 2014.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. **Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal**. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 21, n.2, p.187-192, 2001.

ALMEIDA, M. M., PASTORE, G.M. **Galacto-oligossacarídeos – Produção e Efeitos Benéficos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SBCTA, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.

ALONSO, N. **Immobilization and stabilization of glutarylacylase on aminatedsepebeads supports by the glutaraldehydecrosslinkinh method**. Journal of Molecular Catalys B: enzymatic, v. 35. p. 57-61, 2005.

APAR, D. K.; O' ZBEK. B. **Hydrolysis and solubilisation of corn glúten by Neutrase**. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007, 82, 1107–1114.

ARROYO, M. **Inmovilización de enzimas**. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica. p. 23-39, 1998.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p.143. 2008.

BAO, X. L. et al. **A study of the soluble complexed formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates**. *J. Food Sci.* 2008, 73, C117-C121.

BARBOSA, A. S. et al. **Estudo Científico da Fermentação do Soro de Queijo de Coalho para a Produção de Aguardente**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento

Sustentável. Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA), v. 5, n.3, p.237-257, jul/set, 2010.

BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba, 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná. <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/17166/Tese%20Alessandra%20Machado%20Baron.pdf?sequence=1>> Acesso em: 04 dez. 2014.

BASSETTI, F. J. **Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado**. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 1995, p.188.

BEAK, H. H.; CADWALLADER, K. R., 1995. **Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products**. J. Food Sci. 60, 929–935. Disponível em <http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1365-2621.1995.tb06264.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER> Acesso em: 25 jul. 2014.

BELVER C. et al, 2008. **Immobilization-stabilization of Candida Antarctica 99 Lipase B in Agarose-glyoxyl and Agarose-octyl: Deactivation Kinetics**. Chemical Engineering Transactions. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/237626114_Immobilization-Stabilization_of_Candida_antarctica_Lipase_B_in_Agarose-Glyoxyl_and_Agarose-Octyl_Deactivation_Kinetics> Acesso em: 23 jun.2015.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M. **Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.57, n.1, p.19-34. 2004.

BEZERRA, C. S. **Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação**. 2012. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2012.

BOLIVAR, J. M. et al. **Coating of Soluble and Immobilized Enzymes with Ionic Polymers: Full Stabilization of the Quaternary Structure of Multimeric Enzymes**. Biomacromolecules, v. 10, n. 4, p. 742-747, 2009.

BON, E P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2008.

BRADY, D.; JORDAAN, J. **Advances in enzyme immobilisation**. Biotechnology Letters, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRANDÃO, S. C. C. **Soro: Um Desafio para as Fábricas de Queijos**. Leite e Derivados, n.15, p.13-19. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 205. **Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano**.

Diário Oficial da União, Brasília, 14 nov. 2006. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b132990045c822dca078e2d10ee53f37/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n.+54_2014_Enzimas+e+prepara%C3%A7%C3%B5es+enzim%C3%A1ticas.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 18 mar. 2015.

BRITO, A. B. N. **Estudo da Cristalização de lactose em diferentes solventes**. 2007. 132f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, 2007.

BYRNE, E. P.; FITZPATRICK, J. J. **Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of α -lactalbumin enriched whey protein precipitates**. *Biochem. Eng. J.* 10: 17-25 (2002).

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 3ed, 2000. 751p.

CAMPBELL-PLATT, G. **Fermented foods of the world – a dictionary and guide**. Londres: Butterworths, 1987.

CAO, L. **Immobilised enzymes: science or art?** *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 9, p. 217-229, 2005.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática de lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyomyces lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC. 2001.

CARPIO, C. et al. **Bone-bound enzymes for food industry application**. *Food Chem.*, v.68, p. 403, 2000.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. **Cheese whey wastewater: Characterization and treatment**. *Science of the Total Environment*. v.445-446, p. 385, 396, 2013.

CASTRO, H.F. et al. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.

CHEN, X. et al, **Bienzymatic glucose biosensor based on three dimensional macroporous ionic liquid doped sol-gel organic-inorganic composite**. *Sensors and Actuators B: Chemical* 163, 272-280, 2012. Disponível em:<
http://www.researchgate.net/profile/Cheng_Yao5/publication/257354226_Bienzymatic_glucose_biosensor_based_on_three_dimensional_macroporous_ionic_liquid_doped_solgel_organic_inorganic_composite/links/0deec51e51dfa67fea000000.pdf> Acesso em: 29 mar. 2015.

CHINELATE, G. C. B. **Estudo da imobilização das enzimas neutrase e l arabinose isomerase em suportes de baixo custo**. 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO. Fortaleza – 2013.

CLAPÉS, P.; PERA, E.; TORRES, J. L. **Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media**. *Biotechnol. Lett.* 1997, v. 19, p. 1023–1026.

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

2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 maio 2015.

DANISMAN, T. et al. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA-GMA membrane.** Food Chemistry, v. 85, p. 461-466, 2004.

DIAS, M. C. **Utilização de diferentes substrato de culturas lácteas comerciais empregadas na produção de bebidas lácteas.** 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. **Hidrolisado protéico de pescado** In: OGAWA, M. & MAIA, E. L. Manual de Pesca. São Paulo: Varela, 1999.

DRYA´KOVA´, A. et al. **Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods.** Eur Food Res Technol. v. 230, p.865–874, 2010.

ESCOBAR, G. P.; SOUZA, C. F. V.; LEHN, D. N. **Avaliação de β -galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo.** Caderno pedagógico, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 117-129, 2014. ISSN 1983-0882. Disponível em:< <http://www.univates.br/revistas/index.php/cadped/article/viewFile/973/565>> Acesso em: 25 jan. 2015.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry.** Berlin: Springer, 2004. 6ª ed., 454 p. Disponível em:< [http://fs1.uclg.ru/books/pdf/1356681024_Faber_K._-_Biotransformations_in_Organic_Chemistry_\(6th_Ed.\)_\[2011,_ENG\].pdf](http://fs1.uclg.ru/books/pdf/1356681024_Faber_K._-_Biotransformations_in_Organic_Chemistry_(6th_Ed.)_[2011,_ENG].pdf)> Acesso em: 26 ago. 2014.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. **Recent developments and applications of immobilized laccase.** Biotechnology Advances, v. 31, p.1808-1825, 2012.

FREITAS, F.F. **Otimização do processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginate de sódio com gelatin e glutaraldeído.** 243f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)– Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2007. Disponível em:< http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/4499/1/OtimizacaoProcessoImobilizacao_parte%201.pdf> Acesso em: 23 out. 2014.

FREITAS, M^a F. M. **Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyceslactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana.** 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em:< http://www.repositorio.ufc.br/ri/bitstream/riufc/4795/1/2013_dis_mfmdefreitas.pdf> Acesso em: 30 ago. 2014.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. **Hidrolisado protéico de pescado.** Rev. Ciên. Tecnol., v. 10, n 19, p. 79-89, 2002.

FURLONG, E. B. **Bioquímica: um Enfoque para “Alimentos”.** Edgraf. Rio Grande, 2000.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes.** 192p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, 2004.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. **Hidrolisis of Lactose: A Literature Review.** Process Biochemistry, v. 20, pp. 2-12, 1985.

GROSOVA, Z.; ROSEMBERG, M.; REBROS, M. **Perspectives and Applications of Immobilized β -galactosidase in food Industry – a Review.** Czech Journal of Food Science, Praha, vol. 26, n.1, pag. 1 - 14, 2008.

GUADIX, A. et al. **Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins.** Ars Pharm., vol. 41, n. 1, p. 79-89, 2000.

GUISÁN, J.M. **Immobilization of Enzymes and Cells.** 2 ed. Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 6-14.

HAIDER, T., HUSAIN, Q. **Preparation of Lactose Free Milk by Using Salt Fractionated Almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase.** Journal of the Science of Food and Agriculture. v. 87, p.1278–1283, 2007.

HAIDER, T., HUSSAIN, Q. **Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillusoryzae* β - galactosidase: Its stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose** International Journal of Biological Macromolecules, p.72-80, 2007.

HATZINIKOLAOU, D.G. et al. **Modeling of the Simultaneous Hydrolysis-Ultrafiltration whey Permeate by a Thermostable β -galactosidase from *Aspergillusoryzae*.** Biochemical Engineering Journal, v. 24, p.161-172, 2005.

LEE, K. Y.; Heo, T. R. **Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

HERNAIZ, M. J., CROUT, D. H. G. **Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an β -galactosidase from *Aspergillus Oryzae*.** Enzyme Microb.Technol, v. 27, p. 26–32, 2000.

ILLANES, A. et al. **Recent trends in biocatalysis engineering.** Bioresource technology, v. 115, p. 48-57, 2012.

JURADO, E. et al. **A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Klyveromyces fragilis*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 300-309, 2002.

KAMMOUN, R. et al, **Wheat protei hydrolysis: controlled production of low molecular weight peptides.** Poster ECB9/1853 on Ninth European Congresso n Biotechnology, July 11 – 15, Brussels ISBN 80521-1-5. 1999.

KENNEDY, J.F.; Cabral, J.M.S. **Enzyme immobilization.** Enzyme Technology, 1987.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose.** 91f. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010. Disponível em:< <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/24803/000748621.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

KRAJEWSKA, B. **Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations:** a review. *Enzyme and microbial technology*, v. 35, n. 2, p. 126-139, 2004.

KUMAR, H. R. H. et al. **Effects of enzymatic modification of milk proteins on flavour and textural qualities of set yoghurt.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, n. 1, p. 42-45, 2001.

KUMAR, M. N. V. R. **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive and functional polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LADERO M. et al. **Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β galactosidase from *Thermus sp.* strain T2:** Comparison to the free enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 31, p. 14-24, 2006.

LADERO, M. et al. **Studies on the activity and the atability of β -galactosidases from *Thermussp.* Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 392-405, 2002.

LEE, K.Y.; HEO, T.R. **Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 869–873, 2000.

LETCA, D. et al. **Immobilization of Recombination nulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain.** *Roumanian Society of Biological Sciences*, v. 9, p. 1879-1886, 2004.

LI, G. H. et al. **Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity.** *Food Science and Technology International*, v. 11, n. 4, p. 281-287, 2005.

LIMA, A. F. **Imobilização de uma β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, 2012.

LING, K. C. **Whey to Ethanol: a Biofuel Role for Diary Cooperatives?** *Agricultura Economist.* USDA Rural Development February, 2008. Disponível em:< <http://www.rd.usda.gov/files/RR214.pdf>> Acesso em: 13 nov. 2014.

LOGAN, T. C. et al. **Photopatterning enzymes on polymer monoliths in microfluidic devices for steady-state kinetic analysis and spatially separated multi-enzyme reactions.** *Analytical chemistry*, v. 79, n. 17, p. 6592-6598, 2007.

LÓPES-GALLEGO, F. et al. **Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports.** Journal of Biotechnology, v. 116, n. 1, p. 1 -10. 2005.

MACARIO, A. et al. **Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 118, p. 334-340, 2009.

MATEO, C. et al. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1451–1463, 2007. Disponível em: <
http://www.researchgate.net/profile/Jose_Guisan/publication/222340597_Improvement_of_enzyme_activity_stability_and_selectivity_via_immobilization_techniques/links/0c96053b2a8057671d000000.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2015.

MENDES, A. A. et al. **Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol, v. 38, p. 1055, 2011.

MENDES, A. et al. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** Quím. Nova, v.34, n.5, p. 831-840 2011a. Disponível em: <
http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol34No5_831_18-RV10441.pdf> . Acesso em: 04 set. 2014.

MENDES, A.A **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel.** 2009. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009. Disponível em: <
http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_arquivos/10/TDE-2009-11-30T134121Z-2682/Publico/2620.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2014.

MILETIC, N. et al. **Macroporous poly (glycidyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate) resins-versatile immobilization supports for biocatalysts.** Journal of the Molecular Catalysis. B, Netherlands, v. 56, n. 1, p. 196-201, 2009.

NIJPELS, H. H. et al. **Enzymes and Food Processing.** Appl. Sci, v.42, p.89, 1981.

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – desenvolvimento de um sistema de produção estável.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade do Minho, Portugal, 2005. Disponível em: <
<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/918/1/Tese%20de%20Mestrado.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extra celular de *rhodotorula sp.* E aplicação na produção de fruto oligossacarídeos.** 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OOSTEROM M. W. et al. **Immobilised β -galactosidases and their Use in Galatocide Synthesis.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v.134, p. 267-274, 1998.

ORTEGA N., Perez-Mateos M., Pilar M.C. and Busto M.D., 2009, **Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 57, p. 109-115.

PADILLA, R. Y. C. **Reator Enzimático de Membrana para Proteólise de Soro de Queijo, visando a Produção de Concentrado Protéico com baixo teor de fenilalanina**. 197f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp066249.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

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

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

PRETTO, F. M. et al. **Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste do hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato**. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572002000300009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 jul. 2015.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. **Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 4, p. 1434-1441, 2008.

RODRIGUES, D.S. et al. **Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 51, n.3, p. 100-109, 2008.

SALIS, A. et al. **The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the tropical lipase from *Thermomyces lanuginose***. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1646, p. 145-151. 2003.

SANTIAGO, P. et al. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. Ciência e tecnologia alimentícia, v. 24, n. 4: 567 – 572, 2004.

SCHEBOR, C. et al. **Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices**. Biotechnology progress, v. 13, n. 6, p. 857-863, 1997.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propiedades químicas y físicas**. 1ª ed. Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 121p.

SCHOFFELEN, S. ; HEST J. C. M. V. **Multi-enzyme systems: bringing enzymes together in vitro**. Soft Matter, v. 8, p 1736-1746, 2012.

SENEVIRATHNE, M., AHN, C-B., JE, J-Y. **Enzymatic Extracts from Edible Red Algae, Porphyratenera, and Their Antioxidant, Anti acetylcholinesterase, and Anti-inflammatory Activities**. Food Sci. Biotechnol. v. 19, n. 6, p. 1551-1557, 2010.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y-J. **Food applications of chitin and chitosans**. Trends in food Science & technology, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q.; SYNOWICCKI, J. **Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*mallotusvillosus*)**. Food Chemistry, London, v. 53; p. 285-293, 1995.

SHELDON, R. A. **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance**. Reviews, 2007. Disponível em: < <http://www.jaxpoker.com/biochemlab/peroxidase2.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2014.

SHIN, H. S. et al. **Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 87, n. 11, p. 2055-2060, 2007.

SOLDATKIN, O. O. et al. **Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions**. Bioelectrochemistry, v. 83, p. 25-30, 2012.

SOUZA JUNIOR, W. C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyce shansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de *galactoligos sacarídeos***. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

SUZART, C. A. G.; DIAS, J. C. T. **Desenvolvimento tecnológico de aguardente de soro de queijo**. Projeto Bolsa BITEC, IEL, SEBRAE e CNPQ. 2007.

TABOADA-PUIG, R. et al. **Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors**. BioresourceTechnology, v. 112. p. 6593-6599, 2011.

TRINDER, P. **Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor**. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. Da Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 192 p.

VIEIRA, C. R. et al. **Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates**. Food Science and Technology (Spain), v. 47, n. 3, p. 281-292, 2006.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009. Disponível em: < http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_arquivos/10/TDE-2009-07-14T143847Z-2179/Publico/2277.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2014.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2001.

VINU, A. MIYAHARA, M. ARIGA, K. **Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter.** Journal Physical Chemistry B, v. 109, p. 6436-6441, 2005.

VITOLO, M. **Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos.** In: AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial, v. 4. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. 523 p. p. 387-420, 2001.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas Imobilizadas.** In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa. Cap. 4. p. 35-85, 2004.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. **Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres.** Reactive and Functional Polymers, v. 66, p. 712-719, 2006.

ZHENG, M.-M. et al. **Immobilization of Candida rugosa lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters.** Bioresource Technology, v. 115, n. 0, p. 141-146, 2012.

ZHOU, Z. et al. **Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 154, p. 133-141, 2012.

ANEXOS

ANEXO A: Grau de hidrólise em 5 bateladas

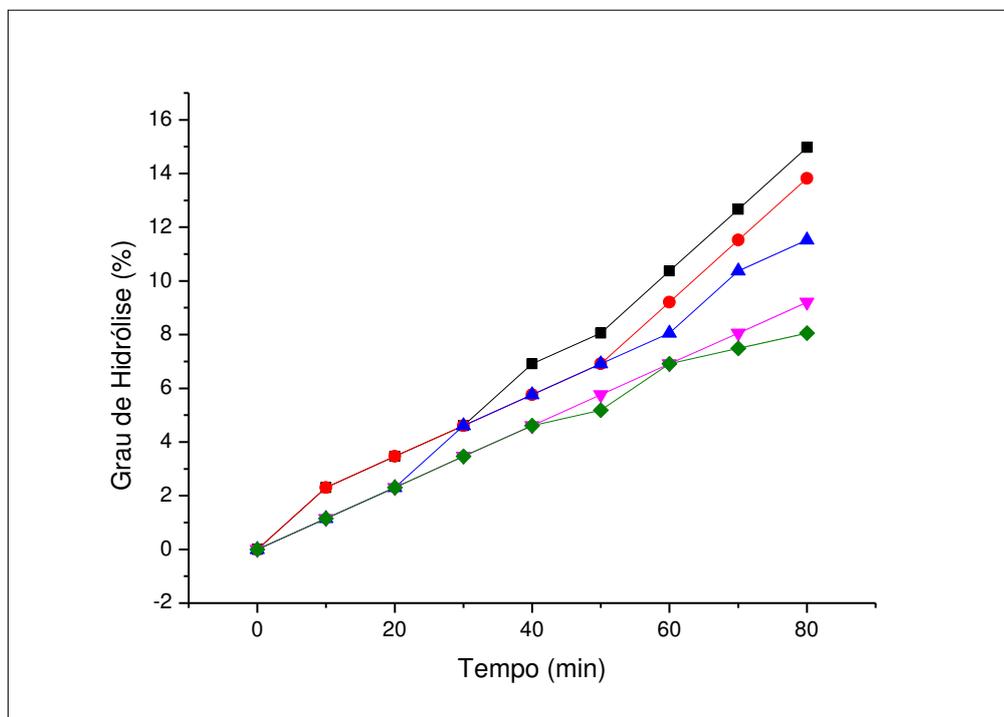


Figura 20: Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da neutrase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $330U_{NEU}\cdot g^{-1}$ de suporte coimobilizado, pH 8,0, temperatura de 50°C e tempo reacional de 80 minutos. Massa do derivado: 0,5g. (■) 1ª batelada, (●) 2ª batelada, (▲) 3ª batelada, (▼) 4ª batelada e (◆) 5ª batelada.

ANEXO B: Concentração de glicose em 5 bateladas

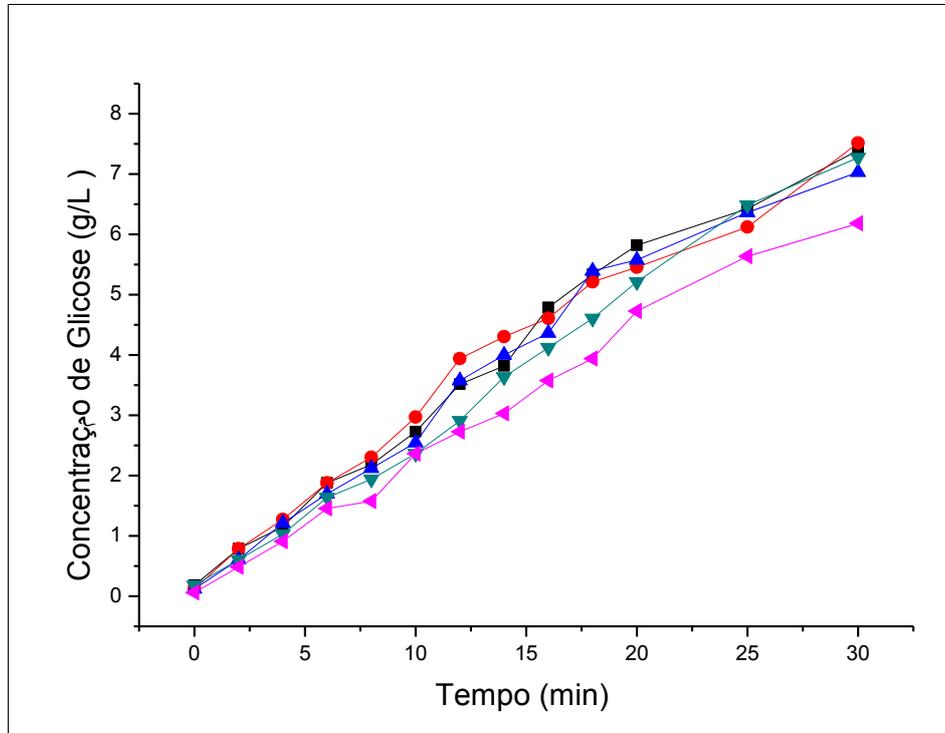


Figura 21: Perfil da estabilidade operacional em cinco ciclos consecutivos da lactase coimobilizada em suporte de quitosana ativado com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de $500U_{LAC}/g$ de suporte coimobilizado, pH 7,0 e temperatura de $37^{\circ}C$ e tempo reacional 80 minutos. (■) 1ª batelada, (♦) 2ª batelada, (▲) 3ª batelada, (▼) 4ª batelada e (◄) 5ª batelada.