



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082
EM FERMENTADOR E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA
LIVRE E IMOBILIZADA

Eng^a. Fernanda Germano Alves

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082
EM FERMENTADOR E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA
LIVRE E IMOBILIZADA

Eng^a. Fernanda Germano Alves

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e Ciência
de Alimentos

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2008

**Dedico este trabalho às pessoas que mais amo – MINHA FAMÍLIA –
meus pais Edinei e Carmen e minha irmã Ana Paula.**

“... que Deus me conceda serenidade para aceitar as coisas que não podem ser mudadas, coragem para mudar aquelas que posso modificar e sabedoria para perceber a diferença entre elas...”
São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me acompanha e me protege e, pela oportunidade de poder aprender com a realização deste trabalho e transmitir os conhecimentos adquiridos.

À minha família, meus pais Edinei e Carmen e minha irmã Ana Paula pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão, sem a qual não sou nada – AMO VOCÊS!

Ao Olavinho, pessoa especial que agradeço por fazer parte da minha vida.

À professora Susana Juliano Kalil, pelo exemplo profissional, confiança, carinho e incentivo durante toda a realização deste trabalho, enfim, por ter sido mais que uma orientadora, minha eterna admiração e gratidão.

À professora Janaína Fernandes de Medeiros Burkert pela presença valiosa e constante no decorrer de todo o trabalho, deixo meu especial agradecimento.

Ao professor Francisco Maugeri Filho por disponibilizar o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos - UNICAMP para que fosse possível a realização de parte dos experimentos realizados neste trabalho.

À banca examinadora, professores Márcia Brandão Palma, Carlos André Veiga Burkert, e Jorge Alberto Vieira Costa pelas contribuições e sugestões.

Às minhas colaboradoras Lidiane, Susan e Rosiele, pela cooperação e agradável companhia durante os experimentos realizados, deixo o meu agradecimento especial.

À Ana Sanzo e Elisane, pelo auxílio técnico, carinho e adorável companhia durante os experimentos.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Microbiologia e Engenharia de Bioprocessos da FURG pelo agradável ambiente de trabalho e por compartilharem momentos alegres e descontraídos durante a realização deste trabalho. Enfim, foi ótimo conviver com todos vocês! À Ana Paula Manera, que teve um papel muito importante no desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da UNICAMP pela acolhida e por proporcionarem momentos agradáveis durante a minha permanência em Campinas, em especial a Fifa, Rosana, Geraldo e Elizama.

À CAPES/PROCAD por proporcionar a realização do intercâmbio FURG - UNICAMP o qual contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

A CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada a vocês, não importa quantos e quais nomes vocês tenham.

Obrigada por tudo!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo geral	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Enzimas	5
2.2. Enzima β -galactosidase	6
2.3. Aplicação da β -galactosidase	6
2.4. Produção de β -galactosidase	8
2.5. Influência da agitação e da aeração em processos fermentativos	10
2.6. Imobilização enzimática	12
2.6.1. Métodos de imobilização enzimática	14
2.6.1.1. Retenção física	14
2.6.1.2. União química	14
2.6.1.3. Métodos combinados	15
2.7. Caracterização de enzimas	17
2.8. Considerações finais	18
CAPÍTULO III	20
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	20
INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082	21
RESUMO	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Microrganismo	24

2.2. Inóculo _____	24
2.3. Fermentação _____	24
2.4. Extração da enzima _____	24
2.5. Determinação dos parâmetros cinéticos do processo _____	24
2.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio _____	25
2.7. Planejamento experimental _____	26
2.7.1. Validação do planejamento experimental _____	26
2.8. Métodos analíticos _____	27
2.8.1. Determinação da biomassa _____	27
2.8.2. Determinação da atividade enzimática _____	27
2.8.3. Determinação de açúcares e etanol _____	27
2.8.4. Determinação do pH _____	27
2.8.5. Determinação do oxigênio dissolvido _____	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	27
3.1. Acompanhamento das fermentações _____	27
3.2. Avaliação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo _____	33
3.3. Estudo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio _____	35
3.4. Planejamento Experimental _____	36
3.5. Estudo da validação dos resultados obtidos no planejamento experimental _____	41
4. CONCLUSÕES _____	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	43
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082 _____	48
RESUMO _____	48
1. INTRODUÇÃO _____	49
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	50
2.1. Microrganismo _____	50
2.2. Inóculo _____	50
2.3. Produção da enzima _____	50
2.4. Extração da enzima _____	50
2.5. Imobilização enzimática _____	51
2.5.1. Determinação da recuperação _____	51
2.5.2. Determinação da eficiência da imobilização _____	51
2.5.3. Determinação rendimento do processo _____	52
2.6. Caracterização da enzima _____	52

2.6.1. Determinação do pH ótimo	52
2.6.2. Determinação da temperatura ótima	52
2.6.3. Determinação da estabilidade térmica da enzima	53
2.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	53
2.7. Métodos Analíticos	53
2.7.1. Determinação da biomassa	53
2.7.2. Determinação da atividade enzimática	53
2.7.2.1. Determinação da atividade enzimática para o substrato ONPG	54
2.7.2.2. Determinação da atividade enzimática para o substrato lactose	54
2.7.3. Determinação de proteínas	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1. Determinação da recuperação da enzima	55
3.2. Determinação da eficiência da imobilização	55
3.3. Determinação rendimento do processo	55
3.4. Determinação do pH ótimo	56
3.5. Determinação da temperatura ótima	58
3.6. Determinação da estabilidade térmica de enzima	62
3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	66
4. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO IV	78
CONCLUSÕES GERAIS	78
CONCLUSÕES GERAIS	79
CAPÍTULO V	80
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
CAPÍTULO VI	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase _____ 9

CAPÍTULO III

EFEITO DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Tabela 1: Matriz do Planejamento Experimental com variáveis reais e codificadas. __ 26

Tabela 2: Valores de atividade específica de β -galactosidase para as condições do planejamento experimental 2^2 . _____ 33

Tabela 3: Fatores de conversão obtidos no ponto de máxima atividade enzimática. _ 34

Tabela 4: Valores de produtividade e $K_L a$ para as condições do planejamento experimental 2^2 . _____ 35

Tabela 5: Matriz do Planejamento Experimental com variáveis reais e codificadas para a atividade enzimática e produtividade. _____ 36

Tabela 6: Análise de variância para atividade enzimática do planejamento experimental. _____ 38

CHARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Tabela 1: Resultados para a atividade enzimática. _____ 55

Tabela 2: Atividade enzimática relativa em função do pH. _____ 56

Tabela 3: Atividade enzimática relativa em função da temperatura. _____ 58

Tabela 4: Atividade enzimática em função da temperatura. _____ 60

Tabela 5: Valores experimentais da constante de desnaturação térmica (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da β -galactosidase em função da temperatura _____ 63

Tabela 6: Valores experimentais de atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de ONPG para a determinação dos parâmetros cinéticos. _ 66

Tabela 7: Valores experimentais de atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de lactose para a determinação dos parâmetros cinéticos. _ 67

Tabela 8: Parâmetros cinéticos para a β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de ONPG e lactose. _____ 68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Representação de algumas formas de imobilização enzimática: a) ligação covalente, b) fibra, c) *crosslinking*, d) inclusão em gel, e) força iônica, f) encapsulamento _____ 15

CAPÍTULO III

EFEITO DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Figura 1: Fermentador Biostat B utilizado nas fermentações do planejamento experimental. _____ 28

Figura 2: Acompanhamento da produção de β -galactosidase: pH, produção de biomassa, de atividade enzimática, de glicose, de galactosidase e de etanol e consumo de lactose e oxigênio dissolvido. _____ 29

Figura 3: Efeitos principais e de interação das variáveis agitação e aeração nas respostas atividade e produtividade de β -galactosidase (* $p < 0,05$). _____ 37

Figura 4: Superfícies de (a) resposta e de (b) contorno para a atividade de β -galactosidase como uma função das variáveis agitação e aeração. _____ 39

Figura 5: Superfícies de (c) resposta e de (d) contorno para a produtividade como uma função das variáveis agitação e aeração. _____ 39

Figura 6: Acompanhamento da produção da enzima β -galactosidase na melhor condição do planejamento experimental completo. _____ 42

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Figura 1: β -galactosidase imobilizada em gel de alginato de cálcio. _____ 54

Figura 2: Atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função do pH. _____ 57

Figura 3: Atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da temperatura. _____ 59

Figura 4: Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase livre de *K. marxianus* CCT 7082 para o cálculo da energia de ativação. _____ 61

Figura 5: Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada de *K. marxianus* CCT 7082 para o cálculo da energia de ativação. _____ 61

Figura 6: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) para a enzima livre. _____ 65

Figura 7: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_a) para a enzima imobilizada. _____	65
Figura 8: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para a β -galactosidase livre de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 para o substrato ONPG. _____	68
Figura 9: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para a β -galactosidase imobilizada de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 para o substrato ONPG. ____	69
Figura 10: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a β -galactosidase livre de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 para o substrato lactose. _____	69
Figura 11: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a β -galactosidase imobilizada de <i>K. marxianus</i> CCT 7082 para o substrato lactose. ____	70
Figura 12: Velocidade de reação da β -galactosidase livre de <i>K.marxianus</i> CCT 7082 em função da concentração de ONPG. _____	71
Figura 13: Velocidade de reação da β -galactosidase imobilizada de <i>K.marxianus</i> CCT 7082 em função da concentração de ONPG. _____	72
Figura 14: Velocidade de reação da β -galactosidase livre de <i>K.marxianus</i> CCT 7082 em função da concentração de lactose. _____	72
Figura 15: Velocidade de reação da β -galactosidase imobilizada de <i>K.marxianus</i> CCT 7082 em função da concentração de lactose. _____	73

NOMENCLATURA

C_L = concentração de oxigênio no meio (%)

C^* = concentração de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar (%)

C_{livre} = concentração de proteína em solução ($mg.mL^{-1}$)

$C_{filtrado}$ = concentração de proteína no filtrado ($mg.mL^{-1}$)

E = concentração da enzima ativa ($\mu mol.mL^{-1}$)

E_a = energia de ativação ($Kcal.mol^{-1}$)

E_d = energia de ativação da reação de desnaturação ($Kcal.mol^{-1}$)

K_d = constante cinética de desnaturação térmica (min^{-1})

K_{La} = coeficiente de transferência de oxigênio (h^{-1})

K_m = constante de Michaelis-Menten (mM)

$Prod_{máxima}$ = produtividade no máximo de atividade ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)

R^2 = coeficiente de correlação

R_g = constante dos gases ($cal^{-1}.mol.K^{-1}$)

rpm = rotações por minuto

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida (h)

U = unidade de atividade enzimática (U)

$U_{filtrado}$ = atividade enzimática no filtrado ($U.mL^{-1}$)

$U_{imobilizada}$ = atividade da enzima imobilizada ($U.mL^{-1}$)

U_{livre} = atividade da enzima livre ($U.mL^{-1}$)

V = velocidade de reação ($U.mL^{-1}$)

V_0 = velocidade inicial de reação ($U.mL^{-1}$)

$V_{filtrado}$ = volume do filtrado (mL)

$V_{imobilizada}$ = volume de enzima imobilizada (mL)

V_{livre} = volume de enzima livre (mL)

$V_{máx}$ = velocidade máxima de reação ($U.mL^{-1}$)

vvm = volume de meio por volume de ar por minuto

$Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em célula (g célula. g substrato⁻¹)

$Y_{X/P}$ = fator de conversão de produto em célula (mg célula. U⁻¹)

$Y_{P/S}$ = fator de conversão de substrato em produto (U. g substrato⁻¹)

RESUMO

A β -galactosidase é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em plantas, órgãos de animais e microrganismos. A hidrólise da lactose via enzimática vem sendo uma alternativa para as indústrias alimentícias, visto que os açúcares resultantes deste processo, glicose e galactose, são mais solúveis e doces, o que proporciona melhorias nas características sensoriais de produtos lácteos e, desenvolvimento de alimentos com baixo teor desse carboidrato, tornando-os ideais a consumidores intolerantes a este açúcar. O aumento da demanda industrial da β -galactosidase resulta na necessidade do estudo da agitação e da aeração, visando obter um produto de elevada atividade. A utilização de enzimas na indústria alimentícia é muitas vezes limitada devido a sua baixa estabilidade. Uma das alternativas é o emprego de enzimas imobilizadas para reduzir os problemas causados pela utilização de enzimas solúveis em aplicações industriais. A presente dissertação teve por objetivo geral o estudo das condições de produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada. No primeiro estudo foi avaliada a influência da agitação e da aeração na produção da enzima por fermentação submersa em fermentador Biostat B de 2 L, utilizando a técnica de planejamento experimental, através de um planejamento experimental 2^2 (4 ensaios e 3 pontos centrais), onde as condições estudadas foram: 200; 350; 500 rpm e 0,5; 1,0; 1,5 vvm para a agitação e a aeração, respectivamente. Neste estudo verificou-se que a agitação e a aeração, exerceram influência na produção da enzima, sendo a condição mais favorável 500 rpm e 1,5 vvm, respectivamente, atingindo uma produtividade de $1,2 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, uma atividade enzimática de 17 U.mL^{-1} e uma concentração celular de 11 mg.mL^{-1} . Em um segundo estudo foi realizada a imobilização da β -galactosidase empregando a técnica de inclusão em gel de alginato de cálcio, seguida da caracterização das enzimas livre e imobilizada, quanto ao pH e temperatura ótimos, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica. Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática foram testados valores de pH entre 4,6 e 8,6. A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada pela atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25 a 60°C . Os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e lactose. A estabilidade térmica foi estudada determinando-se a constante cinética de desnaturação térmica, o tempo de meia vida e a energia de ativação da reação de desnaturação, incubando-se a enzima nas temperaturas de 30 a 45°C . Os valores ótimos de pH e temperatura não foram alterados quando a enzima foi imobilizada, obtendo como resultados pH 6,6 e 37°C , respectivamente, para ambas as formas enzimáticas. Os resultados dos parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , para a enzima livre foram 15,1 mM e $18,9 \text{ U.mL}^{-1}$; 93,71 mM e $43,9 \text{ U.mL}^{-1}$ para os substratos ONPG e lactose, respectivamente. Para a enzima na forma imobilizada os resultados para K_m e V_{max} foram 18,5 mM e $3,9 \text{ U.mL}^{-1}$; 115,7 mM e $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente, utilizando ONPG e lactose. Com relação à estabilidade térmica enzimática, a equação de Arrhenius pôde ser aplicada para estabelecer uma relação entre a constante cinética de desnaturação térmica e a temperatura. Pela equação de Arrhenius determinou-se as energias da reação de ativação ($9,4$ e $2,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) e de ativação da reação de desnaturação (100 e $106 \text{ Kcal.mol}^{-1}$), respectivamente, para β -galactosidase livre e imobilizada.

Palavras-chave: aeração, agitação, alginato, fermentação, imobilização.

ABSTRACT

Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 in fermenter and partial characterization of the soluble and immobilized enzyme

β -galactosidase is widely distributed in nature and it can be found in plants, organs of animals and microorganisms. The enzymatic hydrolysis of lactose has been an alternative to the food industries, because the result sugars of this process, glucose and galactose, are more soluble and sweet, providing improvements in sensory characteristics of dairy products, and development of products without lactose, ideal to consumers intolerant to this sugar. The increased of the industrial demand of β -galactosidase results in the necessity to study the agitation and aeration, to obtain a product of high activity. The use of enzymes in the food industries is sometimes limited due to the low stability. One of the alternatives is the use of immobilized enzymes to reduce the problems caused by the use of soluble enzymes in industrial applications. The present dissertation had as main goal the study of the conditions of β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 and the partial characterization of the free and immobilized enzyme. In the first study, the influence of the agitation and the aeration was evaluated in the enzyme production by submerged fermentation in Biostat B fermenter of 2 L, using experimental design 2^2 (4 assays with three replicates at the center point); the study conditions were: 200, 350, 500 rpm and 0.5, 1.0, 1.5 vvm for agitation and aeration, respectively. In this study the agitation and aeration, influenced in the β -galactosidase production, and the favorable condition was 500 rpm and 1.5 vvm, respectively, obtaining $1.2 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for productivity, 17 U.mL^{-1} for the enzymatic activity and a cellular concentration of 11 mg.mL^{-1} . In a second study of β -galactosidase was immobilized employing the technique of calcium alginate gel inclusion, followed by the characterization of this enzyme, and comparison between free and immobilized enzymes, as for optimum pH and temperature, kinetic parameters and thermal stability. For the study of the influence of pH on the enzymatic activity, values of pH between 4.6 and 8.6 were tested. The influence of temperature on the enzyme reaction was determined at 25 to 60 °C. The kinetic parameters were determined employing *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) and lactose. The thermal stability was studied in order to determinate the deactivation rate constant, the half-life and the deactivation energy, incubating the suspension enzyme at 30 to 45 °C. The optimum values for pH and temperature weren't changed by the immobilization process, obtaining as results pH 6.6 and 37 °C, respectively. The results for the K_m and V_{max} for soluble enzyme were 15.1 mM and 18.9 U.mL^{-1} ; 93.7 mM and 43.9 U.mL^{-1} for ONPG and lactose, respectively; and for immobilized enzyme the results for K_m and V_{max} were 18.5 mM and 3.9 U.mL^{-1} ; 115.7 mM and 3.7 U.mL^{-1} , respectively, for ONPG and lactose. In relation to the enzymatic thermal stability, the Arrhenius equation could be applied to establish a relation between deactivation rate constant and temperature. By the Arrhenius equation were determined the activation energy ($9.4 \text{ e } 2.1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) e deactivation energy ($100 \text{ e } 106 \text{ Kcal.mol}^{-1}$), respectively, for the soluble and immobilized enzyme.

Keywords: aeration, agitation, alginate, fermentation, immobilization

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de reações e diferentemente da grande maioria dos catalisadores inorgânicos, possuem a vantagem de serem facilmente encontradas na natureza e apresentarem maior atividade catalítica e alta especificidade, além de uma maior sensibilidade ao controle catalítico (KRAJEWSKA, 2004; van-BELIEN & LI, 2002).

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23), conhecida também como lactase, é uma enzima classificada como hidrolase, sendo responsável por catalisar a hidrólise da lactose em glicose e galactose. A sua importância industrial está na sua aplicação na indústria de laticínios, na hidrólise da lactose de leites, obtendo assim, alimentos com baixos teores deste carboidrato, melhorando a solubilidade e digestibilidade de leites e derivados lácteos (JURADO *et al.*, 2002; MAHONEY, 1998).

O tratamento da lactose presente no leite e seus derivados pela ação da β -galactosidase vem sendo motivo de estudo por muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as β -galactosidasas são também galactotransferase, enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos (ALMEIDA & PASTORE, 2001).

A versatilidade das leveduras do gênero *Kluyveromyces* como microrganismo de interesse industrial tem sido amplamente ilustrada pela literatura, sendo este microrganismo aplicado industrialmente por apresentar habilidade em utilizar a lactose como fonte de carbono, e de sintetizar a β -galactosidase (BELEM & LEE, 1998a; INCHAURRONDO *et al.*, 1994).

Com relação à produção da enzima, o estudo da agitação e da aeração é importante, pois fornecem oxigênio para o microrganismo durante o processo de fermentação, exercendo grande influência no consumo de substrato pelos microrganismos, podendo facilitar ou inibir a síntese de um determinado produto (SCHNEIDER *et al.*, 2001; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 1998).

De acordo com Yu & Li (2006), o estudo da atividade e da estabilidade de enzimas é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, com isto pode-se obter informações sobre as propriedades da enzima e ajudar a aperfeiçoar a viabilidade econômica de processos industriais.

A utilização de enzimas na indústria alimentícia é limitada devido a fatores como instabilidade operacional, custos e dificuldade de recuperação para a reutilização após o término do processo catalítico. Técnicas de imobilização

enzimática vêm sendo bastante estudadas a fim de diminuir ou eliminar os problemas pelo emprego de enzimas solúveis em processos industriais (MATEO *et al.*, 2007; KRAJEWSKA, 2004). A maioria das enzimas imobilizadas utilizadas em processos de hidrólise é de origem microbiana, por apresentarem baixo custo, boa estabilidade e elevada atividade catalítica (FUREGON *et al.*, 1996).

Estudos cinéticos envolvendo β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces* vêm sendo executados utilizando tanto a enzima livre como na forma imobilizada, sendo que parte destes tem sido bastante investigado para a hidrólise da lactose contida no leite (ZHOU & DONG, 2001).

O laboratório de Microbiologia - FURG tem desenvolvido pesquisas com relação à enzima β -galactosidase através de trabalhos de iniciação científica, projetos de graduação e dissertações de mestrado desde 2004. Manera (2006) realizou um screening de microrganismos produtores desta enzima, selecionando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 como a melhor produtora desta enzima; além da otimização do meio de cultura para esta levedura. Outros trabalhos foram realizados a partir desta referida dissertação: Lisboa *et al.* (2005) estudaram métodos de ruptura celular para extração de β -galactosidase e sua purificação por sistema aquoso bifásico. Grunennvaldt *et al.* (2006) purificaram a enzima utilizando a técnica da precipitação. Atualmente está em estudo às condições ótimas de purificação de β -galactosidase por sistema aquoso bifásico e por coluna de troca iônica, além do isolamento e identificação de leveduras com potencial de produção de β -galactosidase em soro de leite.

Em continuidade dessas pesquisas verificou-se que existe a necessidade do estudo das condições ótimas para a produção da β -galactosidase. Entretanto, existe uma ausência do emprego da metodologia de planejamento experimental para as variáveis, agitação e aeração. Dentro desse contexto, este trabalho visou estudar a aeração e a agitação, na produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, bem como caracterizar parcialmente a enzima nas formas livre e imobilizada.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo das condições de processo, aeração e agitação, para a produção de β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima nas formas livre e imobilizada.

1.1.2. Objetivos específicos

- Produzir a enzima β -galactosidase por fermentação submersa em fermentador Biostat B;
 - Estudar a influência da agitação e aeração na produção de β -galactosidase utilizando a técnica de planejamento de experimentos;
- Promover a imobilização da enzima β -galactosidase por técnica de inclusão em gel;
 - Caracterizar parcialmente a enzima β -galactosidase livre e imobilizada quanto ao pH e temperatura ótimos, parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) e estabilidade térmica;
 - Comparar as enzimas nas formas livre e imobilizada, verificando se ocorrem alterações nas propriedades.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

As enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas; sendo formadas dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos e bactérias. São elas que controlam várias funções vitais incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerar a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficiente (LEHNINGER, 1997).

Enzimas apresentam um potencial de utilidade muito grande devido ao seu poder catalítico e seu alto grau de especificidade. A seleção da fonte para a produção de uma determinada enzima depende da consideração de uma série de fatores, tais como: especificidade, pH, temperatura, estabilidade, ativação, inibição, disponibilidade e custo (MATEO *et al.*, 2007; OLEMPSKA-BEER *et al.*, 2006; LEHNINGER, 1997).

A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: a natural, formada por tecidos animais e vegetais, de onde as enzimas podem ser extraídas e usadas *in natura* ou extraídas e purificadas; e a cultivada, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas (SILVA & FRANCO, 1999).

A obtenção de enzimas de origem microbiana é bem mais aplicada e difundida que a de origem vegetal, isto devido ao fato de que os microrganismos têm um ciclo curto quando comparados com os vegetais e, apresentam baixo custo de obtenção (HERNALSTEENS, 2006).

A aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa quando comparada aos processos químicos por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas, além de utilizarem substratos de baixo custo e exigirem um tempo curto de produção. Apresentam vasta aplicação no setor alimentício e farmacêutico por serem substâncias naturais, apresentarem elevada especificidade catalítica, atuarem em condições brandas de temperatura e pH (MEDEIROS, 1999; SILVA & FRANCO, 1999).

De acordo com a literatura, dentro das enzimas empregadas na indústria alimentícia, destaca-se a β -galactosidase no processamento de leite e derivados (LADERO *et al.*, 2000; REED & NAGODAWITHANA, 1993; GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

2.2. Enzima β -galactosidase

A utilização de microrganismos para a geração de produtos de interesse comercial tem recebido crescente atenção por parte da indústria de alimentos. Neste contexto, encontra-se a enzima β -galactosidase produzida por microrganismos, que pode ser empregada na hidrólise da lactose do leite, visando obter um produto com baixo teor de lactose, ideal para consumidores intolerantes a este açúcar (JURADO *et al.*, 2002).

A enzima β -galactosidase ou lactase, como também é conhecida, é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs; em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta como, também, produzida por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (RICHMOND *et al.*, 1981).

Segundo Gékas & Lopez-Leiva (1985), as propriedades da lactase variam conforme a sua fonte. O peso molecular da enzima, por exemplo, pode variar de 850 000 Daltons para a *E. coli* até 201 000 e 90 000 Daltons para *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente. A temperatura e o pH ótimos de operação podem diferir de acordo com a fonte enzimática ou quando se utiliza a enzima imobilizada. Lactases provenientes de fungos filamentosos e de leveduras possuem, respectivamente, o pH e temperatura ótimos de operação nas faixas de 3,0 - 5,0 e 50 – 55°C; 6,0 – 7,0 e acima de 40°C ocorre desnaturação (HOLSINGER & KLIGERMAN, 1991; ROBINSON, 1991).

O substrato natural mais encontrado para a β -galactosidase é a lactose, principal açúcar presente no leite e em produtos lácteos, sendo um dissacarídeo que apresenta baixa solubilidade e baixo poder adoçante (SEIBOTH *et al.*, 2007; HOLSINGER & KLIGERMAN, 1991). A β -galactosidase hidrolisa a lactose em glicose e galactose, dois monossacarídeos, que apresentam uma maior doçura, além de serem mais solúveis e digestíveis que a lactose, o que os torna mais facilmente absorvidos pelo intestino (TANRISEVEN & DOGAN, 2002; MAHONEY, 1998).

2.3. Aplicação da β -galactosidase

Com o rápido avanço tecnológico, novos processos vêm sendo desenvolvidos para promover o aumento na qualidade dos alimentos e atender aos consumidores em geral. Dentro deste contexto, a indústria alimentícia passou a introduzir novas técnicas em sua linha de processamento, envolvendo uso de enzimas

que fossem capazes de conferir ao produto final características que atendessem a demanda da população (MARIOTTI *et al.*, 2000; REED & NAGODAWITHANA, 1993).

A β -galactosidase é uma importante enzima utilizada em indústrias alimentícias atuando na hidrólise da lactose, sendo um processo promissor no desenvolvimento de produtos sem a presença da lactose em suas composições. Esta enzima também pode ser utilizada na elaboração de produtos lácteos a fim de evitar a modificação, como cristalização e textura arenosa, em produtos que contenham lactose (BELEM & LEE, 1998a; GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; DICKSON & MARTIN, 1980).

A lactose pode ser empregada como um ingrediente em produtos alimentícios por apresentar uma suave doçura, proporcionando um sabor agradável, além de ser um bom emulsificante e por apresentar um efeito positivo na absorção do cálcio e na produção de ácido láctico no intestino. Em sorvetes a sacarose pode ser substituída, em torno de 20%, por xaropes de lactose hidrolisada. O processo de maturação de queijos pode ser acelerado por meio do emprego de β -galactosidase e, em iogurtes, a adição de xarope de soro hidrolisado dispensa a etapa de pré-evaporação necessária para concentrar o leite. Além disso, a lactose hidrolisada por esta enzima pode ser empregada como essência para sucos, vinhos, calda de fruta enlatada e refrigerante de fruta (MAHONEY, 1998; SANTOS *et al.*, 1998; KARDEL *et al.* 1995; YANG & SILVA, 1995; HOLSINGER & KLIGERMAN, 1991; ROBINSON, 1991; MacBEAN, 1979; MAHONEY *et al.*, 1974).

Segundo Gekas & López-Leiva (1985), a hidrólise da lactose contida no leite é de grande importância devido ao problema da intolerância de um grande número de pessoas que não são capazes de hidrolisar a lactose devido à falta de enzimas específicas em seus tratos digestivos. Em virtude da insuficiência de enzima intestinal, algumas pessoas revelam-se intolerantes a produtos que contenham lactose (RICHMOND *et al.*, 1981). A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como Galactosemia, e ocorre devido aos baixos níveis ou ausência de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo, conseqüência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade, causando sintomas como diarreia, fortes dores abdominais e inchaços (CAMPBELL *et al.*, 2005; SANTIAGO *et al.*, 2004; SZILAGYI, 2002).

Além disso, outro fator importante é a formação de galactooligossacarídeos (GOS) pela ação da β -galactosidase. Os GOS são formados

por lactose e unidades de galactose e são compostos não digestíveis e não degradados pelas enzimas digestivas humanas, promovendo o crescimento de bifidobactérias no intestino, gerando efeitos saudáveis para órgãos como o intestino e o fígado, pois promovem o crescimento da microflora intestinal (GAUR *et al.*, 2006; MAHONEY, 1998; PLAYNE & CRITTENDEN, 1996). Além disso, a ingestão de GOS aumenta a mineralização óssea e a resistência contra fraturas, devido à estimulação da absorção de cálcio; além de também serem utilizados em confeitos e iogurtes como açúcares de baixa cariogenicidade (BROUNS & VERMMER, 2000).

2.4. Produção de β -galactosidase

Processos fermentativos requerem um substrato ou nutriente, sendo geralmente um açúcar, como sacarose, glicose ou lactose, como fonte de carbono. Também, necessitam de uma fonte de nitrogênio e finalmente nutrientes em menor quantidade como vitaminas (WAINWRIGHT, 1995).

Muitas enzimas microbianas são produzidas por fermentação em submerso, dentre elas, destaca-se a β -galactosidase. A quantidade de β -galactosidase produzida depende de vários fatores como a composição do meio de cultura, temperatura de cultivo, pH do meio e, ainda, da agitação e concentração de oxigênio dissolvido no meio (VINIEGRA-GONZALES *et al.*, 2003).

Na fermentação submersa, o microrganismo é introduzido no meio como inóculo, onde se desenvolve. Nesse tipo de cultura, um grande número de fatores contribui ao desenvolvimento de qualquer forma morfológica, incluindo o tipo e a concentração da fonte de carbono, de nitrogênio e de fosfato, traços de minerais, oxigênio dissolvido, pH, temperatura, geometria de fermentador, como também, sistemas de agitação e aeração (PAPAGIANNI, 2004).

Segundo a literatura, existe uma grande variedade de microrganismos que apresentam a habilidade de produzir β -galactosidase. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de microrganismos produtores de β -galactosidase relatados na literatura.

Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase

Microrganismo	Referência
<i>Aspergillus aculeatus</i>	WILLEMIEK <i>et al.</i> (2000).
<i>Aspergillus niger</i>	DOMINGUES <i>et al.</i> (2005).
<i>Bullera singularis</i>	SHIN <i>et al.</i> (1998).
<i>Erwinia aroideae</i>	FLORES & ALEGRE (1996).
<i>Flavobacterium keratolyticus</i>	LENG <i>et al.</i> (1998).
<i>Guehomyces pullulans</i>	NAKAGAWA <i>et al.</i> (2006).
<i>Haloferax alicantei</i>	HOLMES <i>et al.</i> (1997).
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MANERA (2006), MEDEIROS <i>et al.</i> (2008), CORTÉS <i>et al.</i> (2005), MARQUES (2003), PINHEIRO <i>et al.</i> (2003), RAJOKA <i>et al.</i> (2004), SANTIAGO <i>et al.</i> (2004), MARTINS <i>et al.</i> (2002), SCHNEIDER <i>et al.</i> (2001), PINHEIRO <i>et al.</i> (2000), RECH <i>et al.</i> (1999), BELEM & LEE (1998b), TOMÁSKA <i>et al.</i> (1995).
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BECERRA <i>et al.</i> (2004), KIM <i>et al.</i> (2004), NUMANOGLU & SUNGUR (2004), RAMÍREZ MATHEUS & RIVAS (2003), CARMINATTI (2001), GENEVA <i>et al.</i> (2001), ZHOU & CHEN (2001), DICKSON & MARKIN (1980).
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	VASILJEVIC & JELEN (2001).
<i>Penicillium chrysogenum</i>	NAGY <i>et al.</i> (2001).
<i>Penicillium simplicissimum</i>	CRUZ <i>et al.</i> (1999).
<i>Pyrococcus woesei</i>	SOBIEWSKA <i>et al.</i> (2000).
<i>Streptococcus thermophilus</i>	RAO & DUTTA (1977).
<i>Thermus</i> sp	PESSALA <i>et al.</i> (2003).

Dentre os microrganismos produtores de β -galactosidase destaca-se as leveduras do gênero *Kluyveromyces* que apresentam potencial de uso industrial, por fermentarem a lactose de leite e soro, apresentando-se como fonte desta enzima (RUBIO-TEXEIRA, 2006; RECH *et al.* 1999; BITZILEKIS & BARNETT, 1997).

A utilização das leveduras deste gênero é interessante comercialmente, pois são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo aceitas pelo

FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA para a produção de compostos farmacêuticos e alimentícios (HENSING *et al.*, 1994).

O emprego de leveduras do gênero *Kluyveromyces* para produção de β -galactosidase oferece algumas vantagens, como: bom rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; aceitabilidade como um microrganismo seguro, aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias; podem crescer a uma ampla faixa de temperatura; atividade de β -galactosidase mais alta em algumas cepas de *Kluyveromyces marxianus*, que outras leveduras quando a lactose é usada como substrato e alta velocidade de crescimento (RUBIO-TEXEIRA, 2006; BELEM & LEE, 1998a; RECH, 1998; INCHAURRONDO *et al.*, 1994).

2.5. Influência da agitação e da aeração em processos fermentativos

Os estudos dos efeitos das condições de operação, como temperatura, pH, velocidade de agitação, taxa de aeração e oxigênio dissolvido são importantes para a compreensão de um processo fermentativo (FENG *et al.*, 2003). O oxigênio é necessário para todas as culturas aeróbias para manter uma concentração apropriada de oxigênio dissolvido no meio de cultura e, também, é importante para proporcionar uma operação eficiente do reator (RECH, 1998).

Em processos aeróbios, o oxigênio torna-se um substrato fundamental e devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas é necessária uma transferência contínua de oxigênio da fase gasosa para a líquida, de modo a manter o metabolismo celular (NIELSEN & VILLADSEN, 1994).

Segundo Wang *et al.* (1979), a agitação e aeração nos processos de fermentação têm dois objetivos. O primeiro é fornecer oxigênio aos microrganismos com o propósito de atingir as atividades metabólicas. E, o segundo, é manter os microrganismos em suspensão através de uma pequena parcela de agitação do meio.

Segundo Borzani *et al.* (2005), a transferência de oxigênio durante um processo fermentativo ocorre em três partes distintas:

- Transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida (meio de cultura), sendo que esta depende da interface gás-líquido ao redor das bolhas de ar;
- Distribuição do oxigênio até as células que depende de uma suficiente agitação do meio de cultura;

- Consumo de oxigênio pelas células: resistência pela película existente na superfície das células e, também, pela velocidade da reação de absorção do oxigênio.

Silva-Santisteban & Maugeri (2005), estudando a influência da agitação e da aeração sobre a produção de inulinase em cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, verificaram que em baixos níveis de agitação e aeração, essas variáveis apresentaram-se importantes. Entretanto, quando os níveis de agitação e aeração foram altos, a agitação foi mais importante. Nesses estudos, foi verificado que a produção de inulinase diminuiu quando a agitação foi maior que 450 rpm, apesar do incremento na transferência de oxigênio. Verificou-se, no entanto, uma queda brusca na concentração celular, que segundo os autores, pode ser decorrente de um fenômeno conhecido como estresse mecânico. O processo fermentativo foi otimizado com uma agitação de 450 rpm e uma aeração de 1,0 vvm.

O estresse mecânico pode ser definido como a junção de todos os efeitos mecanicamente originados, que afetam negativamente o objetivo principal do processo em estudo. A agitação e a aeração estão intimamente ligados ao estresse mecânico em bioprocessos (MÄRKL & BRONNENMEIER, 1985).

Schneider *et al.* (2001), otimizando a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, constataram que a relação agitação/aeração exerceu influência no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, bem como no rendimento da atividade enzimática, obtendo condições otimizadas de 700 rpm e 0,66 vvm, e que um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em torno de 60 h^{-1} conduziu a uma maior produtividade enzimática.

Pinheiro *et al.* (2000) investigaram se o aumento da taxa de transferência de oxigênio gerava um aumento de rendimento, de biomassa e de produtividade empregando espécies de *Kluyveromyces*. Nesse estudo, os autores observaram que a aeração apresentou um efeito positivo no crescimento e no comportamento da levedura. Entretanto, os autores verificaram que um efeito tóxico pode vir a ocorrer se a concentração de oxigênio for muito elevada, refletida pela diminuição na concentração celular.

Esses mesmos autores em 2003, estudando a atividade da enzima β -galactosidase em culturas de *Kluyveromyces marxianus*, a 330 rpm e 1,0 vvm, verificaram que o aumento da concentração de oxigênio não provocou efeito tóxico na produção dessa levedura, podendo ser utilizado como um parâmetro de otimização na produção de β -galactosidase.

Feng *et al.* (2003), estudando o efeito da aeração e da agitação na produção de β -manase, verificaram que a agitação afetou a concentração de oxigênio dissolvido no processo, influenciando diretamente no crescimento do microrganismo e na produção da enzima. Os experimentos foram conduzidos variando a agitação em 450, 600 e 750 rpm a uma aeração constante de 0,75 vvm. As condições ótimas obtidas de temperatura, agitação e aeração, para a produção de β -manase foram 600 rpm e 0,75 vvm, respectivamente.

Nesse estudo, os autores verificaram que a agitação de 450 rpm foi considerada baixa fazendo com que o fornecimento de oxigênio fosse insuficiente para o desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, da enzima. Já uma agitação mais elevada (600 rpm) aumentou a quantidade de oxigênio dissolvido, bem como a dispersão dos nutrientes que compõem o meio de cultura, o que proporcionou um maior contato entre substrato e microrganismo e um aumento na produção da biomassa e da enzima. Entretanto, a estabilidade da enzima foi afetada pela elevação da velocidade de agitação (700 rpm) provocando aquecimento no meio de cultivo e, conseqüentemente, prejudicando o processo fermentativo.

Belem & Lee (1998a), estudando a influência da aeração na produção de oligonucleotídeos por *Kluyveromyces marxianus*, observaram que houve um aumento de rendimento e biomassa com o aumento da aeração. O mesmo foi verificado por Milner *et al.* (1996) na produção de α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizando 800 rpm e 1,7 vvm.

Barberis & Segovia (1997), estudando a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, em reator nas condições de 30 °C, 800 rpm e 3,0 vvm, verificaram que a enzima foi influenciada pela aeração do meio. O microrganismo foi consumindo o substrato e utilizando o oxigênio dissolvido no meio fazendo com que houvesse uma maior produção enzimática.

2.6. Imobilização enzimática

As enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas e, ao contrário da maioria dos catalisadores inorgânicos, enzimas são geralmente solúveis e instáveis e, conseqüentemente, só podem ser utilizadas uma vez quando em soluções livres (MESSING, 1975).

A utilização de enzimas imobilizadas como catalisadores de processo vem justamente tentar reduzir ou, até mesmo eliminar os entraves que limitam o emprego de enzimas solúveis em aplicações industriais, tais como instabilidade operacional,

custos e dificuldade de recuperação para a reutilização após o término do processo catalítico (REGULY, 2000).

Imobilização é a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, prevenindo assim sua migração para o meio onde se encontram o substrato e o produto, de forma que a enzima encontre-se física ou quimicamente associada a um suporte ou a uma matriz. As enzimas em solução se comportam como outro soluto qualquer, tendo total liberdade de movimento, mas quando imobilizadas sua liberdade é altamente restringida (BICKERSTAFF, 1997; ROSEVEAR, 1984).

O sucesso da utilização industrial de enzimas imobilizadas depende diretamente da sua atividade inicial e estabilidade. A vantagem dos processos com enzimas imobilizadas quando comparados a processos com enzimas livres, é a reutilização deste catalisador, o que minimiza os custos com a enzima e custos operacionais. Desta forma, a imobilização vem, em muitos casos, atuar como solução e possível aplicação em larga escala. Uma vez imobilizada, cria-se a possibilidade de uso contínuo (Van-BELIEN & LI, 2002; ARROYO, 1998; ROYER, 1980; DIXON & WEBB, 1979; MESSING, 1975).

Além disso, segundo Dalla-Vecchia *et al.* (2004), o interesse na imobilização enzimática é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, quando comparada a sua forma livre, sendo que a imobilização pode aumentar ou diminuir a estabilidade da enzima.

Outro fator relevante para a utilização de enzimas imobilizadas é que se estabelece um maior controle sobre o processo, pois torna-se possível parar a reação quando necessário alterando algum parâmetro de reação ou fechando-se a vazão do biorreator. O emprego de enzima livre acarreta a inevitável presença do biocatalisador como parte integrante do meio, caso não houver uma etapa de separação da enzima (SANGEETHA *et al.*, 2005).

De acordo com Bickerstaff (1997), a escolha do suporte para a imobilização deve considerar as seguintes características: estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano; funcionalidade química; durabilidade e capacidade de reutilização; compatibilidade aceitável com a enzima e substrato; custo e facilidade de manuseio.

2.6.1. Métodos de imobilização enzimática

Sabe-se que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes, mas sim uma gama de possibilidades e aplicações. Baseando-se em Hartmeier (1998), Bickerstaff (1997), Faber (1997), Wiseman (1991), Rosevear (1984) e Royer (1980), os métodos de imobilização apresentam o mesmo propósito: reter altas concentrações de enzimas, sendo divididos em retenção física, união química e métodos combinados.

2.6.1.1. Retenção física

- **Inclusão em gel:** as enzimas são incluídas em cavidades interiores ou em malhas de um polímero sintético ou polissacarídeo, formando uma estrutura rígida suficiente para prevenir perda da enzima como, também, para permitir o livre movimento do substrato no interior do gel. O entrelaçamento pode ser efetuado misturando o biocatalisador com um polímero, submetendo esta mistura a cátions polivalentes em uma reação de troca iônica, formando uma malha polimérica com o biocatalisador no interior dos espaços vazios. Como exemplos: géis de colágeno, ágar, alginato e fibras;
- **Encapsulamento:** as enzimas são rodeadas e separadas do meio de reação através de membranas, sendo permeáveis apenas ao substrato e ao produto. Este método consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima fica aprisionada no interior de micelas ou ainda através de uma membrana fibrosa semipermeável. Problemas relacionados com difusão são maiores neste processo, podendo até ocorrer ruptura da membrana se houver acúmulo de produto. Como exemplo: nylon, sílica e nitrato de celulose.

2.6.1.2. União química

- **Adsorção:** é um método simples que envolve interações químicas fracas entre a enzima e a superfície do suporte. Neste caso, as forças envolvidas geralmente são eletrostáticas como força de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Apesar dessas ligações serem muito fracas, são suficiente grandes em número para garantir razoáveis ligações. Como vantagem deste método temos a simplicidade, o baixo custo e a rapidez; como desvantagens, a possibilidade de perda do biocatalisador em função da dessorção da enzima como resultado de ligações do substrato, contaminantes ou produtos de reação com o suporte. Como exemplo: carvão, hidróxido de alumínio;

- **Ligação covalente:** este método envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima e o suporte, sendo mais estáveis que as citadas nas técnicas de adsorção. As ligações são normalmente formadas entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e grupos pertencentes a resíduos de aminoácidos da superfície da enzima. Inicialmente os grupos funcionais do suporte são ativados por algum reagente e posteriormente procede-se com a adição da enzima para promover a ligação covalente. Dentre os materiais utilizados como suporte temos: celulose, dextrana, amido, agarose, zircônio e nióbio;
- **Crosslinking:** ocorre formação de uniões intermoleculares entre a enzima e um segundo composto, gerando ligações irreversíveis, mas sem a necessidade de um suporte para formar a estrutura. Porém, o uso do *crosslinking* pode causar alterações conformacionais como o impedimento dos sítios ativos. Como exemplo: glutaraldeído.

2.6.1.3. Métodos combinados

No caso de um único método ainda não apresentar estabilidade suficiente, pode-se aplicar métodos em seqüência como *crosslinking* da enzima seguido da imobilização ou o *crosslinking* da enzima já imobilizada. Por exemplo: quitosana e glutaraldeído.

A Figura 1 apresenta alguns exemplos de imobilização enzimática.

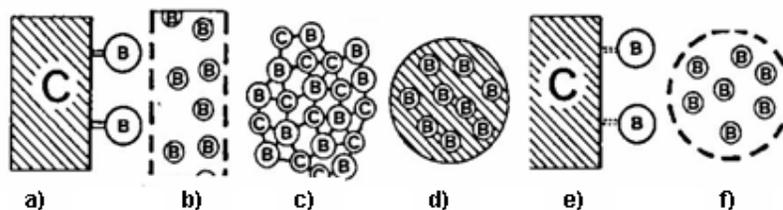


Figura 1: Representação de algumas formas de imobilização enzimática:

- a) ligação covalente, b) fibra, c) *crosslinking*, d) inclusão em gel, e) força iônica, f) encapsulamento.

Segundo Arroyo (1998), quanto mais complexo e de maior custo for o método escolhido, mais duradouros e estáveis serão os sistemas obtidos. WISEMAN (1991) afirma que os métodos que envolvem forças de ligação são mais fracos que os de força química. A eficiência do processo poderá ser comprometida caso a afinidade do suporte com a enzima não for estável o suficiente, causando perda da enzima ao longo do processo; ou, também, se a afinidade da enzima com o suporte for maior que com o substrato (LASKIN, 1985).

De acordo com Cabral *et al.* (1983), cada método de imobilização possui limitações específicas e aplicações particulares. Desta forma, na escolha é importante considerar a facilidade de preparo, o custo, a atividade e a estabilidade da enzima imobilizada.

A hidrólise enzimática da lactose pode ser realizada tanto por enzimas livres como por imobilizadas. A utilização da enzima β -galactosidase livre e imobilizada, tem recebido bastante atenção em indústrias alimentícias para hidrolisar a lactose (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985). β -galactosidase em solução podem ser utilizadas na hidrólise da lactose. Considerações adicionais indicam que o uso desta enzima imobilizada aplicada na hidrólise da lactose presente no soro é economicamente praticável, apesar do custo da enzima e do processo de imobilização (GIACOMINI *et al.*, 1998).

O alginato é extraído de algas marrons como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*. É um polissacarídeo altamente degradável quando aquecido por tempo prolongado. Sua viscosidade aumenta a pH abaixo de 4,0 e, também, pela presença de íons cátion, como os quais pode formar géis (HEO *et al.*, 2000; BOBBIO & BOBBIO, 1992).

O entrelaçamento em alginato de cálcio é um método rápido, atóxico, de fácil reprodutibilidade e de baixo custo. Na presença de cátions monovalentes o alginato forma sais em água, mas na presença de cátions polivalentes como Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} é formado um polímero inerte através de reação de troca iônica, formando uma malha polimérica com o biocatalisador no interior dos espaços vazios, propriedade esta usada para a inclusão de enzimas na matriz do alginato (STAMATIS *et al.*, 2006; BICKERSTAFF, 1997).

2.7. Caracterização de enzimas

O estudo da estabilidade enzimática é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, pois pode promover informações sobre a estrutura das enzimas e facilitar o seu manuseio em reatores, além da possibilidade de contribuir com a viabilidade econômica de processos e de fácil utilização industrialmente. A estabilidade pode ser influenciada por fatores ambientais como temperatura, pH, agitação, aeração, meio de cultura, entre outros que podem afetar a estrutura da enzima (JURADO *et al.*, 2004).

Segundo Santos (2002), enzimas imobilizadas apresentam diferenças quando comparadas às enzimas livres, podendo estas serem observadas nas suas propriedades após o processo de imobilização, tais como: atividade enzimática e estabilidade enzimática. Por esse motivo o estudo da caracterização de enzimas, tanto imobilizadas como livres é de grande valia para conhecer quais são as vantagens e desvantagens da utilização de cada uma delas em processos enzimáticos.

A temperatura e o pH operacional é a característica que define a aplicação de uma dada lactase, pois controla a atividade e influencia na estabilidade enzimática (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985). Diante disso, torna-se interessante o conhecimento se essas propriedades sofrem alteração quando se utiliza a enzima imobilizada.

O pH e a temperatura ótimos diferem de acordo com a fonte da enzima extraída. Técnicas de imobilização de enzimas também podem afetar estes ótimos. As propriedades ótimas da lactase dependem da fonte de origem, fazendo com que cada uma apresente uma aplicação específica. Em geral, lactases de mofo apresentam um pH ótimo em torno de 2,5 - 4,5; as de bactérias, 6,5 - 7,5; e, as oriundas de leveduras, 6,0 - 7,0 (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

Segundo Klibanov (1979), para a produção de produtos em largas quantidades industriais, as enzimas deveriam ser imobilizadas para serem utilizadas em reatores. A estabilidade da enzima pode ser também drasticamente melhorada mediante adequadas técnicas de imobilização. No caso da β -galactosidase, alguns procedimentos de imobilização vêm sendo estudados, como: interação iônica, adsorção, afinidade, ligação covalente.

O comportamento cinético de enzimas imobilizadas comparado com o apresentado por enzimas na forma livre pode ser muito diferente, devido aos efeitos conformacionais. A imobilização de enzimas é muito interessante para o desenvolvimento de processos enzimáticos industriais para a compreensão e a caracterização do comportamento cinético enzimático (LADERO *et al.*, 2000).

Esses mesmos autores estudando a estabilidade térmica da β -galactosidase, proveniente de *Kluyveromyces fragilis*, livre e imobilizada, na hidrólise da lactose, observaram que a enzima imobilizada apresentou-se mais estável a 40 °C. Além disso, a enzima apresentou-se ativa a 5 °C, podendo a vir a ser aplicada na produção de produtos lácteos resfriados com a finalidade de evitar a cristalização e, também, aumentar a digestibilidade e sabor.

Zhou & Dong (2001) realizaram a caracterização da enzima β -galactosidase livre e imobilizada, proveniente de *Kluyveromyces lactis*, utilizando glutaraldeído. Nesses estudos, eles verificaram que a imobilização aumentou a estabilidade da enzima.

Banerjee *et al.* (1985), estudando a imobilização de β -galactosidase proveniente de *Saccharomyces anamensis*, obtiveram como dados ótimos 4,5 e 26 °C, para pH e temperatura, respectivamente, e constataram que a imobilização não afetou os valores ótimos de pH e temperatura. Os valores de K_m da enzima livre e imobilizada foram 102 mM e 148 mM, respectivamente.

Tanriseven & Dogan (2002), estudando a imobilização de β -galactosidase proveniente de *Aspergillus oryzae*, observaram que as condições ótimas desta enzima não foram afetadas pela imobilização, obtendo os mesmos valores ótimos de pH e temperatura, 4,5 e 50 °C, respectivamente. Entretanto, a β -galactosidase imobilizada mostrou-se mais estável em valores elevados de temperatura, pois a 70 °C ainda apresentava atividade, enquanto que a enzima na forma livre havia desnaturado.

Segundo Santos (2002), a escolha da enzima na forma solúvel ou imobilizada depende de uma avaliação econômica do processo, onde as vantagens e desvantagens devem ser analisadas de forma quantitativa, com o estudo sobre a cinética e estabilidade das enzimas sob as duas formas, levando em consideração os custos envolvidos no processo.

2.8. Considerações finais

Conforme observado na revisão bibliográfica, existe um interesse na obtenção da enzima β -galactosidase, devido a sua importância industrial, bem como na obtenção de galactooligossacarídeos. Desta forma, torna-se de fundamental importância ter estabelecidos as condições para a produção desta enzima, como as condições de agitação e aeração, bem como temperatura, pH e concentração dos componentes do meio de cultura. No entanto, dentre a literatura pesquisada, foi observada a falta de artigos que empreguem a metodologia do Planejamento

Experimental para a definição das variáveis estudadas. Além disso, o estudo da caracterização de enzimas nas formas livre e imobilizada vem a ser um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, promovendo assim um maior conhecimento das propriedades da β -galactosidase, além de obter informações com relação às vantagens e desvantagens da utilização de cada uma dessas formas enzimáticas.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

**INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
 β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082**

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Fernanda Germano Alves, Susana Juliano Kalil*

Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Departamento de Química, Laboratório de Microbiologia, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900, (53) 32338754, *dqmsjk@furg.br

RESUMO

A β -galactosidase é uma enzima classificada como hidrolase, sendo responsável por catalisar a hidrólise da lactose em glicose e galactose, dois monossacarídeos que apresentam uma maior doçura, além de serem mais digeríveis, e mais facilmente absorvidos pelo intestino. Esta enzima apresenta grande importância tanto no campo da medicina, no tratamento da intolerância à lactose, como na tecnologia de alimentos prevenindo a cristalização da lactose, sendo assim uma enzima promissora do ponto de vista industrial. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência das variáveis, agitação e aeração, na produção da enzima β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em cultura submersa em fermentador Biostat B de 2 L. Foi realizado um planejamento experimental 2^2 (4 ensaios e 3 pontos centrais) para avaliar o efeito da agitação e da aeração na atividade enzimática e na produtividade. As condições estudadas foram: 200; 350; 500 rpm e 0,5; 1,0; 1,5 vvm, respectivamente. Ao longo de cada ensaio foi realizado o acompanhamento da atividade enzimática, biomassa, açúcares, oxigênio dissolvido, etanol e pH. De acordo com os resultados obtidos, a condição mais favorável à produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador foi 500 rpm e 1,5 vvm para a agitação e aeração, respectivamente, obtendo uma produtividade de $1,2 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, uma atividade de 17 U.mL^{-1} e uma concentração celular de 11 mg.mL^{-1} em 14 h.

Palavras-chave: aeração, agitação, fermentação, planejamento experimental.

1. INTRODUÇÃO

A utilização da β -galactosidase em produtos industriais derivados do leite é uma das promissoras aplicações de enzimas no processamento de alimentos (LADERO *et al.*, 2000), tal importância está na sua aplicação em indústrias de laticínios, pois esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em seus monossacarídeos, glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixo teor de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes a esse dissacarídeo (JURADO *et al.*, 2002).

O estudo das condições operacionais como temperatura, pH, agitação e aeração exercem papel importante para estabelecer as condições de crescimento do microrganismo e posterior síntese enzimática (FENG *et al.*, 2003; MILNER *et al.*, 1996).

O fornecimento de oxigênio aos meios fermentativos é um fator decisivo no crescimento dos microrganismos aeróbios ou facultativos, pois a eficiência da aeração depende da solubilização do oxigênio e da capacidade do biorreator para satisfazer a demanda de oxigênio da população microbiana (GALACTION *et al.*, 2004).

De acordo com Giavasis *et al.* (2006), a agitação controla a transferência de nutriente e a distribuição de oxigênio, enquanto que a aeração determina a oxigenação da cultura e, também, contribui para aumentar a mistura dos nutrientes do meio de cultura, especialmente onde as taxas de agitação mecânica são baixas.

O aumento da demanda industrial de β -galactosidase resulta na necessidade de métodos de produção que assegurem a viabilidade econômica da hidrólise de lactose (NOR *et al.*, 2001). Na produção de β -galactosidase é de fundamental importância o estudo das condições do processo visando obter um produto de elevada atividade enzimática. Dentro deste contexto, além do meio de cultura, também é importante ter bem definida as condições de agitação e aeração para o crescimento da levedura e produção da β -galactosidase (PINHEIRO *et al.*, 2003).

No presente trabalho a agitação e a aeração foram estudadas a fim de verificar a influência dessas variáveis na produção de β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, por fermentação submersa em fermentador de bancada, através da técnica de planejamento experimental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado para produzir a enzima β -galactosidase foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP e previamente selecionada por Manera *et al.* (2008). A cultura foi mantida a -18°C , em tubos de ensaio contendo glicerol, conforme Pinheiro *et al.* (2003).

2.2. Inóculo

O inóculo, acrescido de 10% v/v do microrganismo em glicerol, foi preparado em meio de cultura conforme Pinheiro *et al.* (2003). As condições de cultivo foram 30°C , 180 rpm por 14 h, em incubadora rotativa (MARQUEZ *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.3. Fermentação

A enzima foi produzida por fermentação submersa contendo meio de cultura otimizado por Manera *et al.* (2008), acrescido de 10% v/v de inóculo. As fermentações foram conduzidas em Fermentador Biostat B de 2 L (B. Braun Biotech International) com um volume útil de 1,5 L, temperatura mantida a 30°C , pH ajustado para 6,0 e, não mais controlado durante o processo.

Durante as fermentações, em intervalos de tempo pré-determinados, foram realizadas as leituras de pH e oxigênio dissolvido e retiradas amostras para acompanhamento de biomassa, açúcares, etanol e atividade enzimática.

2.4. Extração da enzima

Para obtenção da enzima β -galactosidase intracelular, as células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foram rompidas pelo uso conjugado de ondas ultrassônicas e abrasão por pérolas de vidro, conforme proposto por Medeiros *et al.* (2008).

2.5. Determinação dos parâmetros cinéticos do processo

Os parâmetros cinéticos foram calculados para os pontos em que se obteve máxima produção enzimática, sendo, portanto, consideradas para o cálculo as concentrações no respectivo tempo do processo e tendo como referência as concentrações no início da fermentação. As Equações 1 a 3 foram utilizadas para o

cálculo dos fatores de conversão máxima: substrato em célula ($Y_{X/S}$), célula em produto ($Y_{P/X}$) e substrato em produto ($Y_{P/S}$), respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{(S - S_i)}{(X - X_i)} \quad (\text{Equação 1})$$

$$Y_{P/X} = \frac{(X - X_i)}{(P - P_i)} \quad (\text{Equação 2})$$

$$Y_{P/S} = \frac{(S - S_i)}{(P - P_i)} \quad (\text{Equação 3})$$

A produtividade máxima foi calculada como sendo a relação entre as atividades enzimáticas máxima e inicial alcançada em cada ensaio e o seu respectivo tempo; conforme a Equação 4.

$$\text{Prod}_{\text{máxima}} = \left(\frac{\text{Atividade}_{\text{máxima}} - \text{Atividade}_{\text{inicial}}}{t_{\text{atividade máxima}} - t_{\text{atividade inicial}}} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

2.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($K_L a$) foi determinado, em duplicata, pelo método do borbulhamento, para cada combinação de agitação e aeração referentes ao planejamento experimental, conforme GALACTION *et al.* (2004).

Supondo a transferência de massa em duas fases, a seguinte dedução foi utilizada na determinação do $K_L a$ (Equações 5 a 8). Onde, C_L e C^* são as concentrações de oxigênio no meio e de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar, respectivamente.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot (C^* - C_L) \quad (\text{Equação 5})$$

$$\int_0^C \frac{dC}{(C^* - C_L)} = \int_0^t K_L a \cdot dt \quad (\text{Equação 6})$$

$$-\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = K_L a \cdot t \quad (\text{Equação 7})$$

Fazendo:

$$OD = \frac{C \cdot 100}{C^*}$$

Temos:

$$K_L a \cdot t = -\ln\left(\frac{100 - OD}{100}\right) \quad (\text{Equação 8})$$

2.7. Planejamento experimental

A influência da agitação e da aeração na produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi avaliada através de um planejamento experimental 2^2 (4 ensaios e 3 pontos centrais). As faixas estudadas no planejamento foram selecionadas de acordo com a literatura e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz do Planejamento Experimental com variáveis reais e codificadas.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
1	-1 (200)	-1 (0,5)
2	+1 (500)	-1 (0,5)
3	-1 (200)	+1 (1,5)
4	+1 (500)	+1 (1,5)
5	0 (350)	0 (1,0)
6	0 (350)	0 (1,0)
7	0 (350)	0 (1,0)

2.7.1. Validação do planejamento experimental

Para validar o planejamento experimental, foram realizadas fermentações em duplicata com a melhor condição estudada. Para avaliar o comportamento cinético do processo, foi realizado o acompanhamento da biomassa, açúcares, pH, oxigênio dissolvido, etanol e atividade enzimática.

2.8. Métodos analíticos

2.8.1. Determinação da biomassa

A concentração de célula foi medida por densidade ótica a 620 nm, e convertida para gramas de célula seca por litro conforme curva padrão (RECH *et al.*, 1999).

2.8.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato segundo Inchaurredo *et al.* (1994).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

2.8.3. Determinação de açúcares e etanol

As concentrações de lactose, glicose, galactose e etanol foram determinadas através de análises em HPLC modelo Varian 9010. Para isso foi utilizada uma coluna cromatográfica de marca Bio Rad modelo HPX 87H climatizada na temperatura de 30°C. Como eluente utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico pH 1,4 com um fluxo de 0,70 mL.min⁻¹.

2.8.4. Determinação do pH

O pH foi medido através de eletrodo acoplado no próprio fermentador.

2.8.5. Determinação do oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido foi determinado através de um eletrodo polarográfico no próprio fermentador Biostat B.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Acompanhamento das fermentações

Através do planejamento experimental foi possível estudar a influência da agitação e da aeração na produção da β -galactosidase, bem como realizar o acompanhamento das fermentações realizadas no fermentador Biostat B apresentado na Figura 1.

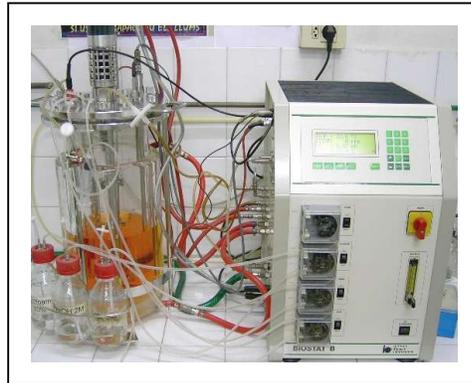


Figura 1: Fermentador Biostat B utilizado nas fermentações do planejamento experimental.

A Figura 2 apresenta o acompanhamento da produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, envolvendo pH, oxigênio dissolvido, produção de biomassa, atividade enzimática, consumo de lactose, produção de glicose, galactose e etanol, durante as fermentações realizadas no fermentador Biostat B.

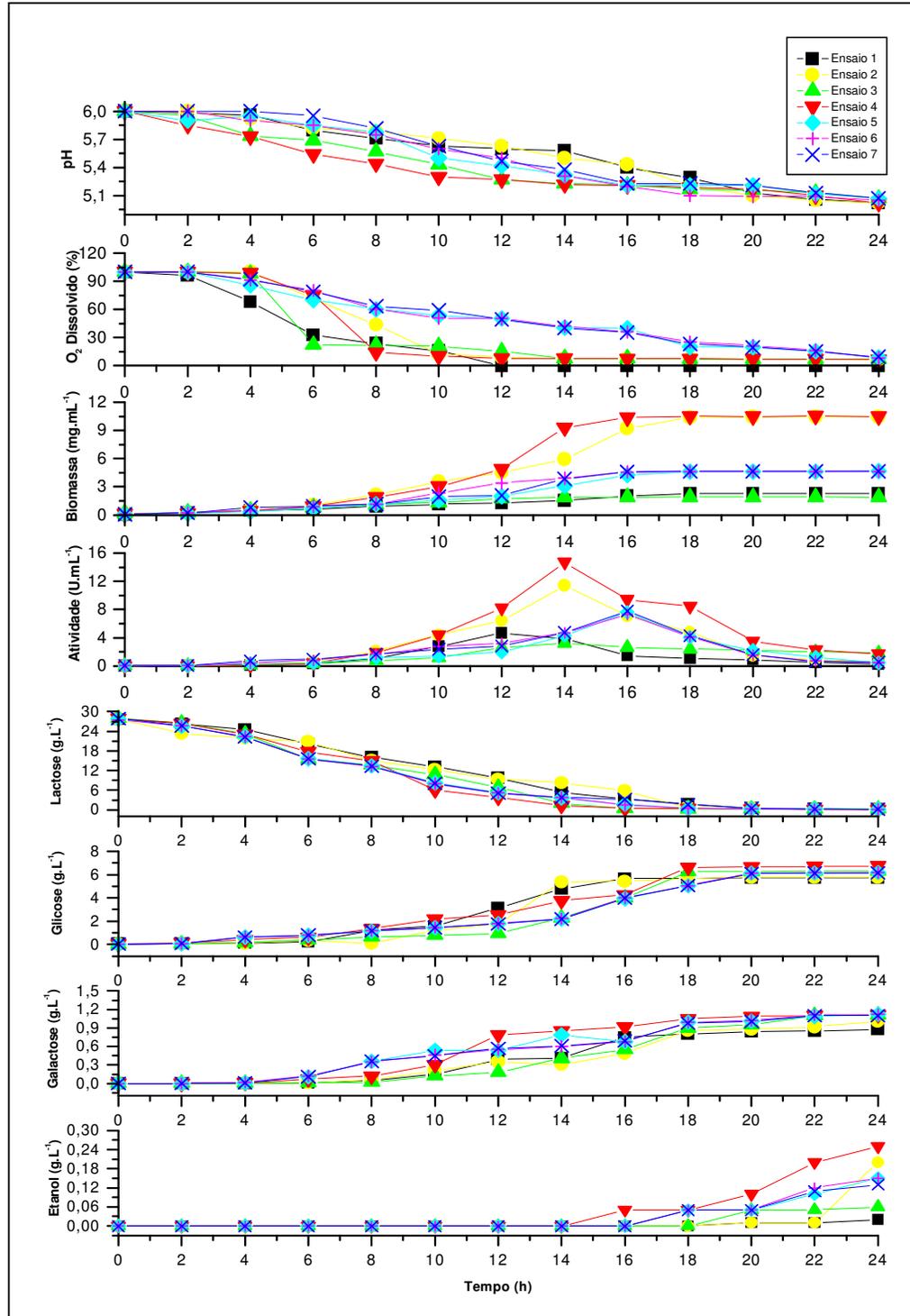


Figura 2: Acompanhamento de produção da β -galactosidase: pH, produção de biomassa, de atividade enzimática, de glicose, de galactose e de etanol e consumo de lactose e oxigênio dissolvido.

Pela análise da Figura 2 pode-se verificar que todas as fermentações apresentaram comportamento semelhante, evidenciado pelo consumo de substrato, aumento da concentração de biomassa e da produção enzimática. Apesar dessa semelhança no crescimento, as concentrações celulares e atividade enzimática máximas obtidas diferiram para cada condição estudada, atingindo valores de 1,9 a 10,5 mg.mL⁻¹ e de 3,2 a 14,7 U.mL⁻¹, respectivamente.

A máxima produção da biomassa e a queda no pH acompanharam o consumo da lactose até o esgotamento, sendo que os picos de atividade enzimática para os ensaios referentes aos pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) coincidiram com o início da fase estacionária às 16 h, e para os demais ensaios (1, 2, 3 e 4) ocorreram ao final da fase exponencial de crescimento, às 14 h.

As fermentações foram iniciadas com um pH no valor de 6,0 e não mais controlada durante todo o experimento. Os resultados mostraram que não ocorreu variação expressiva no pH (6,0 – 5,0). Para Schneider *et al.* (2001), quando o sistema está submetido a condições insuficientes de agitação, ocorre abaixamento do pH em função do acúmulo de CO₂. Em fermentações conduzidas em condições superiores às estudadas poderia ocorrer uma maior liberação de CO₂, proveniente do metabolismo do microrganismo e o pH não reduziria.

O comportamento do crescimento microbiano apresentou-se bem característico para os diferentes ensaios, pois após a inoculação, teve-se a fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura, que coincidiu com o consumo lento de oxigênio dissolvido e lactose até as 2 h para o ensaio 1 e até 4 h para os demais ensaios. Resultado semelhante foi verificado por Cortés *et al.* (2005), durante a produção de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. Em seguida, começou o incremento da biomassa até níveis constantes e esgotamento da lactose.

Longhi *et al.* (2004) estudando o acompanhamento de cultura de *Kluyveromyces marxianus* observaram que a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu zerada por aproximadamente 10 h, enquanto que a concentração celular manteve-se constante; após esse intervalo a concentração de oxigênio dissolvido voltou a subir. Comportamento semelhante ao observado por estes autores foi verificado no presente trabalho; entretanto não foi possível observar a elevação da concentração de oxigênio dissolvido, pois os experimentos foram interrompidos em 24 h, visto que já havia ocorrido o pico de atividade de β-galactosidase.

Segundo Pinheiro *et al.* (2000), quando a concentração de lactose é baixa, a levedura *Kluyveromyces marxianus* metaboliza o substrato restante completamente,

produzindo biomassa e etanol; sendo que no presente trabalho, só foi detectado etanol após 16 horas de fermentação, quando a atividade enzimática começou a diminuir para todos os ensaios e a concentração celular permaneceu constante até o final dos experimentos. Além disso, o microrganismo ao invés de começar a consumir os produtos da hidrólise da lactose, pode ter feito uso de alguns compostos que foram sendo produzidos durante o processo fermentativo, como galactooligosacarídeos, fazendo com que as concentrações de glicose e galactose permanecessem constantes e ocorresse a produção de etanol (aproximadamente $0,2 \text{ g.L}^{-1}$) nos ensaios com maior agitação (500 rpm). Tal suposição torna-se pertinente em função que a hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase pode formar estes compostos (BOON, *et al.*, 2000; RUSTON *et al.*, 1998); ou, ainda que em virtude da produção de etanol ter sido tão baixa, não conseguiu-se detectar variação nas concentrações de glicose e galactose, como pode ser observado na Figura 2.

Barberis & Segovia (1997), estudando a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, a 30°C , 800 rpm e 3,0 vvm em batelada, batelada com controle de oxigênio dissolvido e batelada alimentada com controle de oxigênio dissolvido obtiveram concentrações de etanol de 4,00; 0,94 e $0,20 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. No presente trabalho, somente em batelada simples e sem controle de oxigênio dissolvido foi possível obter apenas $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, o que sugere ser um excelente resultado; enquanto que os autores citados, para atingir uma baixa concentração de etanol foi preciso trabalhar em batelada alimentada e com controle de oxigênio.

A concentração de oxigênio dissolvido começou a sofrer um decréscimo a partir das 2 - 4 h do processo fermentativo, correspondendo ao início do incremento de biomassa. Durante a fase de crescimento logarítmico, o oxigênio começou a ser consumido mais rapidamente.

Segundo Bandaipheth & Prasertsan (2006), estudando a produção de um exopolissacarídeo, verificaram que o aumento da concentração celular provocou um aumento da viscosidade do meio de cultivo, provocando uma diminuição da turbulência e do oxigênio dissolvido em função da elevada resistência de transferência de oxigênio; como foi observado no presente trabalho nos ensaios 2 e 4, onde foram obtidas concentração celular máximas em torno de $10,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

De acordo com os mesmos autores, a taxa do suprimento de oxigênio dissolvido deve ser pelo menos igual à taxa da demanda de oxigênio. Nos ensaios 1 e 3 onde foram utilizadas menores taxas de agitação (200 rpm), foi possível observar que o fornecimento de oxigênio no meio fermentativo não correspondeu à demanda

celular, fazendo com que este fosse um fator limitante no processo, pois proporcionou baixa produção de biomassa o que originou menores valores de atividade enzimática.

Goodhue *et al.* (1986) citam que, mesmo em fermentadores eficientemente aerados, a concentração de oxigênio dissolvido pode ser levada a zero por um cultivo em crescimento rápido, como o observado, neste trabalho, no ensaio 4, cuja condição foi a melhor obtida para a produção de β -galactosidase (1,5 vvm e 500 rpm), pois a quantidade de oxigênio dissolvido não foi suficiente para atender a demanda da concentração celular, atingindo $10,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Para Feng *et al.* (2003) uma agitação baixa faz com que o fornecimento de oxigênio seja insuficiente para o desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, da enzima. Já, uma agitação elevada aumenta quantidade de oxigênio dissolvido, bem como a dispersão dos nutrientes que compõem o meio de cultura, o que proporciona um maior contato entre substrato e microrganismo, proporcionando um aumento do crescimento da biomassa e uma maior produção da enzima; como foi verificado no presente trabalho quando foi utilizada agitação de 500 rpm (ensaios 2 e 4), atingindo $11,4$ e $14,7 \text{ U.mL}^{-1}$ para a atividade enzimática e aproximadamente $10,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para a biomassa, respectivamente para esses ensaios.

Os melhores resultados foram obtidos com maior agitação, no entanto, segundo Silva-Santisteban & Maugeri (2005), e Schneider *et al.* (2001) estudando cultura de *Kluyveromyces marxianus*, verificaram que um aumento na velocidade de agitação pode acarretar uma queda brusca na concentração celular, apesar do incremento na transferência de oxigênio, devido ao efeito de cisalhamento, sugerindo a importância de um estudo a cerca da viabilidade celular durante o processo fermentativo.

Apesar da produção volumétrica de β -galactosidase ter variado quantitativamente de acordo com cada condição estudada, a atividade específica (por mg de biomassa) mostrou-se semelhante em quase todas as fermentações, como pode ser visualizado na Tabela 2, pois seguiu a produção celular, uma vez que o aumento de biomassa proporcionou maior atividade volumétrica, evidenciando que as diferentes condições estudadas de agitação e aeração exerceram influência na produção de biomassa e atividade enzimática volumétrica (U.mL^{-1}), e não em termos de atividade específica (U.mg^{-1}).

Tabela 2: Valores de atividade específica de β -galactosidase para as condições do planejamento experimental 2².

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
1	-1 (200)	-1 (0,5)	3,6
2	+1 (500)	-1 (0,5)	1,9
3	-1 (200)	+1 (1,5)	1,7
4	+1 (500)	+1 (1,5)	1,7
5	0 (350)	0 (1,0)	1,8
6	0 (350)	0 (1,0)	1,6
7	0 (350)	0 (1,0)	1,7

Os ensaios 1, 2, 3 e 4 foram os que apresentaram seus picos de máxima atividade no mesmo tempo de fermentação (14 horas); sendo que os ensaios 2 e 4 apresentaram maiores valores de atividade de β -galactosidase (11,4 e 14,7 U.mL⁻¹, respectivamente), enquanto que os ensaios 1 e 3 foram menos eficientes alcançando apenas 4,7 e 3,2 U.mL⁻¹, respectivamente. Já nos demais ensaios (5, 6 e 7), referentes aos pontos centrais do planejamento, os picos de atividade foram nas 16 horas de fermentação, apresentando valor médio de 7,6 U.mL⁻¹.

Pode-se verificar que nos ensaios onde utilizou-se valores mais elevados de agitação, obteve-se concentrações celulares mais elevadas e maior atividade volumétrica.

3.2. Avaliação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo

Com base nas curvas cinéticas apresentadas no acompanhamento das fermentações (Figura 2) avaliou-se a eficiência do processo de produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Para isto, através dos pontos em que se obteve atividade enzimática máxima, foram calculados os fatores de conversão substrato em célula ($Y_{X/S}$), célula em produto ($Y_{P/X}$) e substrato em produto ($Y_{P/S}$), que se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Fatores de conversão obtidos no ponto de máxima atividade enzimática.

Ensaio	$Y_{X/S}$ (g célula. g substrato ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (U.mg célula ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (U. g substrato ⁻¹)
1	0,07	0,26	0,26
2	0,30	0,51	0,58
3	0,07	0,54	0,12
4	0,35	0,53	0,65
5	0,16	0,55	0,29
6	0,17	0,51	0,28
7	0,19	0,59	0,32

Pelo esboçado na Tabela 3, é possível observar que os fatores de conversão de substrato em célula, célula em produto e substrato em produto variam de 0,07 a 0,35 g célula. g substrato⁻¹, 0,26 a 0,59 U.mg célula⁻¹ e 0,12 a 0,65 U. g substrato⁻¹, respectivamente.

Os resultados de fatores de conversão variaram entre os ensaios em função das condições que cada um deles foi operado; obtendo, consumos diferentes de substratos que acarretou produções diferentes de biomassa e de enzima.

Como o ensaio 4 foi aquele em que obteve maiores concentração celular e de atividade enzimática, obteve-se um $Y_{X/S}$ (0,35 g célula. g substrato⁻¹) mais elevado que os demais, ou seja, este foi o ensaio em que se obteve uma maior conversão de substrato em biomassa; como também ocorreu quando se analisou a conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), obtendo 0,65 U. g substrato⁻¹.

Analisando os fatores de conversão célula em produto ($Y_{P/X}$), pode-se verificar que os valores mantiveram-se praticamente constante para todos os ensaios, com exceção de ensaio 1 que apresentou um menor valor (0,26 U⁻¹.mg célula), pois a agitação e a aeração influenciaram apenas na produção de biomassa e atividade enzimática volumétrica, e não em termos de atividade específica (U.mg⁻¹).

Com relação ao fator de conversão substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), resultados similares ao encontrado no presente trabalho, no Ensaio 4, foram obtidos por Rech & Ayub (2007) e Lukondeh *et al.* (2005), ao estudarem a produção de β -galactosidase em cultura de *Kluyveromyces marxianus* em bioreator, obtendo os respectivos valores 0,4 e 0,38 g célula. g substrato⁻¹.

3.3. Estudo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Através do método do borbulhamento e pelas Equações 3 a 6 foram determinados os valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) para as diferentes condições realizadas no planejamento experimental, que encontram-se na Tabela 4, juntamente com os valores obtidos para a atividade enzimática e produtividade do processo.

Tabela 4: Valores de produtividade e K_{La} para as condições do planejamento experimental 2².

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Produtividade (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	K_{La} (h ⁻¹)
1	-1 (200)	-1 (0,5)	4,7	0,39	48,8
2	+1 (500)	-1 (0,5)	11,4	0,82	79,8
3	-1 (200)	+1 (1,5)	3,2	0,23	61,4
4	+1 (500)	+1 (1,5)	14,7	1,05	167,2
5	0 (350)	0 (1,0)	7,6	0,48	91,6
6	0 (350)	0 (1,0)	7,4	0,46	91,6
7	0 (350)	0 (1,0)	7,8	0,49	91,6

O K_{La} está relacionado com a agitação, aeração, tipo de agitador, viscosidade do meio de cultura e geometria do fermentador. No presente trabalho, o valor do K_{La} variou de 48,8 a 167,2 h⁻¹ conforme os ensaios do planejamento experimental; valores estes correspondentes aos ensaios submetidos a condições mais brandas (200 rpm e 0,5 vvm) e severas (500 rpm e 1,5 vvm) de agitação e aeração, respectivamente.

É interessante observar que as condições que apresentaram os menores valores de K_{La} corresponderam aquelas em que se obtiveram menores valores de atividade e produtividade (Ensaio 1 e 3). Sendo, que no Ensaio 4, cujas condições de processo foram mais intensas (500 rpm e 1,5 vvm) o valor de K_{La} obtido foi o mais elevado dentre todos os ensaios do planejamento, o que influenciou positivamente tanto na atividade enzimática, como na produtividade do processo fermentativo.

Schneider *et al.* (2001) estudando a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em fermentador, observaram que não houve uma proporcionalidade entre o K_{La} e a atividade, pois quando o K_{La} foi aumentado de 30 para 63 h⁻¹, a atividade enzimática aumentou de 4 para 22 U.mL⁻¹ e o aumento do K_{La}

para 120 h^{-1} não alterou a atividade enzimática. Ainda, esses mesmos autores, mantendo o K_{La} inicial constante em torno de 60 h^{-1} , variaram as combinações de agitação (rpm) e de aeração (vvm) de 500/2,0 e 700/0,66 houve um aumento na atividade enzimática de 22 para 33 U.mL^{-1} . Já, aumentando para 1000/0,6, ocorreu uma redução na atividade para 19 U.mL^{-1} . No presente trabalho também foi observado a não linearidade no comportamento, pois o acréscimo no valor do K_{La} de 48,8 para $79,1 \text{ h}^{-1}$, resultou em um aumento na atividade e na produtividade; e quando o K_{La} aumentou para $91,6 \text{ h}^{-1}$, os resultados obtidos foram menores e, voltando a subir quando o K_{La} foi de $167,2 \text{ h}^{-1}$.

García-Garibay *et al.* (1987) estudando a influência da transferência de oxigênio na produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* observaram que a atividade enzimática diminuiu com o aumento do K_{La} de 9,3 para 36 h^{-1} . Na presente dissertação, o valor do K_{La} nos pontos centrais (Ensaio 5, 6 e 7) foi maior que o determinado para o Ensaio 2; entretanto, os resultados para a atividade e produtividade foram menores.

3.4. Planejamento Experimental

A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental 2^2 (4 ensaios e 3 pontos centrais), com variáveis codificadas e reais, bem como os valores experimentais, valores previstos e desvio relativo obtidos para cada ensaio, para a atividade enzimática e produtividade.

Tabela 5: Matriz do Planejamento Experimental com variáveis reais e codificadas para a atividade enzimática e produtividade.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade (U.mL ⁻¹)			Produtividade (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)		
			Exp.	Prev.	Desv. (%)	Exp.	Prev.	Desv. (%)
			1	-1 (200)	-1 (0,5)	4,7	3,1	33,8
2	+1 (500)	-1 (0,5)	11,4	12,2	-7,1	0,82	1,0	-16,4
3	-1 (200)	+1 (1,5)	3,2	4,0	-25,3	0,23	0,2	25,6
4	+1 (500)	+1 (1,5)	14,7	13,1	10,8	1,05	1,0	9,8
5	0 (350)	0 (1,0)	7,6	8,1	-6,6	0,48	0,6	-17,4
6	0 (350)	0 (1,0)	7,4	8,1	-9,4	0,46	0,6	-22,4
7	0 (350)	0 (1,0)	7,8	8,1	-3,8	0,49	0,6	-14,6

Através das atividades e produtividades máximas obtidas para cada ensaio do planejamento foi possível realizar a análise dos efeitos das variáveis agitação e aeração sobre as respostas atividade e produtividade de β -galactosidase (Figura 3).

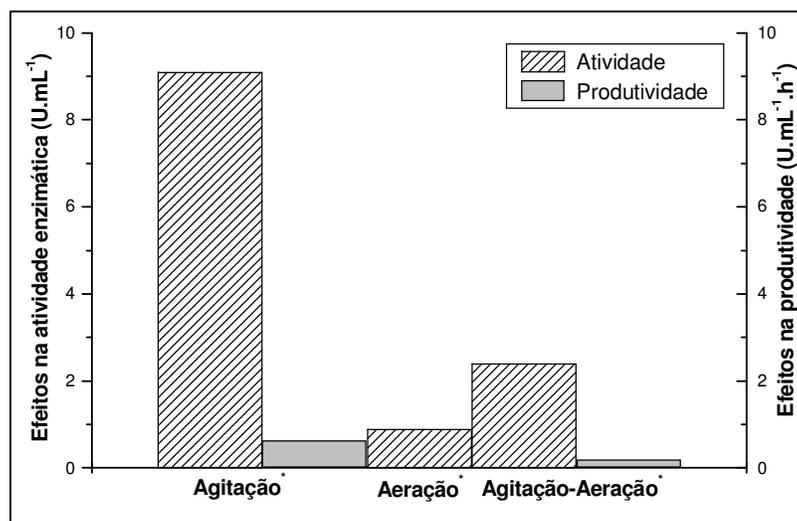


Figura 3: Efeitos principais e de interação das variáveis agitação e aeração nas respostas atividade e produtividade de β -galactosidase (* $p < 0,05$).

Com base na análise dos efeitos apresentados na Figura 3 pode-se observar que a produção da enzima foi fortemente influenciada pelas condições de agitação, enquanto que a aeração mostrou ser menos significativa. As duas variáveis independentes apresentaram efeito estatisticamente positivo e significativo a 95% sobre as respostas.

Ao mudar as variáveis do nível -1 para o +1, houve um incremento de atividade enzimática. Entretanto, o efeito da agitação ($9,1 \text{ U.mL}^{-1}$) foi 10 vezes superior ao efeito da aeração ($0,9 \text{ U.mL}^{-1}$), mostrando que a agitação foi a variável que mais influenciou na atividade de β -galactosidase. Com relação à produtividade, o efeito da aeração não foi significativo ao mudar a variável do nível -1 para o +1.

Para validação do modelo proposto para a produção da β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi realizada uma análise de variância (ANOVA) (Tabela 6), conforme reportados na Tabela 6. Para isto, os máximos valores de atividade e produtividade de β -galactosidase foram empregados nesta análise. As variáveis dependentes e independentes foram ajustadas a um modelo linear.

Tabela 6: ANOVA para atividade enzimática e produtividade do planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Ativ.	Prod.	Ativ.	Prod.	Ativ.	Prod.	Ativ.	Prod.
Regressão	89,3800	0,4313	3	2	29,7933	0,2156	60,86	22,00
Resíduo	1,4686	0,0391	3	4	0,4895	0,0098		
Falta de ajuste	1,3886	0,0386	1	2				
Erro puro	0,0800	0,0005	2	2				
Total	90,8486	0,4704	6	6				

Atividade: R^2 : 0,98
 $F_{\text{tabelado } 3, 3; 0,95}$: 9,28

Produtividades: R^2 : 0,92
 $F_{\text{tabelado } 2, 4; 0,95}$: 6,94

De acordo com Haaland (1989), o valor R^2 representa a medida da variabilidade dos valores da resposta que podem ser explicados pelas variáveis independentes e a interação entre elas. Para este autor, um modelo considerável bom (valores acima de 0.9) explica a maior variação na resposta. Quanto mais próximo este valor 1,00, mais forte é o modelo e o melhor a predição da resposta. Neste presente estudo, foram obtidos valores de R^2 altos (0.98 e 0.92) e um desempenho bom do F_{teste} (60.86 e 22.00), sendo aproximadamente sete e quatro vezes maiores que o F_{tabelado} (9.28 e 6.94) para atividade de β -galactosidase e produtividade, respectivamente.

Além disso, o valor do erro puro foi baixo, indicando uma boa reprodutibilidade experimental. Os desvios relativos foram calculados para cada ensaio e estão reportados na Tabela 5. Verificou-se que na região de maior atividade e produtividade, os desvios apresentaram-se baixos, na ordem de 10 %. Assim, o modelo codificado foi considerado preditivo e significativo (Equações 7 e 8), podendo obter as superfícies de resposta para atividade e a produtividade de β -galactosidase, apresentadas nas Figuras 4 e 5.

$$\text{Atividade} = 78,11 + 4,55 (\text{Agitação}) + 0,45 (\text{Aeração}) + 1,20 (\text{Agitação} \times \text{Aeração}) \quad (\text{Equação } 7)$$

$$\text{Produtividade} = 0,56 + 0,39 (\text{Agitação}) + 0,04 (\text{Agitação} \times \text{Aeração}) \quad (\text{Equação } 8)$$

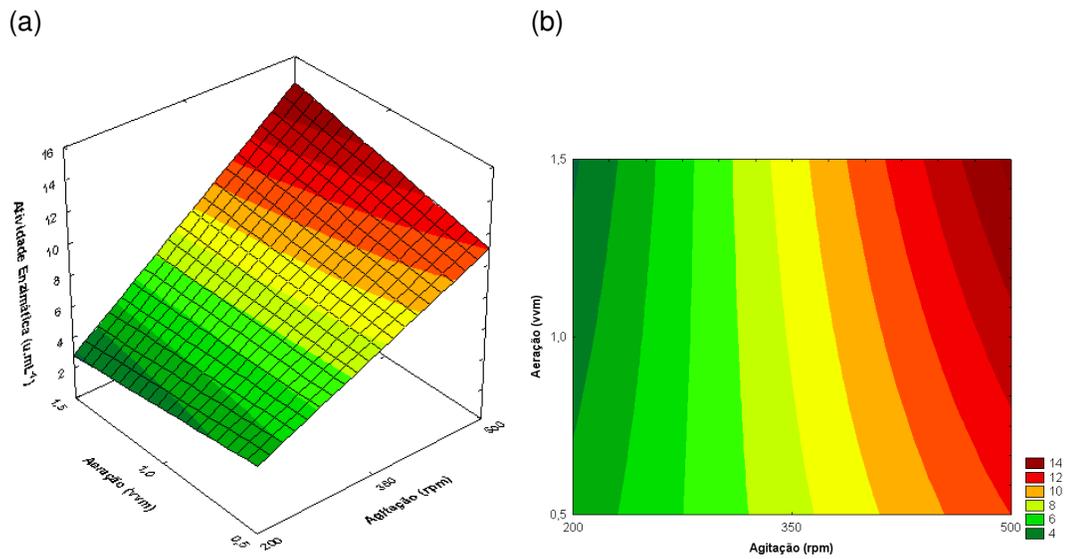


Figura 4: Superfícies de (a) resposta e de (b) contorno para atividade de β -galactosidase como uma função das variáveis agitação e aeração.

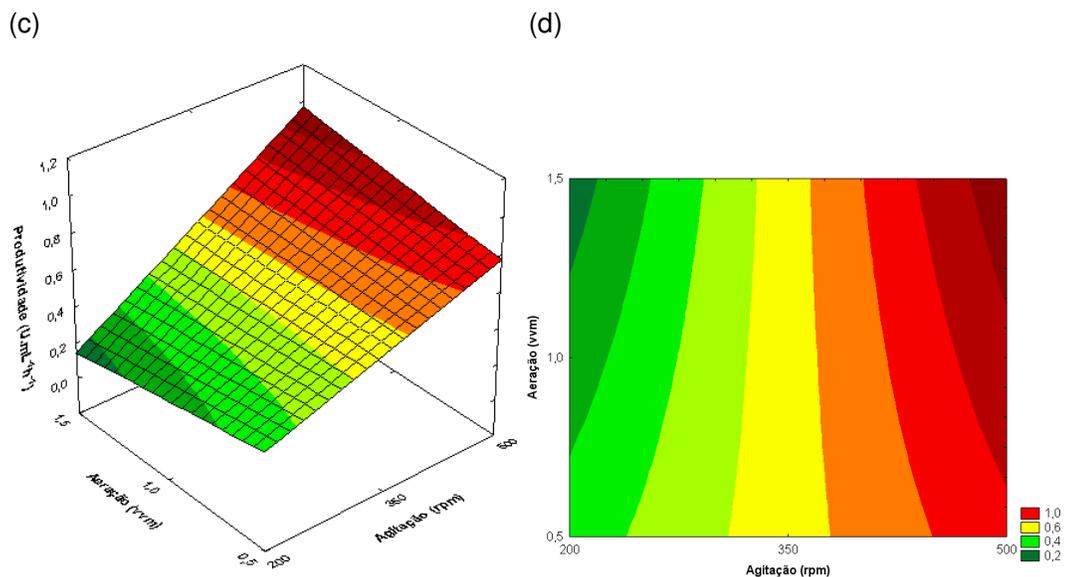


Figura 5: Superfícies de (c) resposta e de (d) contorno para a produtividade como uma função das variáveis agitação e aeração.

Pela Figura 4, observa-se que as superfícies de resposta obtidas para as duas respostas (atividade e produtividade) apresentam as mesmas faixas ótimas, sendo que para obter altas atividades enzimáticas (12 - 14 U.mL⁻¹) e produtividades (0,8 - 1,0 U.mL⁻¹h⁻¹) deve-se trabalhar com elevadas velocidade de agitação (500 rpm)

e com taxas de aeração acima de 1,25 vvm. Para baixos valores de agitação e de aeração obtiveram-se os menores valores para atividade e produtividade.

Na análise do planejamento realizado foi possível verificar que os valores variaram de 3,2 a 14,7 U.mL⁻¹ e 0,23 a 1,05 U.mL⁻¹h⁻¹ para a atividade enzimática e produtividade, respectivamente. Sendo que as duas condições mais favoráveis para a produção de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foram os ensaios 2 e 4.

No ensaio 2 as condições foram: agitação no nível +1 (500 rpm), e aeração no nível -1 (0,5 vvm), apresentando atividade enzimática de 11,4 U.mL⁻¹ e uma produtividade de 0,82 U.mL⁻¹h⁻¹. Para o ensaio 4 as condições foram: agitação no nível +1 (500 rpm), e aeração também no nível +1 (1,5 vvm), obtendo, respectivamente, 14,7 U.mL⁻¹ e 1,05 U.mL⁻¹h⁻¹ para a atividade enzimática e produtividade; sendo os dois ensaios com os níveis mais elevados de agitação.

A forte influência da agitação tanto na atividade como na produtividade no processo foi observada, respectivamente, por Siva-Santisteban & Maugeri (2005) estudando produção de inulinase e Burkert *et al.* (2005) otimizando a produção de lipase.

Feng *et al.* (2003), estudando a produção de β-manase, verificou que a aeração e a agitação influenciam a concentração de oxigênio dissolvido no meio, afetando a concentração de biomassa, atividade enzimática e o consumo de substrato; sendo necessário o estudo dessas variáveis para proporcionar ao processo um elevado rendimento celular e uma elevada atividade enzimática.

De acordo com Pinheiro *et al.* (2000), cultura típicas de *Kluyveromyces* tornam-se limitadas pela concentração de oxigênio dissolvido no meio, sendo que o modo de eliminar essa limitação seria melhorar a taxa de transferência de oxigênio, através do aumento da velocidade de agitação.

De acordo com as Figuras 4 e 5, pode-se observar que a região otimizada não foi atingida na presente dissertação. Essa otimização não foi possível em virtude que, nesse sistema, não foi possível o emprego de níveis mais elevados de agitação e aeração. Dessa forma, acredita-se que para chegar à região otimizada para produção de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 seria necessário estudar diferentes tipos de agitadores que propiciem uma maior aeração ao sistema e estudar a produção da enzima em reator *air-lift* onde a agitação mecânica é substituída pela própria aeração.

3.5. Estudo da validação dos resultados obtidos no planejamento experimental

A validação foi feita através da realização em duplicata da melhor condição indicada pela análise da superfície de resposta. Nesta condição, 500 rpm e 1,5 vvm, foi avaliado o comportamento cinético da fermentação com relação à produção da enzima, da biomassa, da glicose e da galactose, ao consumo de lactose, e à variação de pH e de oxigênio dissolvido, como pode ser observado na Figura 6, alcançando uma atividade enzimática de 17 U.mL^{-1} , uma produtividade de $1,2 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e uma concentração celular de 11 mg.mL^{-1} em 14 h.

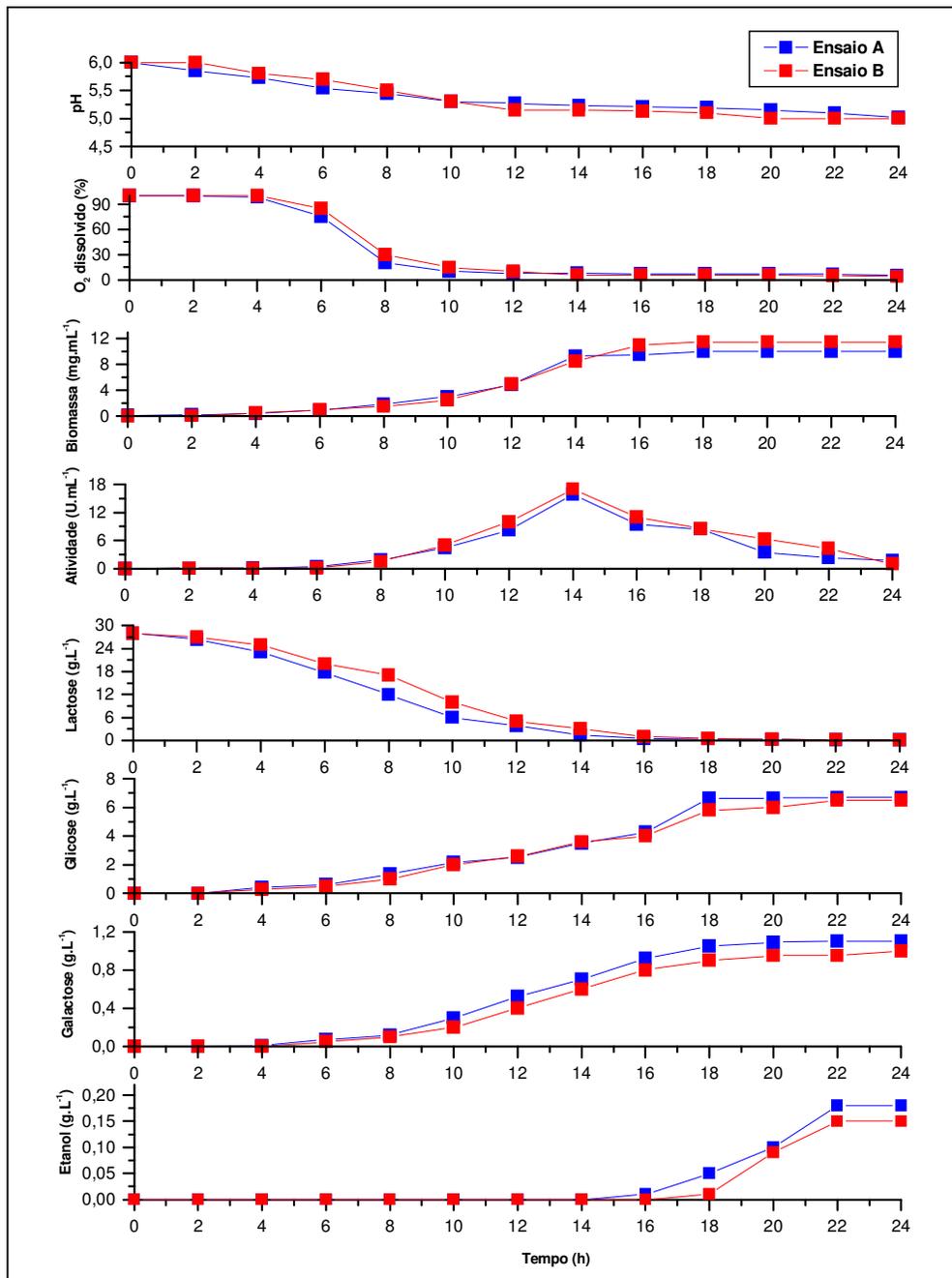


Figura 6: Acompanhamento da produção da enzima β -galactosidase na melhor condição do planejamento experimental completo.

4. CONCLUSÕES

O modelo obtido pelo planejamento foi considerado válido, sendo a melhor condição estabelecida para a produção da β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 agitação de 500 rpm e aeração de 1,5 vvm, alcançando uma atividade enzimática de 17 U.mL⁻¹, uma produtividade de 1,2 U.mL⁻¹.h⁻¹ e uma concentração celular de 11 mg.mL⁻¹ em 14 h.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, K_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 216-228, 2006.

BARBERIS, S. E.; SEGOVIA, R. F. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 11, p.797-799, 1997.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; RIET, K. V. Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

BURKERT, J.F.M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES M.I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 80, p. 61-67, 2005.

CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; RAMÍREZ, O. T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 773-778, 2005.

FENG, Y.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; NG, W. J. Optimization of agitation, aeration and temperature conditions for maximum β -manase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 282-289, 2003.

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacterias, yeast and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004.

GARCÍA-GARIBAY, M.; TORRES, J.; LÓPEZ-MUNGUTA-CANALES, A.; CASAS, L. T. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, v. 9, p. 417-420, 1987.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 101–108, 2006.

GOODHUE, C. ROSAZZA, J. P.; PERUZZOTTI, G. P. Methods for transformation of organic compounds. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Eds. A. L. Demain, N. A. Solomn, Amer. Soc. for Microbiology, Washington, 1986.

HAALAND, P.D., 1989. **Experimental design in biotechnology**. Marcel Dekker inc, New York.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 27, p. 583 – 592, 2000.

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 35-40, 2004.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 8, p. 232-284, 2005.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MARQUEZ, L. D. S.; ARAÚJO, E. H.; RIBEIRO E. J. Estudos de meios de cultura na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. CD-ROM.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n 2, p. 336-339, 2008.

MILNER, J. A; MARTIN, D. J.; SMITH, A. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 507-5012, 1996.

NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 845-849, 2001.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 873-877, 2007.

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

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. H. Formation of Oligosaccharides from Whey UFPermeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, V. 62, p. 141- 147, 1998.

SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. F.; JONAS, R.; FURLAN, S. Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces*

marxianus using sugar cane molasses as carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 547-550, 2001.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA
PROVENIENTE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082**

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Fernanda Germano Alves, Susana Juliano Kalil*

Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Departamento de Química, Laboratório de Microbiologia, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900, (53) 32338754, *dqmsjk@furg.br

RESUMO

A lactose, chamada de açúcar do leite, apresenta utilização bastante limitada em produtos alimentícios devido à baixa solubilidade em água e ao baixo poder adoçante, porém quando hidrolisada não apresenta os inconvenientes causados por esse carboidrato. O processo da hidrólise da lactose, em glicose e galactose, pela β -galactosidase em produtos industriais derivados do leite é uma das mais promissoras aplicações de enzimas no processamento de alimentos, principalmente destinados a pessoas intolerantes à lactose. A utilização de enzimas na indústria alimentícia é limitada devido a um fator: estabilidade operacional. Técnicas de imobilização enzimática têm sido bastante empregadas a fim de aumentar a estabilidade da enzima. Por esta razão, este trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente a β -galactosidase nas formas livre e imobilizada proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. A caracterização consistiu na determinação do pH e temperatura ótimos, parâmetros cinéticos K_m e V_{max} e estabilidade térmica da enzima. A enzima foi produzida por fermentação submersa em frascos agitados, pH 6,0, 180 rpm, 30°C por 96 horas. Para imobilização da β -galactosidase foi empregada a técnica de inclusão em gel de alginato de cálcio. No estudo da influência do pH na atividade enzimática foram testados valores de pH entre 4,6 e 8,6 utilizando tampão acetato, citrato, tris-HCl e fosfato. A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada pela atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25 a 60°C. Os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e lactose. A estabilidade térmica foi estudada determinando-se a constante cinética de desnaturação térmica, o tempo de meia vida e a energia de ativação da reação de desnaturação, incubando-se a enzima nas temperaturas de 30 a 45°C. Com relação aos resultados de pH e temperatura verificou-se que o processo de imobilização não alterou o ótimo destas propriedades, obtendo como resultados pH 6,6 em tampão fosfato e 37°C, respectivamente. O estudo dos parâmetros cinéticos através do método gráfico de Lineweaver-Burk mostrou como resultados de K_m e V_{max} , para a enzima livre, os valores 15,1 mM e 18,9 U.mL⁻¹; 93,7 mM e 43,9 U.mL⁻¹, respectivamente, para os substratos ONPG e lactose. Já, para a enzima na forma imobilizada obteve-se para K_m e V_{max} os valores 18,5 mM e 3,9 U.mL⁻¹; 115,7 mM e 3,7 U.mL⁻¹ utilizando ONPG e lactose, respectivamente, como substrato. Com relação à estabilidade térmica enzimática, a equação de Arrhenius pôde ser aplicada para estabelecer uma relação entre a constante cinética de desnaturação térmica e a temperatura. Pela equação de Arrhenius determinou-se as energias da reação de ativação (9,4 e 2,1 Kcal.mol⁻¹) e de ativação da reação de desnaturação (100 e 106 Kcal.mol⁻¹), respectivamente, para β -galactosidase livre e imobilizada.

Palavras-chave: estabilidade, imobilização, pH, parâmetros cinéticos, temperatura.

1. INTRODUÇÃO

A importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em seus monossacarídeos, glicose e galactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (LADERO *et al.*, 2006; JURADO *et al.*, 2002).

A hidrólise da lactose resulta em economia de sacarose na preparação de produtos açucarados, pois diversos produtos fabricados a partir de leite com baixo teor de lactose requerem pouca ou nenhuma adição de sacarose. Além disto, este tipo de hidrólise previne a cristalização da lactose em produtos lácteos como doce de leite e leite condensado, entre outros, melhorando as características sensoriais destes alimentos como cor e sabor (MAHONEY, 1998).

A β -galactosidase é largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais, vegetais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com a sua origem. A temperatura e o pH operacional é a característica que define a aplicação de uma dada β -galactosidase, controlando a atividade enzimática e influenciando na estabilidade (RECH, 1998).

Apesar de vários trabalhos já determinarem as propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos da enzima β -galactosidase, um grande número de dados foram obtidos para enzima comercial, purificada e de diversas fontes microbianas (JURADO *et al.*, 2004; NAGY *et al.*, 2001; ZHOU & CHEN, 2001), no entanto, para enzimas extraídas de caldo de fermentação e de *Kluyveromyces marxianus*, estes dados são limitados.

Segundo Yu & Li (2006), o estudo da atividade e estabilidade de enzimas é um aspecto importante a ser considerado em processos biotecnológicos, pois promove um maior conhecimento das propriedades da β -galactosidase obtida, além da possibilidade de contribuir com a viabilidade econômica de processos e de fácil utilização industrialmente.

Para Furegon *et al.* (1996), a maioria das enzimas imobilizadas utilizadas em processos de hidrólise é de origem microbiana, por apresentarem baixo custo, boa estabilidade e elevada atividade catalítica.

De acordo com Maugeri (2002), a imobilização pode causar mudanças nas medidas dos parâmetros como, por exemplo, na velocidade máxima de reação, na constante de Michaelis-Menten e, também, na temperatura e pH ótimos.

Segundo Santos (2002), enzimas imobilizadas apresentam diferenças quando comparadas às enzimas livres, podendo estas serem observadas nas suas propriedades após o processo de imobilização, tais como: atividade enzimática e estabilidade. Por esse motivo o estudo da caracterização de enzimas, tanto imobilizadas como livres, é de grande valia para conhecer quais são as vantagens e desvantagens da utilização de cada uma delas em processos enzimáticos.

Dentro desse contexto, este trabalho visou caracterizar parcialmente a β -galactosidase livre e imobilizada proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para os substratos o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e lactose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado para produzir a enzima β -galactosidase foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP e previamente selecionada por Manera *et al.* (2008). A cultura foi mantida a -18°C , em tubos de ensaio contendo glicerol, conforme Pinheiro *et al.* (2003).

2.2. Inóculo

O inóculo, adicionado de 10 % v/v do microrganismo em glicerol, foi preparado em meio de cultura conforme Pinheiro *et al.* (2003). As condições de cultivo foram 30°C (PINHEIRO *et al.*, 2003), 180 rpm por 14 h (MARQUEZ *et al.*, 2003), em incubador rotativo.

2.3. Produção da enzima

A enzima foi produzida por fermentação submersa em frascos agitados contendo meio de cultura otimizado por Manera *et al.* (2008), acrescido de 10% v/v de inóculo. As condições de cultivo foram 30°C (PINHEIRO *et al.*, 2003), 180 rpm (MARQUEZ *et al.*, 2003), por 96 h (MANERA *et al.*, 2008).

2.4. Extração da enzima

Para obtenção da enzima β -galactosidase intracelular, as células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foram rompidas pelo uso conjugado de ondas

ultrassônicas e abrasão por pérolas de vidro, conforme proposto por Medeiros *et al.* (2008).

2.5. Imobilização enzimática

A β -galactosidase foi imobilizada através da técnica de inclusão em gel (WON *et al.*, 2005 e SANTOS, 2002; modificado). O método consistiu em imobilizar a enzima através do seu entrelaçamento em alginato de cálcio, pois na presença de cátions divalentes como Ca^{++} torna-se possível formar um polímero, neste caso chamado de alginato de cálcio que aprisiona a enzima.

Para isto, preparou-se um gel misturando alginato de sódio, água destilada e extrato enzimático. A solução resultante foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,2 M. As microesferas obtidas permaneceram em repouso a 4°C, nesta mesma solução *over-night*. Depois de tratadas, as enzimas imobilizadas foram lavadas com água destilada para remover a enzima que não foi entrelaçada no gel.

2.5.1. Determinação da recuperação

A recuperação enzimática foi determinada através da Equação 1, relacionando atividade fornecida ao processo (enzima livre) e a atividade após a imobilização (enzima imobilizada e filtrado). Onde, $U_{\text{imobilizada}}$, U_{filtrado} e U_{livre} são, respectivamente, as atividades da enzima imobilizada, do filtrado e da enzima livre; $V_{\text{imobilizada}}$, V_{filtrado} e V_{livre} são os volumes da enzima imobilizada, do filtrado e da enzima livre, respectivamente.

$$\% \text{Recuperação} = \left[\frac{(U_{\text{imobilizada}} \cdot V_{\text{imobilizada}}) + (U_{\text{filtrado}} \cdot V_{\text{filtrado}})}{(U_{\text{livre}} \cdot V_{\text{livre}})} \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

2.5.2. Determinação da eficiência da imobilização

As eficiências da imobilização para enzima (WON *et al.*, 2005) e para proteínas foram determinadas através das Equações 2 e 3, respectivamente, relacionando a quantidade de proteína ou de enzima fornecida ao processo e a quantidade de proteína ou enzima imobilizadas. Onde C_{livre} e C_{filtrado} são as concentrações de proteína contidas na solução enzimática e no filtrado, respectivamente; V_{livre} e V_{filtrado} são, respectivamente, os volumes de proteína em solução e no filtrado após a lavagem das esferas de gel.

$$\% \text{Eficiência}_{\text{enzimas}} = \left[\frac{U_{\text{imobilizada}} \cdot V_{\text{imobilizada}}}{U_{\text{livre}} \cdot V_{\text{livre}}} \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

$$\% \text{Eficiência}_{\text{proteínas}} = \left[\frac{(C_{\text{livre}} \cdot V_{\text{livre}}) - (C_{\text{filtrado}} \cdot V_{\text{filtrado}})}{(C_{\text{livre}} \cdot V_{\text{livre}})} \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

2.5.3. Determinação rendimento do processo

O rendimento do processo de imobilização é definido como a razão entre as atividades específicas das enzimas imobilizada e livre, conforme é mostrado na Equação 4 (WON *et al.*, 2005). A atividade específica é a relação da atividade enzimática com a quantidade de proteína. Onde U é a atividade enzimática.

$$\% \text{Rendimento} = \left[\frac{U_{\text{específica imobilizada}}}{U_{\text{específica livre}}} \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

2.6. Caracterização da enzima

A β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi caracterizada parcialmente neste trabalho, sendo determinadas algumas propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos. A enzima foi caracterizada quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade térmica, e determinados os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{\text{máx}}$) para os substratos *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e lactose.

2.6.1. Determinação do pH ótimo

Na influência do pH na reação enzimática estudou-se quatro tampões em diferentes valores de pH na concentração 50 mM: tampão acetato (pH 4,6; 5,0; 5,6), tampão citrato (pH 4,6; 5,6; 6,0), tampão fosfato (pH 6,0; 6,6; 7,0; 7,3; 8,0) e tampão tris-HCl (pH 7,3; 7,6; 8,0; 8,6).

2.6.2. Determinação da temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade de β -galactosidase nas temperaturas de 25 a 60°C, mantendo o pH fixo

no de análise em tampão fosfato de potássio 50 mM com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM, pH 6,6.

2.6.3. Determinação da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da β -galactosidase foi estudada através do tempo de meia-vida, da constante cinética de desnaturação térmica e da energia de ativação da reação de desnaturação. Alíquotas de extrato enzimático ou enzima imobilizada foram incubadas nas temperaturas de 30 a 45 °C; sendo a atividade enzimática determinada em intervalos de tempos pré-determinados.

2.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados medindo-se a atividade da β -galactosidase em diferentes concentrações de substrato. Para esse estudo foram utilizados dois substratos nas seguintes concentrações: ONPG (1-10 mM) e lactose (25-250 mM).

2.7. Métodos Analíticos

2.7.1. Determinação da biomassa

A concentração de célula foi medida por densidade ótica a 620 nm, e convertida para gramas de célula seca por litro conforme curva padrão (RECH *et al.*, 1999).

2.7.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática no estudo da caracterização da β -galactosidase foi determinada utilizando como substrato o-nitrophenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), exceto na determinação dos parâmetros cinéticos em que a lactose também foi utilizada como substrato, além do ONPG.

Para que fosse possível comparar as unidades das atividades da β -galactosidase nas duas formas, livre e imobilizada, utilizou-se a técnica da picnometria (FOUST *et al.*, 1982; GEANKOPLIS, 1983) para poder determinar a densidade da enzima imobilizada, pois assim foi possível relacionar a massa da microesfera com o volume necessário de amostra para a determinação da atividade.

2.7.2.1. Determinação da atividade enzimática para o substrato ONPG

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato segundo Inchaurredo *et al.* (1994).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

2.7.2.2. Determinação da atividade enzimática para o substrato lactose

A atividade da enzima β -galactosidase empregando lactose como substrato foi determinada de acordo com metodologia descrita por Szczodrak (2000).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de glicose por minuto, sob as condições do ensaio.

2.7.3. Determinação de proteínas

A medida de proteína foi realizada conforme metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a enzima imobilizada em gel de alginato de cálcio. A Tabela 1 apresenta os dados obtidos experimentalmente no processo de imobilização da β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.



Figura 1: β -galactosidase imobilizada em gel de alginato de cálcio.

Tabela 1: Resultados experimentais para a β -galactosidase.

Enzima	Atividade (U.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Volume (mL)
Livre	13,1	5,6	30
Filtrado	1,5	0,4	120
Imobilizada	1,3	0,8*	150

* calculada através do balanço de massa entre a proteína de entrada e a do filtrado

3.1. Determinação da recuperação da enzima

A porcentagem de enzima recuperada foi determinada através da Equação 1. Foi obtido aproximadamente 95 % de enzima de entrada; o restante (5 %) pode ter sido perdido devido a problemas de desnaturação ou não foi possível determinar devido a maior dificuldade do substrato para entrar em contato com a enzima imobilizada.

3.2. Determinação da eficiência da imobilização

A eficiência do processo foi determinada com relação às proteínas e, também, à enzima, através das Equações 2 e 3, apresentando 71 e 50 % de eficiência, respectivamente, ou seja, metade da quantidade de enzima oferecida ao processo ficou retida no gel de alginato.

A eficiência da imobilização em termos de proteínas apresentou um valor maior que a apresentada pela enzima. Tal diferença pode ter sido em função que como a enzima utilizada não foi purificada, nem submetida a uma etapa prévia de purificação, o extrato enzimático oferecido ao processo de imobilização poderia apresentar outras proteínas e contaminantes que não fosse a enzima de interesse.

Freitas *et al.* (2007), imobilizando a enzima β -galactosidase proveniente de *Aspergillus oryzae* em alginato de cálcio e glutaraldeído, obtiveram uma eficiência do processo de 30 %, valor inferior ao encontrado no presente trabalho.

3.3. Determinação rendimento do processo

O processo de imobilização em alginato de cálcio apresentou um rendimento de aproximadamente 70 %.

Tanriseven & Dogan (2002) utilizaram glutaraldeído como agente *crosslinking* na imobilização da β -galactosidase em alginato e gelatina, e obtiveram um rendimento de 56 %. Domingues *et al.* (1988) obtiveram um rendimento de 76 % ao imobilizarem a β -galactosidase em alginato e empregando carbodiime como agente

crosslinking. Resultados estes respectivamente menor e aproximadamente igual ao encontrado no presente trabalho utilizando apenas alginato.

3.4. Determinação do pH ótimo

No estudo da influência do pH na reação enzimática pôde-se observar através dos resultados ilustrados na Tabela 2 e Figura 2 que os máximos valores de atividade enzimática obtidos, tanto para a enzima livre como para a imobilizada, para cada tampão foram: tampão acetato (pH 5,6), tampão citrato (pH 6,0), tampão fosfato (pH 6,6) e tampão tris-HCl (pH 7,3). Sendo para valores de pH abaixo de 5,0 a enzima perdeu atividade, sendo, portanto mais ativa em valores perto da neutralidade.

Tabela 2: Atividade enzimática relativa em função do pH.

Tampão	pH	Atividade Enzimática Relativa (%)	
		Enzima Livre	Enzima Imobilizada
Acetato 50 mM	4,6	0,5	0,4
	5,0	0,6	28,1
	5,6	76,5	31,2
Citrato 50 mM	4,6	0,6	0,8
	5,6	30,5	10,9
	6,0	80,7	75,1
Fosfato 50 mM	6,0	95,0	88,5
	6,6	100,0	100,0
	7,0	98,7	99,6
	7,3	98,3	98,3
	8,0	95,5	95,8
Tris-HCl 50 mM	7,3	94,3	89,9
	7,6	93,2	83,6
	8,0	88,6	77,8
	8,6	86,6	75,8

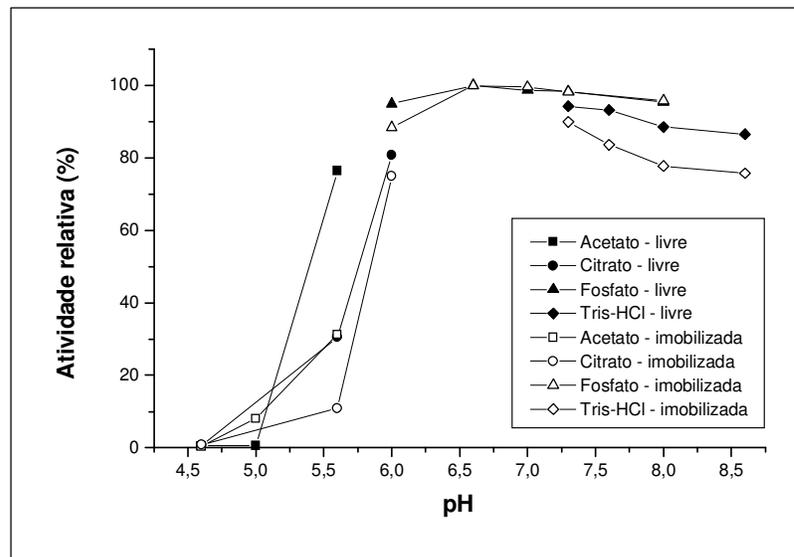


Figura 2: Atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função do pH.

De acordo com Whitaker (1994), o pH ótimo de uma enzima depende de vários parâmetros experimentais, incluindo tempo de reação, temperatura, natureza e concentração de substrato, natureza e concentração do tampão, entre outros.

Comparando as enzimas nos diferentes tampões verificou-se que a β -galactosidase livre e imobilizada apresentou comportamento semelhante em termos de perfil de pH, apresentando uma maior atividade em tampão fosfato 50 mM, na faixa de pH de 6,6 - 7,3; sendo considerado como valor ótimo pH 6,6 para as duas formas.

Apesar dos valores ótimos terem sido os mesmos para as duas formas da β -galactosidase, a enzima livre apresentou-se mais reativa em valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 7,3 quando comparada à enzima imobilizada.

Numanoglu & Sungur (2004) e Illane *et al.* (1998), observaram que o processo de imobilização não alterou o pH ótimo da β -galactosidase, obtendo como valores ótimos para ambas as formas pH 6,5 e 6,6, para os respectivos estudos.

No presente trabalho, os valores ótimos observados para o pH para a β -galactosidase livre e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 nos tampões estudados estão de acordo com a literatura onde são reportados valores de pH ótimo na faixa de 6,0 - 7,3 para enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* (JURADO *et al.*, 2002; ZHOU & CHEN, 2001; GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

3.5. Determinação da temperatura ótima

A reação enzimática foi determinada a diferentes temperaturas para a β -galactosidase livre e imobilizada, onde se observou que as faixas temperaturas onde se obteve máxima atividade foram de 35 - 37°C e de 35 - 40°C, respectivamente, conforme mostra a Tabela 3, sendo considerada como temperatura ótima a de 37°C, sendo o mesmo valor ótimo verificado por Jurado *et al.* (2002).

De acordo com Kennedy & Cabral (1987), na imobilização de enzimas, alterações na temperatura ótima de reação ocorrem em alguns casos, podendo ser maior que a da enzima livre. Em alguns casos, devido aos efeitos difusionais do processo de inclusão ou ligação a suportes porosos, a enzima é protegida contra desnaturação térmica, uma vez que a temperatura no microambiente da enzima é menor que na solução.

Comparando as curvas de temperatura *versus* atividade relativa para a enzima sob as duas formas, pode-se visualizar que a enzima imobilizada apresentou perfil de temperatura mais suave comparado ao da enzima em solução e uma maior faixa de atuação da enzima. Perfil de temperatura similar foi encontrado por Tanriseven & Dogan (2002) estudando a imobilização de β -galactosidase em alginato-gelatina-glutaraldeído, verificaram que a enzima imobilizada apresentou perfil temperatura mais suave que ao da enzima na forma livre.

Ainda convém salientar que a β -galactosidase imobilizada apesar de ter apresentado comportamento semelhante ao da enzima em solução, apresentou mais reatividade em temperaturas fora do ótimo quando comparada com a enzima na forma livre.

Tabela 3: Atividade enzimática relativa em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática Relativa (%)	
	Enzima Livre	Enzima Imobilizada
25	55	87
30	74	94
35	98	98
37	100	100
40	94	97
45	67	83
50	47	68
55	24	56
60	19	36

Segundo Maugeri (2002), por a enzima ser uma proteína, ela tende a perder atividade no tempo e sendo mais rápida esta perda quanto maior a temperatura, como foi observada neste trabalho (Figura 3) que a partir da temperatura de 40°C a enzima sob as duas formas começou a perder atividade e, principalmente a enzima livre começou a apresentar desnaturação acentuada. Característica esta, segundo Illanes *et al.* (1998), inerente às lactases provenientes de leveduras.

Ladero *et al.* (2000), estudando a β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em sílica-albumina em várias temperaturas, verificaram que a máxima atividade foi alcançada a 40°C, após a enzima apresentou-se menos reativa.

Rakoja *et al.* (2003), estudando a imobilização de β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* encontraram como temperatura ótima 35 - 37°C, sendo que a partir desta temperatura a enzima começou a perder atividade.

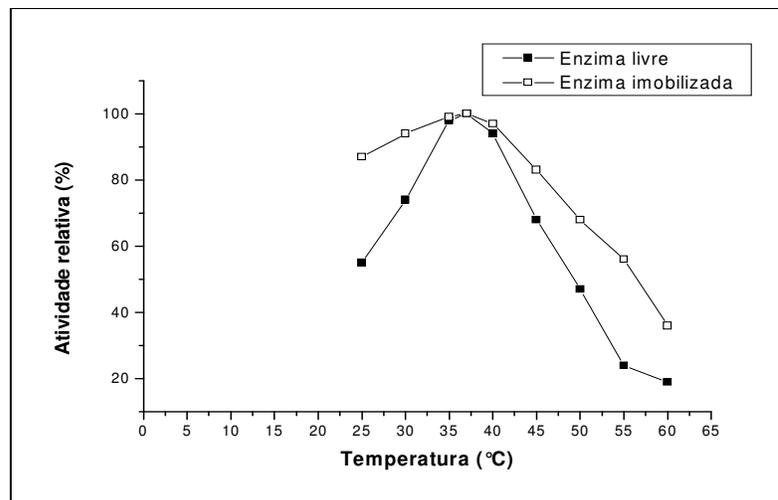


Figura 3: Atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da temperatura.

A Tabela 4 apresenta os dados experimentais de atividade enzimática utilizados para o cálculo da energia de ativação (E_a) para as enzimas livre e imobilizada.

Tabela 4: Atividade enzimática em função da temperatura.

T(°C)	T (K)	1/Tx10 ⁻³ (K ⁻¹)	Enzima Livre		Enzima Imobilizada	
			V (μmol. min ⁻¹ .mL ⁻¹)	ln(V)	V (μmol. min ⁻¹ .mL ⁻¹)	ln(V)
25	298,15	3,35	9,49	2,25	1,02	0,02
30	303,15	3,29	12,77	2,55	1,09	0,09
35	308,15	3,24	16,86	2,82	1,10	0,14
37	310,15	3,22	17,17	2,84	1,17	0,15

A energia de ativação (E_a) foi calculada correlacionando a equação da velocidade de reação (Equação 5) com a equação de Arrhenius (Equação 6). Através da forma linearizada da equação de Arrhenius (Equação 7), plotou-se o gráfico $\ln(V)$ em função do inverso da temperatura (Figura 4 e 5) e pelo coeficiente angular da equação da reta determinou-se a energia de ativação (BAILEY & OLLIS, 1986; ROBYT & WHITE, 1990).

$$V = K \cdot [E] \quad (\text{Equação 5})$$

$$K = Ae^{(-E_a/R_g T)} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\ln V = \ln A - \frac{E_a}{R_g} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{Equação 7})$$

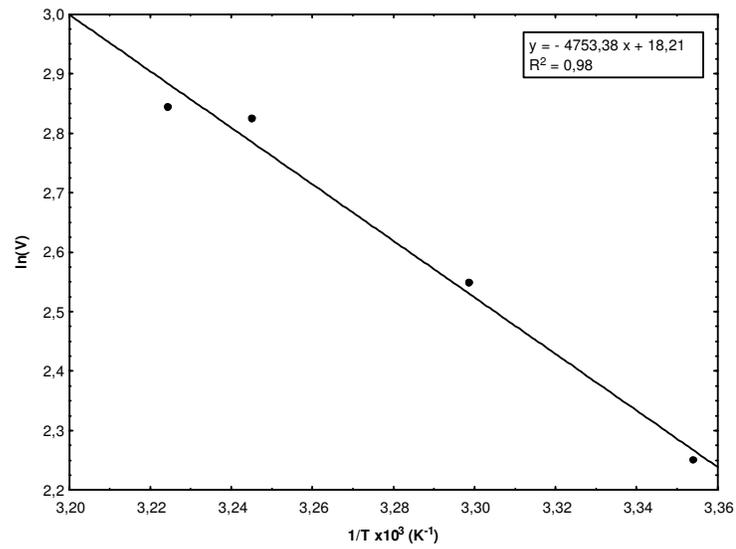


Figura 4: Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase livre de *K. marxianus* CCT 7082 para o cálculo da energia de ativação.

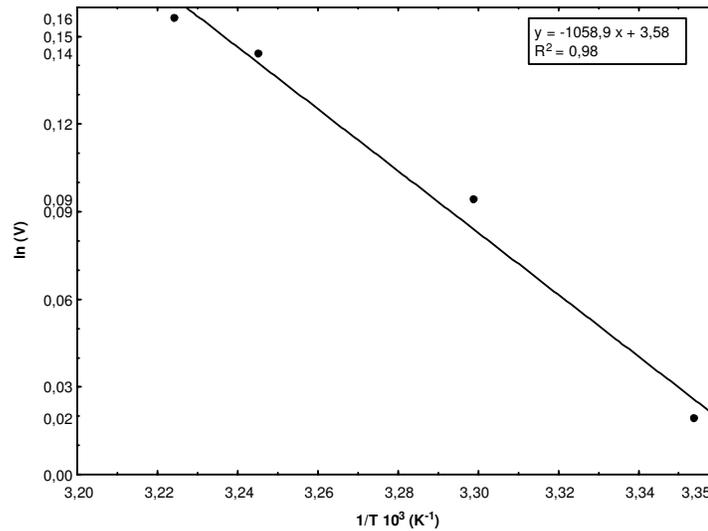


Figura 5: Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada de *K. marxianus* CCT 7082 para o cálculo da energia de ativação.

Assim:

$$\ln V = 18,21 - 4753,38 \cdot \frac{1}{T}$$

$$E_{a \text{ livre}} = 9,4 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

$$\ln V = 3,58 - 1058,9 \cdot \frac{1}{T}$$

$$E_{\text{a imobilizada}} = 2,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

De acordo com Whitaker (1994), as energias de ativação (E_a) para transformação de reagentes em produtos em reações enzimática estão compreendidas entre 6,0 e 15,0 Kcal.mol⁻¹. Comparando estes valores com os dados encontrados nesse trabalho, pode ser observado que a E_a para a enzima livre (9,4 Kcal.mol⁻¹) está compreendida na faixa citada; entretanto, a E_a para a enzima na forma imobilizada (2,1 Kcal.mol⁻¹) está abaixo da faixa citada.

Resultados similares aos encontrados no presente trabalho para a energia de ativação para a enzima na forma livre foram encontrados por Illanes *et al.* (2001); Illanes *et al.* (2000) e Ladero *et al.* (2000), onde obtiveram os respectivos valores: 10,4; 10,4 e 10,9 Kcal.mol⁻¹. Freitas *et al.* (2007), caracterizando a β -galactosidase livre e imobilizada por inclusão em alginato, obtiveram como resultados para as energias de ativação de 7,7 e 6,5 Kcal.mol⁻¹, respectivamente.

Segundo Yu & Li (2006), quanto menor a energia de ativação menor será a barreira de energia para a catálise; sendo, portanto, neste caso, a da enzima imobilizada menor que a da livre, pois a enzima na forma imobilizada apresentou-se mais reativa quando comparada à enzima livre nas mesmas temperaturas.

3.6. Determinação da estabilidade térmica de enzima

Segundo Contiero (1992) a estabilidade térmica da enzima é determinada através da utilização da equação de Arrhenius (Equação 8).

$$K = A \cdot e^{-E_d/R_g T} \quad (\text{Equação 8})$$

A estabilidade térmica foi determinada em termos de tempo meia vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (K_d) e energia de ativação para a reação desnaturação (E_d), incubando a enzima livre e imobilizada nas temperaturas de 30 a 45°C até atingir 50% da sua atividade inicial.

O tempo meia vida ($t_{1/2}$) foi definido como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja: $V/V_0 = 0,5$; podendo ser relacionado com a K_d , através da Equação 9.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{K_d} \quad (\text{Equação 9})$$

Através destes dados foi possível construir o gráfico de $\ln(V/V_0)$ versus tempo de incubação para cada temperatura estudada, onde V_0 e V são as atividades inicial e referente aos tempos de retirada de amostra, respectivamente. Desse gráfico, obteve-se o valor da constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para cada temperatura (T).

Os valores de K_d e $t_{1/2}$ para cada temperatura estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores experimentais da constante de desnaturação térmica (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da β -galactosidase em função da temperatura

T(°C)	T (K)	$1/T \times 10^{-3}$ (K ⁻¹)	Enzima Livre		Enzima Imobilizada	
			K_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
30	303,15	3,29	0,0003	38,51	0,0001	115,52
35	308,15	3,24	0,0020	5,78	0,0011	10,50
37	310,15	3,22	0,0088	1,31	0,0079	1,46
40	313,15	3,19	0,0345	0,33	0,0081	1,43
45	318,15	3,14	0,7208	0,01	0,5317	0,02

O processo de imobilização aumentou os valores de tempo de meia vida para todas as temperaturas estudadas, sendo a diferença menor a 37°C, temperatura esta considerada ótima para as duas formas enzimática, neste trabalho.

Através dos dados apresentados na Tabela 5 observa-se que o valor para a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) é inversamente proporcional a estabilidade da enzima, ou seja, quanto menor o valor de K_d maior é a estabilidade da enzima. No presente trabalho, para todas as temperaturas estudadas, o valor para a K_d foi maior para a β -galactosidase livre, indicando que a sua forma imobilizada apresentou maior estabilidade térmica.

Brady *et al.* (1995), caracterizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* quanto à estabilidade térmica, obteve um tempo de meia vida de 7 horas a

30°C, sendo este valor menor que os encontrados neste trabalho, indicando que esta enzima estudada apresentou boa estabilidade.

Posteriormente, para a determinação da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d), cujos valores foram 100 e 106 Kcal.mol⁻¹ para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente, graficou-se $\ln(K_d)$ versus $1/T(K)$, obtendo-se uma reta correspondente à equação linearizada de Arrhenius (Equação 10), cuja gráfico encontra-se nas Figuras 6 e 7.

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R_g} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{Equação 10})$$

$$-\ln K_d = 50465,5 \cdot \frac{1}{T} - 157,9$$

$$E_{d_{\text{livre}}} = 100 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

$$-\ln K_d = 53192 \cdot \frac{1}{T} - 166,1$$

$$E_{d_{\text{imobilizada}}} = 106 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

Sendo K_d função da temperatura segundo a Equação de Arrhenius determinou-se E_d conforme apresentado nas Figura 6 e 7 para a β -galactosidase livre e imobilizada, respectivamente.

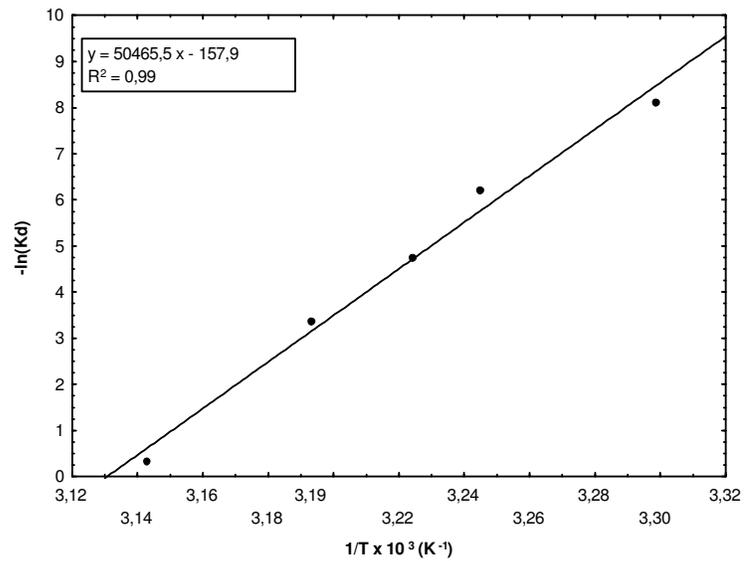


Figura 6: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) para a enzima livre.

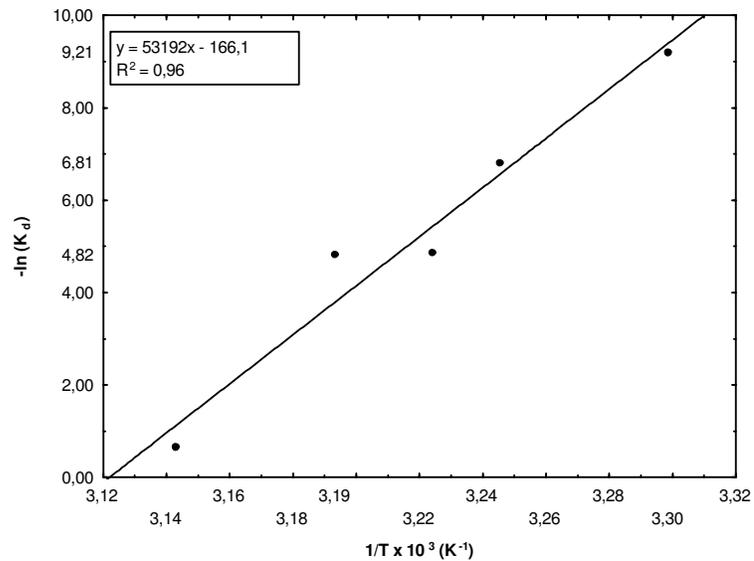


Figura 7: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) para a enzima imobilizada.

Segundo Whitaker (1994), as energias de ativação para a reação de desnaturação de enzimas ficam compreendidas entre 50-150 Kcal/mol. Comparando estes valores com os dados encontrados no presente trabalho, observa-se que os valores encontrados estão compreendidos dentro da faixa citada.

Entretanto, percebeu-se a necessidade de um estudo mais detalhado com relação ao suporte utilizado para imobilizar a β -galactosidase, a fim de reter uma maior quantidade de enzima no interior da matriz, sem prejuízos na estabilidade.

3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados medindo a atividade da β -galactosidase utilizando faixas de concentração dos substratos ONPG e lactose; faixas suficientes para que nos últimos pontos de análise a atividade enzimática permanecesse constante.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os dados para os respectivos substratos ONPG e lactose para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente.

Tabela 6: Valores experimentais de atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de ONPG para a determinação dos parâmetros cinéticos.

Concentração de ONPG (mM)	Atividade de β -galactosidase livre (U.mL ⁻¹)	Atividade de β -galactosidase imobilizada (U.mL ⁻¹)
1	1,2	0,2
2	2,2	0,4
3	3,3	0,6
4	4,1	0,7
5	4,9	0,8
6	5,5	0,9
7	6,3	1,0
8	6,4	1,1
9	6,4	1,1
10	6,4	1,1

Tabela 7: Valores experimentais de atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de lactose para a determinação dos parâmetros cinéticos.

Concentração de lactose (mM)	Atividade de β -galactosidase livre (U.mL ⁻¹)	Atividade de β -galactosidase imobilizada (U.mL ⁻¹)
25	9,3	0,7
50	14,8	1,1
75	19,2	1,4
100	22,9	1,7
125	25,2	1,9
150	28,1	2,2
175	29,7	2,4
200	30,4	2,6
225	30,4	2,6
250	30,4	2,6

Na determinação dos parâmetros cinéticos foi utilizado o método gráfico de Lineweaver-Burk. Através da linearização da Equação 11, obteve-se a Equação 12.

$$V = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação 11})$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (\text{Equação 12})$$

Graficando o inverso da concentração do substrato (1/S) *versus* o inverso da velocidade de reação (1/V), como mostram as Figuras 8 a 11, e através das equações linearizadas (Equações 13, 14, 15 e 16), foi possível determinar os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos para a β -galactosidase livre e imobilizada em função da concentração de ONPG e lactose.

Parâmetros cinéticos	Enzima livre (ONPG)	Enzima imobilizada (ONPG)	Enzima livre (Lactose)	Enzima imobilizada (Lactose)
K_m (mM)	15,1	18,5	93,7	115,7
$V_{m\acute{a}x}$ (U.mL ⁻¹)	18,9	3,9	43,9	3,7

$$\frac{1}{V} = 0,79 \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{0,05} \quad (\text{Equação 13})$$

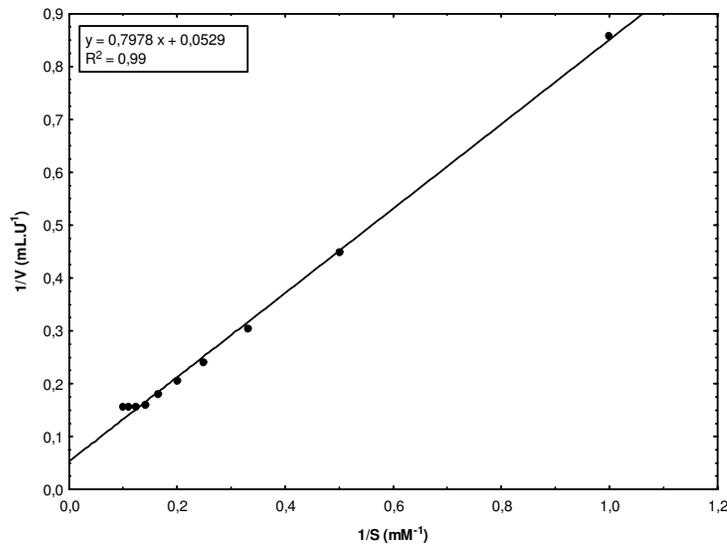


Figura 8: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para a β -galactosidase livre de *K. marxianus* CCT 7082 para o substrato ONPG.

$$\frac{1}{V} = 4,75 \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{0,26} \quad (\text{Equação 14})$$

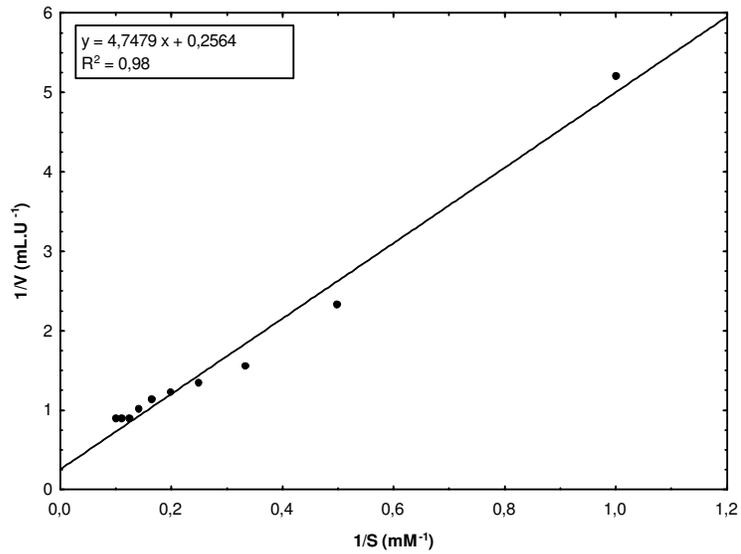


Figura 9: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para a β -galactosidase imobilizada de *K. marxianus* CCT 7082 para o substrato ONPG.

$$\frac{1}{V} = 2,14 \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{0,02} \quad (\text{Equação 15})$$

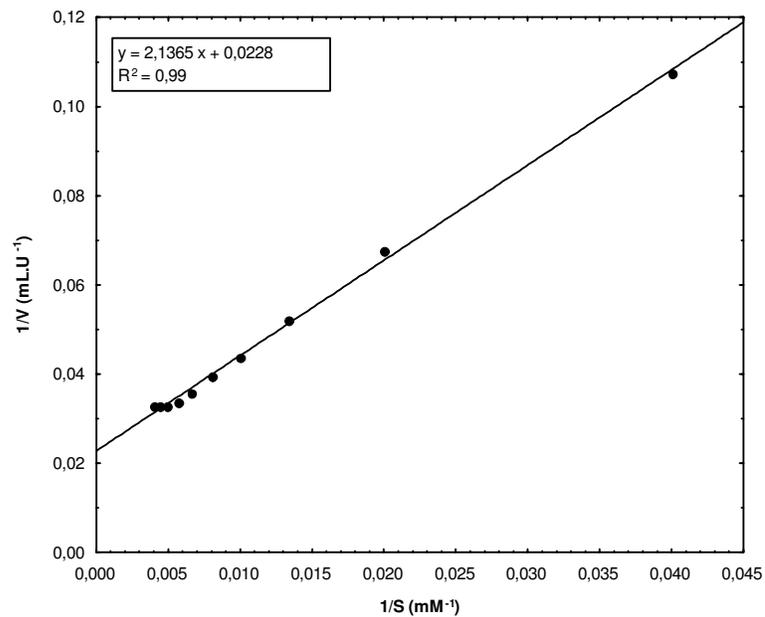


Figura 10: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a β -galactosidase livre de *K. marxianus* CCT 7082 para o substrato lactose.

$$\frac{1}{V} = 30,84 \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{0,27} \quad (\text{Equação 16})$$

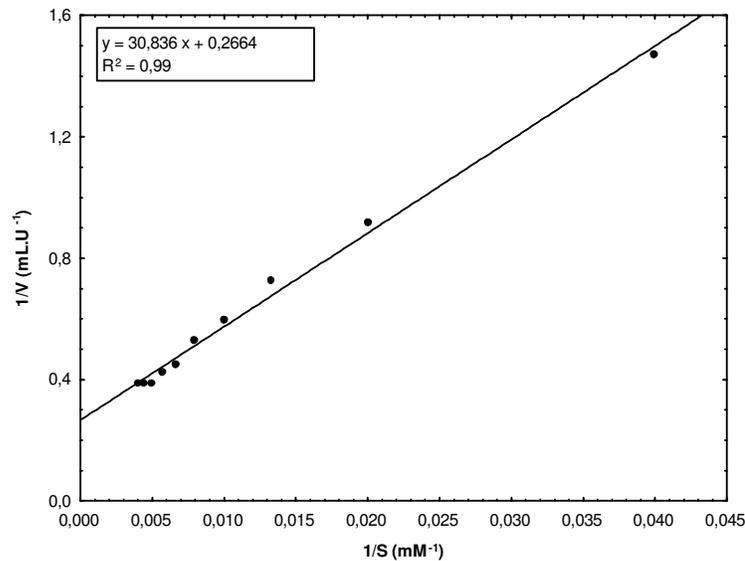


Figura 11: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a β -galactosidase imobilizada de *K. marxianus* CCT 7082 para o substrato lactose.

Como K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato, a diferença nos valores de K_m determinados na presente dissertação quando comparada com os dados existente na literatura se deve que, neste trabalho, a enzima utilizada foi a diretamente a extraída do caldo de fermentação e, que segundo Samoshina & Samoshin (2005), a purificação de enzima pode resultar em uma diminuição no valor de K_m já que qualquer possível interferente é removido, desse modo aumentando a afinidade entre a enzima e o substrato.

Fisher *et al.* (1995), determinaram K_m e V_{max} para a β -galactosidase proveniente de *Thermomyces lanuginosus* utilizando como substrato ONPG, onde obteve como resultados respectivos, 11,3 mM e 18,2 U.mL⁻¹, valores estes muito similares ao encontrados na presente dissertação, visto que não houve etapa de purificação em ambos os trabalhos.

Brady *et al.* (1995), determinando a constante de Michaelis-Menten para a β -galactosidase purificada de *Kluyveromyces marxianus*, obtiveram valores 5,0 mM e 40,0 mM para o ONPG e lactose, respectivamente, sendo estes valores menores que os encontrados no presente trabalho.

De acordo com Zhou & Chen (2001), no caso de enzimas imobilizadas, o valor de K_m tende a aumentar quando comparado a enzimas na forma livre, em virtude que, muitas vezes, alguns centros ativos podem ficar bloqueados após o processo de imobilização.

Esses mesmos autores estudaram a β -galactosidase purificada livre e imobilizada em grafite com glutaraldeído como agente *crosslinking*, quanto à K_m tendo como substrato ONPG. Neste estudo, foram obtidos como resultados 1,7 mM e 9,3 mM, respectivamente, para enzima livre e imobilizada. Comparando os valores obtidos para ambas as formas da β -galactosidase, no presente trabalho, os resultados foram maiores que os encontrados por esses autores, visto que a enzima foi purificada e, no presente trabalho foi utilizado extrato enzimático bruto.

As Figuras 12 a 15 apresentam os dados previstos pelo modelo de Michaelis-Menten para a velocidade de reação e os dados obtidos experimentalmente, podendo-se verificar que os dados experimentais ajustam-se adequadamente ao modelo.

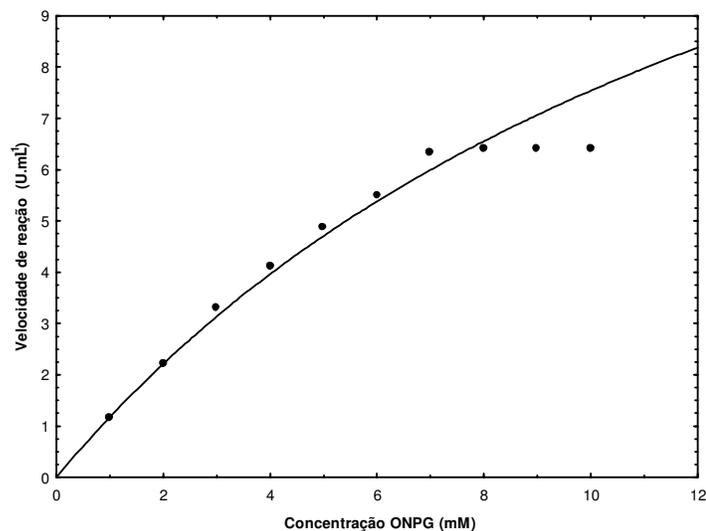


Figura 12: Velocidade de reação da β -galactosidase livre de *K. marxianus* CCT 7082 em função da concentração de ONPG.

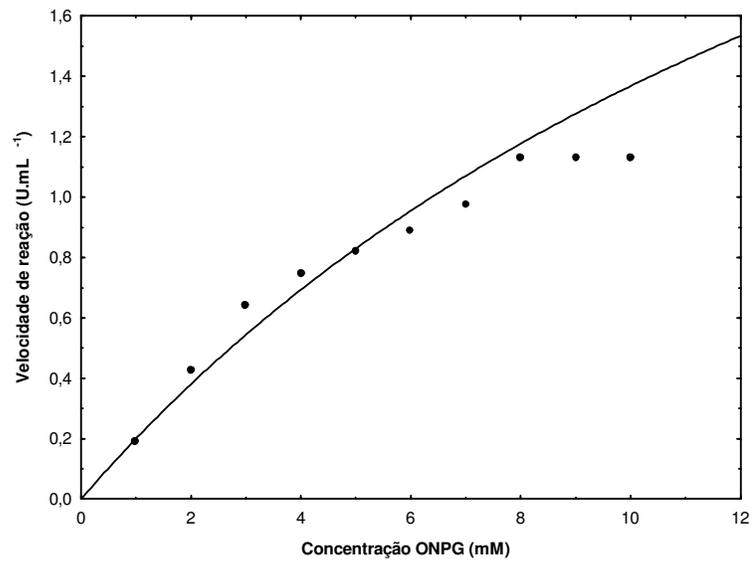


Figura 13: Velocidade de reação da β -galactosidase imobilizada de *K.marxianus* CCT 7082 em função da concentração de ONPG.

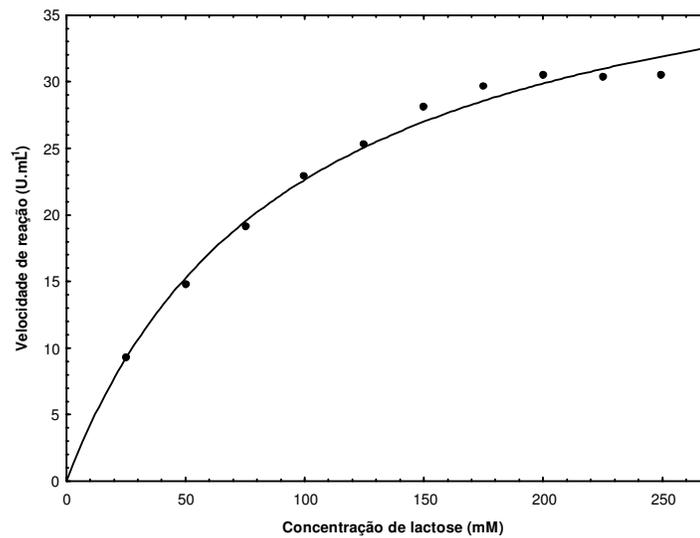


Figura 14: Velocidade de reação da β -galactosidase livre de *K.marxianus* CCT 7082 em função da concentração de lactose.

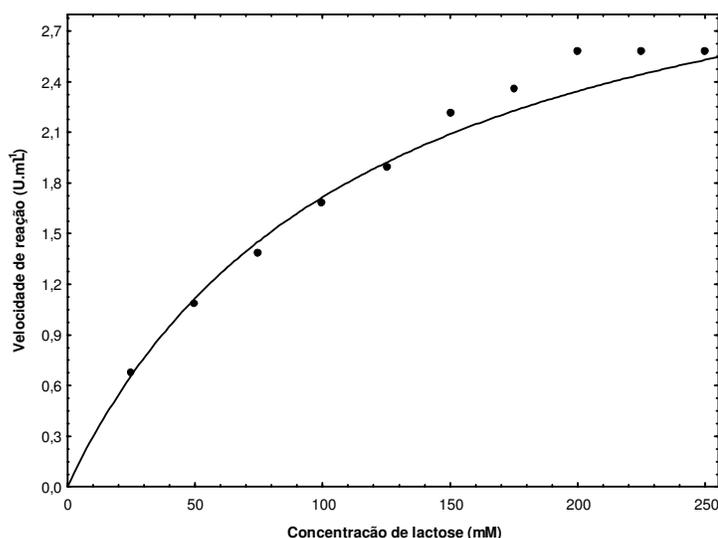


Figura 15: Velocidade de reação da β -galactosidase imobilizada de *K.marxianus* CCT 7082 em função da concentração de lactose.

4. CONCLUSÕES

O processo de imobilização não resultou em alteração nos valores ótimos de pH e temperatura, obtendo respectivamente, pH 6,6 em tampão fosfato e 37°C, tanto para a enzima livre como a imobilizada.

O estudo da estabilidade da enzima mostrou que o tempo de meia-vida a 37°C para enzima livre e imobilizada foi 1,31 e 1,46 h, respectivamente.

A energia de ativação (E_a) calculada para a β -galactosidase livre foi de 9,4 Kcal.mol⁻¹, enquanto que para a enzima na forma imobilizada foi de 2,1 Kcal.mol⁻¹. Já, a energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) foi de 100 Kcal.mol⁻¹ e 106 Kcal.mol⁻¹ para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

Os valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, nas condições estudadas, foram 15,1 mM e 18,9 U.mL⁻¹; 93,7 mM e 43,9 U.mL⁻¹ para os substratos ONPG e lactose, respectivamente para a enzima livre; e 18,5 mM e 3,9 U.mL⁻¹; 115,7 mM e 3,7 U.mL⁻¹ para ONPG e lactose, respectivamente, para a enzima na forma imobilizada.

O método empregado para a imobilização em alginato foi considerado um método simples, fácil, e de bom rendimento e eficiência podendo ser aplicado para a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, além de ter oferecido maior estabilidade à enzima.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. The kinetics of enzyme catalyzed reactions. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed. New York: Mc Graw-Hill, p. 151-178, 1986.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; McHALE, L.; McHALE A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strains of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 696-699, 1995.

CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces marxianus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP 1992.

DOMINGUES, E.; NILSSON, M.; HAHN-HAGERDAL, B. Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. **Enzyme Microbol Techno**, v. 10, p. 606-6010, 1988.

FISHER, L.; SCHECKERMANN, C.; WAGNER, F. Purification and characterization of a β -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1497-1501, 1995.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP., C. W.; MAUS, L., ANDERSEN, L. B. **Princípios das Operações Unitárias**, 2ª Edição, Editora LPC, Rio de Janeiro, RJ, 1982.

FREITAS, F.F.; MARQUEZ, L. D.; BRANDÃO, G.; RIBEIRO, E. J. Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de cálcio. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais do XI SINAFERM**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

FUREGON, L.; PERUFFO, A. D. P.; CURIONI, A. Immobilization of rice limit dextrinase on γ -albumina beads and its possible use in starch processing. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 113-120, 1996.

GEANKOPLIS, C., J. **Transporting Process and Unit Operations**. University of Colorado, 1983.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELL, G. Effect of modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 531-540, 2001.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELL, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 270-278, 2000.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C.; AILLAPÁN, A.; TOMASELLO, G.; ZUÑIGA, M. E. Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 3-9, 1998.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidase: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33-40, 2004.

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

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 1-9, 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 27, p. 583 – 592, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the foling phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p.147-154, 1998.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MARQUEZ, L. D. S.; ARAÚJO, E. H. e RIBEIRO E. J. Estudos de meios de cultura na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2003, Florianópolis. **Anais do XIV SINAFERM**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. CD-ROM.

MAUGERI, F. **Apostila de Engenharia Bioquímica**. FEA – UNICAMP, 2002.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n 2, p. 336-339, 2008.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 24-29, 2001.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

RAKOJA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 315-320, 2003.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. Porto Alegre, 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. Enzymology. In: **Biochemical Techniques: Theory and Practice**. Illinois: Waveland Press, Inc. 1990. p. 291-320.

SAMOSHINA, N. M.; SAMOSHIN, V. V. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 239-251, 2005.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Campinas, SP, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

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

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2002.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WON, K.; KIM, S.; KIM, K.; PARK, H. W.; MOON, S. J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2149-2154, 2005.

YANG J. S.; BAEK, K.; KWON, T. S.; YANG, J. W. Competitive immobilization of multiple component chlorinated solvents by cyclodextrin derivatives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 1866-1869, 2006.

YU, X. W.; LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 44-50, 2006.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-44, 2001.

ZHOU, Q. Z. K.; DONG, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

O modelo proposto pelo planejamento experimental foi considerado válido, sendo a melhor condição estabelecida para a produção da β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi agitação de 500 rpm e aeração de 1,5 vvm, alcançando uma produtividade de $1,2 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, uma atividade enzimática de 17 U.mL^{-1} e uma concentração celular de 11 mg.mL^{-1} .

O processo de imobilização não provocou alteração nos valores ótimos de pH e temperatura, obtendo, respectivamente, pH 6,6 em tampão fosfato e 37°C , para as duas formas enzimáticas estudadas.

O estudo da estabilidade da enzima mostrou que o tempo de meia-vida a 37°C para enzima livre e imobilizada foi 1,31 e 1,46 h, respectivamente.

A energia de ativação (E_a) calculada para a β -galactosidase livre foi de $9,4 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, enquanto que para a enzima na forma imobilizada foi de $2,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Já, a energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) foi de $100 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e $106 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

Os valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, nas condições estudadas, foram $15,1 \text{ mM}$ e $18,9 \text{ U.mL}^{-1}$, $93,7 \text{ mM}$ e $43,9 \text{ U.mL}^{-1}$ para os substratos ONPG e lactose, respectivamente para a enzima livre; e $18,5 \text{ mM}$ e $3,9 \text{ U.mL}^{-1}$, $115,7 \text{ mM}$ e $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$ para ONPG e lactose, respectivamente para a enzima na forma imobilizada.

O método empregado para a imobilização em alginato foi considerado um método simples, fácil, de bom rendimento e eficiência, podendo ser aplicado para a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, além de ter oferecido maior estabilidade à enzima.

CAPÍTULO V
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a influência de diferentes agitadores na produção enzimática;
- Produzir a enzima com pH controlado;
- Otimizar a agitação e a aeração na produção da enzima em fermentador;
- Utilizar técnicas para aumentar a eficiência do processo de imobilização;
- Avaliar a reutilização da enzima imobilizada.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos – Produção e efeitos benéficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. SBCTA – Campinas. V. 35, n. ½, p. 12-19, 2001.

ARROYO, M. **Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones**; Ars Pharmaceutica; v. 39, n. 2; pp. 23-39; 1998.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. The kinetics of enzyme catalyzed reactions. In: **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed. New York: Mc Graw-Hill, 1986. p. 151-178.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, K_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 216-228, 2006.

BANERJEE, M.; CHAKRABARTY, A.; MAJUMDAR, S.K. Immobilization of yeast cells containing β -galactosidase. **Journal of Dairy Sciences**, v. 9, p. 10-14, 1985.

BARBERIS, S. E.; SEGOVIA, R. F. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 11, p.797-799, 1997.

BECERRA, M.; RODRÍGUEZ-BELMONTE E.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase for production of heterologous proteins in lactase media. **Journal of Biotechnology**, v. 109. p.131-137, 2004.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998a.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Oligosaccharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n.3, p. 229-233, 1998b.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology**. Human Press, New Jersey; pp. 367; 1997.

BITZILEKIS, S. e BARNETT, J. A. Exponential growth rates of species of the yeast genus *Kluyveromyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 189-190, 1997.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química de Processamento de Alimentos**. Livraria Varela, 1992.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; RIET, K. V. Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia**. 1ª reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2005. v. 2: Processos fermentativos e enzimáticos.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; McHALE, L.; McHALE A. P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strains of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 696-699, 1995.

BROUNS, F.; VERMMER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 23-44, 2000.

BURKERT, J.F.M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES M.I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 80, p. 61-67, 2005.

CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; KENNEDY, J. F.; CARDOSO, J.P. Immobilization of biocatalysts on new route transition metal-activated inorganic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 30-32, 1983.

CAMPBELL, A. K.; WAUD, J. P.; MATTHEWS, S. B. The molecular basis of lactose intolerance. **Science Progress**, v. 88, p. 157-202, 2005.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis***. Florianópolis, 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces marxianus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP 1992.

CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; RAMÍREZ, O. T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 773-778, 2005.

CRUZ, R.; CRUZ, V. A.; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M. O.; DORTA, C.; OLIVEIRA L. H S. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 265-271, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; COSTA, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. Anovel application of solid stat culture: producton of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1225-1229, 2004.

DICKSON, R. C. e MARKIN, J. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. p. 777-785, 1980.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3rd Ed. Academic Press. New York. 1116 p.; 1979.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA J. A. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1151-1154, 2005.

DOMINGUES, E.; NILSSON, M.; HAHN-HAGERDAL, B. Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 10, p. 606-6010, 1988.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry: a textbook**; 4th Ed.; Springer; New York; 453 pp.; 1997.

FENG, Y.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; NG, W. J. Optimization of agitation, aeration and temperature conditions for maximum β -manase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 282-289, 2003.

FISHER, L.; SCHECKERMANN, C.; WAGNER, F. Purification and characterization of a β -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1497-1501, 1995.

FLORES, S. H.; ALEGRE, R. M. Produção de β -galactosidase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 1996, São Carlos. **Anais do XI SINAFERM**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1996. p. 321-326.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP., C. W.; MAUS, L., ANDERSEN, L. B. **Princípios das Operações Unitárias**, 2ª Edição, Editora LPC, Rio de Janeiro, RJ, 1982.

FREITAS, F.F.; MARQUEZ, L. D.; BRANDÃO, G.; RIBEIRO, E. J. Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de cálcio. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais do XI SINAFERM**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

FUREGON, L.; PERUFFO, A. D. P.; CURIONI, A Immobilization of rice limit dextrinase on γ -albumina beads and its possible use in starch processing. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 113-120, 1996.

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacterias, yeast and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004.

GARCÍA-GARIBAY, M.; TORRES, J.; LÓPEZ-MUNGUTA-CANALES, A.; CASAS, L. T. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*, Biotechnology Letters, v. 9, p. 417-420, 1987.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

GEANKOPLIS, C., J. **Transporting Process and Unit Operations**. University of Colorado, 1983.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.

GENEVA, V.; GALUTZOV, B.; EYNARD, N.; TEISSIÉ, J. Electroinduced extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 411-413, 2001.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 101–108, 2006.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose:

comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 4, p. 313-327, 1998.

GOODHUE, C.; ROSAZZA, J. P.; PERUZZOTTI, G. P. Methods for transformation of organic compounds. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Eds. A. L. Demain, N. A. Solomn, Amer. Soc. for Microbiology, Washington, 1986.

GRUNENVALDT, F. L.; KUHN, K. R.; VEIGA, I. G. **Purificação de β -galactosidase produzida a partir de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica de precipitação**. Projeto de conclusão de curso - Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

HAALAND, P.D., 1989. Experimental design in biotechnology. Marcel Dekker inc, New York.

HARTEMEIER, W. **Immobilized Biocatalysts: an introduction**. Springer-Verlag. New York; 1998.

HERNALSTEENS, S.; **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**. Campinas, SP. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2006.

HENSING, M.C.M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fedbatch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.42, p.516-521, 1994.

HEO; TAE-RUEO; LEE. . Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 869-873, 2000.

HOLMES, M. L.; SCOPES, R. K.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; ENGLERT, C.; PFEIFER, F.; SMITH, M. L. Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloferax alicantei*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 276-286, 1997.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, A. E. Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. **Food Technology**, v. 45, p. 92-95, 1991.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELL, G..Effect of modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 531-540, 2001.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELL, G..Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 270-278, 2000.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C.; AILLAPÁN, A.; TOMASELLO, G. ZUÑIGA, M. E. Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 3-9, 1998.

INCHAURRONDO, V. A.; FLORES, M. V.; VOGET, C. E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 291-298, 1998.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidase: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33-40, 2004.

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

KARDEL, G.; FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. L. Lactase na indústria de laticínios (parte 1). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, n. 249, p.15-17, 1995.

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

KIM, C. S.; JI, E.; OH, D. A new kinetic model of recombinante β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 738-743, 2004.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analysis Biochemistry**, v. 93, p. 1-25, 1979.

- KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 1-9, 2006.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 27, p. 583 – 592, 2000.
- LASKIN, A. I. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**; Biotechnology Series; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc; California; 312 pp.; 1985.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 7ª reimp. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1997. v. 1: Componentes moleculares das células.
- LENG, L.; ZHU, A.; ZHANG, Z.; HURST, R.; GOLDSTEIN, J. Cloning, functional expression and purification of endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*. **Kimball Research Institute**, p. 187–194, 1998.
- LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G. **Extração de β -galactosidase de *kluyveromyces marxianus* CCT 7081 e purificação através de sistema aquoso bifásico**. Projeto de conclusão de curso - Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.
- LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 35-40, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the foling phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 8, p. 232-284, 2005.
- MacBEAN, R. D. Lactose crystallization and lactose hydrolysis. **Journal Dairy Science Technonology**, v. 14, p. 113, 1979.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p.147-154, 1998.

MAHONEY, R. R.; NICKERSON, T. A.; WHITAKER J. R. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures of optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 11, p. 1620-1629, 1974.

MAKINO, Y. **Produção e Purificação em leite expandido de inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the Culture Medium for the Production of beta-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para a produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima**. Rio Grande, RS. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

MARIOTTI, M. P.; TREVISAN, H. C.; HYAMANAKA, H. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada**. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. 2000.

MARKL, H.; BRONNENMEIER, R. Mechanical Stress and microbial production. **Fundamental of Biochemical Engineering: Byotechnology**. Volume Editor: H. Brauer VCH, 1985, v 2, cap 18.

MARQUEZ, L. D. S.; ARAÚJO, E. H. e RIBEIRO E. J. Estudos de meios de cultura na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2003, Florianópolis. **Anais do XIV SINAFERM**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. CD-ROM.

MARTINS, D. B. G.; SOUZA, C. G.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 decreases by high concentrations of galactose. **Current Microbiology**, v. 44, p. 379-382, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity

via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1446, 2007.

MAUGERI, F. **Apostila de Engenharia Bioquímica**. FEA – UNICAMP, 2002.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, J.F. **Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.*** Campinas, SP. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

MESSING, R. A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**; Academic Press; New York; 232 pp.; 1975.

MILNER, J. A; MARTIN, D. J.; SMITH, A. Oxigen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 507-5012, 1996.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 24-29, 2001.

NAKAGAWA, T.; IKEHATA, R.; UCHINO, M.; MIYAJI, T.; TAKANO, K.; TOMIZUKA, N. Cold-active acid β -galactosidase activity of isolated psychrophilic-basidiomycetous yeast *Guehomyces pullulans*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 75-79, 2006.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **Bioreaction engineering principles**. Plenum Press, New York, 1994.

NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 845-849, 2001.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004.

OLEMPKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144-158, 2006.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes - review. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

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

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. G. Commercially available oligosaccharides. **Int. Dairy Fed. Bull.**, v. 31, n. 6, p. 1517-1520, 1996.

RAJOKA, M. I.; LATIF, F.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics of improved productivity of β -galactosidase by a cycloheximide-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 741-746, 2004.

RAMÍREZ MATHEUS, A. L.; RIVAS, N. Producción y caracterización parcial de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n.2, p, 2003.

RAO, M. V. R.; DUTTA, S. M. Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 185-188, 1977.

RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 873–877, 2007.

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

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase pro *Kluyveromyces marxianus***. Porto Alegre, 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. **Enzymes in Food Processing**. New York, Academic Press. 3^a ed. 1993.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária – UFPel, 2000. v. 3: produção de enzimas, engenharia dos processos fermentativos.

RICHMOND, M. L.; GRAY, J. I.; STINE, C. M. Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concern and immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 1759-1771, 1981.

ROBINSON D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. Enzymology. **Biochemical Techniques: Theory and Practice**. Illinois: Waveland Press, Inc. 1990. p. 291-320.

ROSEVEAR, A. **Immobilized Biocatalysts – a critical review**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology; v. 34B; pp. 127-150; 1984.

ROYER, G. P. **Immobilized Enzymes Catalysis Reviews, 1978**; Catalysis Review; Science and Engineering; v. 22; n. 1; pp. 29-73, 1980

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006.

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. H. Formation of oligosaccharides from whey upermeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, V. 62, p. 141- 147, 1998.

SAMOSHINA, N. M.; SAMOSHIN, V. V. The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β -galactosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 239-251, 2005.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G.; **Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202**; *Process Biochemistry*, v. 40; pp. 1085-1088; 2005.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Campinas, SP, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS A.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. F.; JONAS, R.; FURLAN, S. Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. **Biotechnology Letters**. V. 23, p. 547-550, 2001.

SERRANO-CARREÓN, L.; CORONA, R. M.; SANCHEZ, A.; GALINDO, E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 133-146, 1998.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B. S.; HARTL, L.; KUBICEK C. P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 42 – 48, 2007.

SHIN H.; PARK, J.; YANG, J. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 787-792, 1998.

SHUKLA, T. P. Beta-galctosidase technology: a solution to the lactose problem. **CRC. Crit. Rev. Food Technol.**, v. 5, p. 325, 1975.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**. Campinas, v.30, n. 04, 1999.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.

SOBIEWSKA, G.; MACIUN' SKA, J.; SYNOWIECKI, J.; KUR, J. Cloning, Expression, and Purification of the His6-Tagged Thermostable β -galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and Some Properties of the Isolated Enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 19, p.107–112, 2000.

STAMATIS, H.; KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.

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

SZILAGYI, A. Review article: lactose – a potential prebiotic. **Alimentary Pharmacology Ther**, v.16, p. 1591-1602, 2002.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2002.

TOMÁSKA, M.; STREDANSKY, M.; GEMEINER, P.; STURDIK, E. Improvement of the thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.30, n. 7, p. 649-652, 1995.

Van-BELIEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, pp. 338-344; 2002.

VASILJEVIC, T. e JELEN, P. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 2, p. 75-85, 2001.

VINIEGRA-GONZALES, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMEZ, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

WAINWRIGHT M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995.

WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAIN, A. L.; DUNNIL, P.; HUMPHREY, A. E.; LILLI, M. D. **Fermentation and enzyme technology**. New York, Toronto. John Wiley & Sons, 1979.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WILLEMIEK, H.M.; CASTEREN, V.; EIMERMANN, M.; BROEK, L. A. M.; VINCKEN, J.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A.G.J. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. **Carbohydrate Research**, p. 75–85. 2000.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

WON, K.; KIM, S.; KIM, K.; PARK, H. W.; MOON, S. J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2149-2154, 2005.

WON, K.; KIM, S.; KIM, K.; PARK, H. W.; MOON, S. J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2149-2154, 2005.

YANG J. S.; BAEK, K.; KWON, T. S.; YANG, J. W. Competitive immobilization of multiple component chlorinated solvents by cyclodextrin derivatives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 1866-1869, 2006.

YANG, S. T.; SILVA E. M. Novel products and new technologies for use of a familial carbohydrate, milk lactose. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.

YU, X. W.; LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 44-50, 2006.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-44, 2001.

ZHOU, Q. Z. K.; DONG, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.