



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 – TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



## IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MEMBRANAS PARA HIDRÓLISE DA LACTOSE

*Autor: Gabriel Plá Matielo Lemos*

*Orientadoras: Débora Jung Luvizetto Faccin*

*Isabel Cristina Tessaro*

Porto Alegre, janeiro de 2018

**SUMÁRIO**

SUMÁRIO	2
AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	8
3 CONCEITOS FUNDAMENTAIS	9
3.1 Lactose	10
3.2 $\beta$ -galactosidase	11
3.3 Enzimas na forma livre ou na forma imobilizada	12
3.4 Técnicas de imobilização de enzimas	13
3.4.1 MÉTODOS FÍSICOS	14
3.4.1.1 Adsorção física	14
3.4.1.2 Aprisionamento em matrizes porosas	15
3.4.1.3 Microencapsulação	15
3.4.2 MÉTODOS QUÍMICOS	16
3.4.2.1 Ligação química covalente	16
3.4.2.2 Ligação cruzada	16
3.4.2.3 Ligação iônica	17
3.4.2.4 Conjugação por afinidade entre ligantes	17
3.5 Imobilização de enzimas em membranas	18
4 METODOLOGIA	19
5 REVISÃO DE LITERATURA	20
6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES	26
6.1 Parâmetros ótimos: pH	26
6.2 Parâmetros ótimos: temperatura	27
6.3 Parâmetros ótimos: estabilidade enzimática e ensaios de reutilização	27
6.4 Comparação dos resultados	28
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8 REFERÊNCIAS	32

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos seus professores, que permitiram a ampliação do meu conhecimento técnico.

Às minhas orientadoras Débora J. L. Faccin e Isabel C. Tessaro pelo auxílio, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela compreensão das minhas limitações.

Aos amigos do Inimigos da Corrosão F. C. pela parceria, pelos conselhos e pelo companheirismo nos momentos difíceis.

Aos meus pais Cláudia e Paulo e Gisele e Clovis pelo incentivo ao estudo constante, pela educação e pelo apoio emocional.

Aos meus avós Inês e Guaracy por me mostrarem o caminho para ser uma pessoa melhor e pelos valores de vida que carrego e transmito.

Aos meus irmãos Rafael, Ana Clara, Laura e Mariana pelo convívio maravilhoso e pelo verdadeiro amor fraterno.

À minha irmã Laura, em especial, por ser um exemplo de luta pela vida mesmo nas batalhas mais difíceis e por ser sempre tão amorosa com todos que a cercam.

Aos meus familiares próximos e distantes com quem compartilhei momentos de alegria e de união.

À minha querida companheira Maya pelos carinhos e pelo amor incondicional.

E à Aline Marques Acosta, minha melhor amiga, minha grande companheira de vida, a quem dedico meu afeto e amor, pela cumplicidade e pelas experiências necessárias ao meu crescimento para me tornar uma pessoa melhor.

“O valor do conhecimento está na sua prática e compartilhamento.”

“Participar do sucesso daqueles que cruzam o nosso caminho é a garantia do nosso próprio sucesso” (Paulo Matielo).

## RESUMO

Em função da crescente necessidade de produtos de baixo teor de lactose, a busca por métodos eficazes para a hidrólise da lactose pela  $\beta$ -galactosidase imobilizada têm sido objeto de estudo por diversos pesquisadores. Nesse contexto as membranas surgem como um suporte adequado para imobilizar a  $\beta$ -galactosidase, visto que possuem elevado potencial para a retenção da atividade enzimática quanto ao reuso e para a estabilidade pelo armazenamento. As vantagens do uso de membranas funcionalizadas como suporte de imobilização são apontadas pela maioria dos autores, e seus resultados demonstram a eficiência de sua aplicação. Para apontar os estudos com os melhores resultados, foi realizada uma revisão bibliográfica pela busca em bases de dados para a comparação dos sistemas aplicados em cada processo quanto à diversidade de materiais de membranas, à fonte da enzima utilizada e às condições do microambiente para a hidrólise da lactose. Os melhores resultados encontrados no presente trabalho demonstram que a retenção da atividade enzimática e a estabilidade no armazenamento ocorreram em sistemas que utilizaram as membranas de poli(2-hidroxietilmetacrilato), de nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com polianilina cobalto e de membrana de polipropileno funcionalizada com hexametilenodiamina como suporte de imobilização da enzima para hidrolisar a lactose.

Palavras-chave: imobilização de enzimas, galactosidase, lactase, lactose, membranas, hidrólise de lactose e hidrólise enzimática.

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1 – Obtenção de soro de leite residual na fabricação de queijo.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 3.2 – Fluxograma do processo de fabricação de soro de leite sem lactose.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3.3 – Fluxograma do processo de fabricação de leite sem lactose (método 1).....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3.4 – Fluxograma do processo de fabricação de leite sem lactose (método 2).....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3.5 – Hidrólise enzimática da lactose e formação glicose e galactose.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3.6 – Técnicas de Imobilização de Enzimas.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3.7 – Materiais das membranas utilizadas para imobilização enzimática.....</b>	<b>18</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 – Síntese da busca inicial nas bases de dados e bibliotecas eletrônicas.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 2 – Estudos que utilizaram membranas para imobilização da <math>\beta</math>-galactosidase para hidrólise da lactose.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 3 – Estudos que utilizaram membranas para imobilização da <math>\beta</math>-galactosidase para outros objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 4 – Resultados dos sistemas ótimos estudados por diferentes autores.....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a intolerância à lactose é um importante problema de saúde. Quando pacientes intolerantes ingerem alimentos contendo esse açúcar, sua saúde é afetada, dificultando o processo digestivo. Portanto, tem sido um desafio para a indústria de laticínios a produção de produtos sem lactose.

Na indústria de laticínios são produzidas grandes quantidades de efluentes contendo açúcares dissolvidos, proteínas e gorduras. A lactose é um dos componentes destes efluentes e representa de 5 a 6% do soro do leite residual na produção de queijos e outros derivados (PALAI *et al.*, 2014). Essa lactose, que possui elevado valor nutricional, poderia ser utilizada de forma mais efetiva se separada e convertida em produtos de valor agregado comercial. Uma das formas de utilização da lactose residual e, também, para manufatura de produtos lácteos de baixo teor de lactose é a hidrólise utilizando enzimas.

A  $\beta$ -galactosidase é uma importante enzima usada na indústria de alimentos para hidrólise da lactose, processo necessário para produção de laticínios para pessoas com intolerância. Entretanto, o preço da enzima é muito elevado e a adição direta ao substrato se torna economicamente inviável. Assim, enzimas quando imobilizadas poderiam ser reutilizadas diversas vezes, o que diminuiria o custo de produção.

Dentre os métodos de imobilização de enzimas utilizados atualmente, o uso de membranas como suporte tem sido estudado e sua viabilidade para a imobilização tem mostrado resultados positivos. Diversos estudos têm sido realizados para imobilizar a  $\beta$ -galactosidase, a fim de aprimorar a conversão biotecnológica de lactose em biorreatores e a performance da imobilização enzimática é determinada principalmente pelas propriedades dos materiais do suporte, pela técnica utilizada para imobilização e pela natureza do biorreator utilizado.

Considerando a diversidade de materiais de membranas disponíveis no mercado e os métodos de ativação do suporte, estrutura de fixação da enzima, este estudo pretende realizar uma revisão de literatura sobre a imobilização da  $\beta$ -galactosidase utilizando membranas, comparando as publicações quanto aos resultados e aos parâmetros ótimos encontrados, a retenção da atividade enzimática com o armazenamento e a possível reutilização em mais ciclos de hidrólise enzimática.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Estudar, a partir da revisão de literatura em bases de dados, a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase (lactase) utilizando membranas para hidrólise de lactose.

### Objetivos específicos

- Identificar os estudos que obtiveram os melhores resultados quanto à imobilização da enzima e os parâmetros ótimos encontrados.
- Sugerir trabalhos futuros relacionados à imobilização da  $\beta$ -galactosidase utilizando membranas e apontar um sistema, considerado o melhor dentre os encontrados na literatura, para uma futura realização de hidrólise em biorreator enzimático com membranas.

### 3 CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Neste capítulo serão apresentados conceitos importantes para a compreensão da produção dos derivados da indústria de laticínios, a quebra da lactose de forma enzimática, as formas de utilização de enzimas e as técnicas de imobilização existentes.

Na indústria de alimentos, a lactose merece destaque na fabricação de iogurtes e queijos pela fermentação da lactose, e em outros alimentos não lácteos, como sopas, bebidas, produtos cárneos e misturas de especiarias (PEREIRA *et al.*, 2012).

Na Figura 3.1 está ilustrado o processo de fabricação de queijo sem lactose e a remoção do permeado soro de leite. Para esse processo não é necessária utilização da lactase devido à remoção da lactose no soro de leite pela ultrafiltração com membranas.

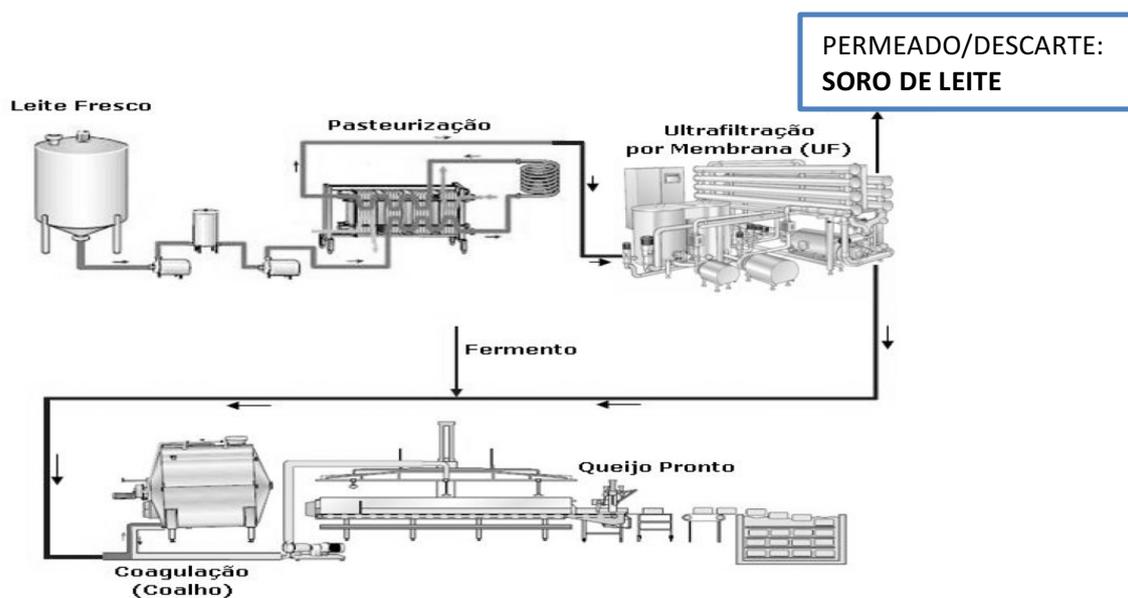


Figura 3.1: Obtenção de soro de leite residual na fabricação de queijo.

Fonte: Adaptado de VAPORTEC, 2016.

Os processos de quebra da lactose de maior interesse industrial são a hidrólise do soro de leite e do leite integral. Nos processos encontrados na literatura observou-se que não ocorre recuperação da lactase, o que torna os produtos sem lactose mais caros para o consumidor devido ao custo elevado da enzima. Para fins de comparação, a lactase para uso industrial possui custo médio de R\$ 140,00/m<sup>3</sup> de leite (RICANATA, 2017).

A seguir, nas Figura 3.2, Figura 3.3 e Figura 3.4, adaptadas de Schmidell *et al.* (2001), são ilustrados os processos de fabricação desses produtos.



Figura 3.2: Fluxograma do processo de fabricação de soro de leite sem lactose.



Figura 3.3: Fluxograma do processo de fabricação de leite sem lactose (método 1).



Figura 3.4: Fluxograma do processo de fabricação de leite sem lactose (método 2).

### 3.1 Lactose

A lactose é o principal açúcar do leite e seus derivados e encontra-se presente em grande quantidade no soro, em torno de 70 %, e no leite integral, 5 % em base seca (PEREIRA *et al.*, 2012). Além disso, na indústria farmacêutica, pode ser encontrada em mais de 20% dos medicamentos prescritos (DWEVEDI, 2016), contida nas formulações como excipiente em cápsulas e comprimidos.

Segundo Schmidell *et al.* (2001), esse carboidrato é o principal constituinte, em termos de sólidos totais, do leite, do soro e do leite desnatado. A lactose pode ser hidrolisada por via ácida ou enzimática, sendo a última a mais utilizada.

As enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos formados por longas cadeias de moléculas pequenas, os aminoácidos. Sua função é viabilizar a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos. As enzimas possuem centros ativos onde ocorre a atividade catalítica.

A vantagem da hidrólise enzimática reside no fato da reação se processar a temperaturas relativamente baixas (aproximadamente 40°C), permitindo uma maior economia energética, além de não formar subprodutos. Uma das enzimas mais utilizadas para a hidrólise da lactose é a  $\beta$ -galactosidase.

### 3.2 $\beta$ -galactosidase

A hidrólise da lactose em glicose e galactose pela  $\beta$ -galactosidase é um importante processo na indústria de alimentos para produção de derivados de baixo teor de lactose e de alto valor nutricional. Observam-se, também, vantagens tecnológicas e ambientais das aplicações industriais, tais como a elaboração de leite adoçado de baixa lactose, a formação de galactooligossacarídeos (GOS) que favorecem a flora intestinal, o aumento da solubilidade dos produtos hidrolisados evitando a sua cristalização em processos de secagem, a formação de produtos para alimentação animal, a produção de iogurtes e queijos e a redução do impacto ambiental pela remoção da lactose (MARIOTTI *et al.*, 2008). Na Figura 3.5 é ilustrada a reação de hidrólise da lactose.

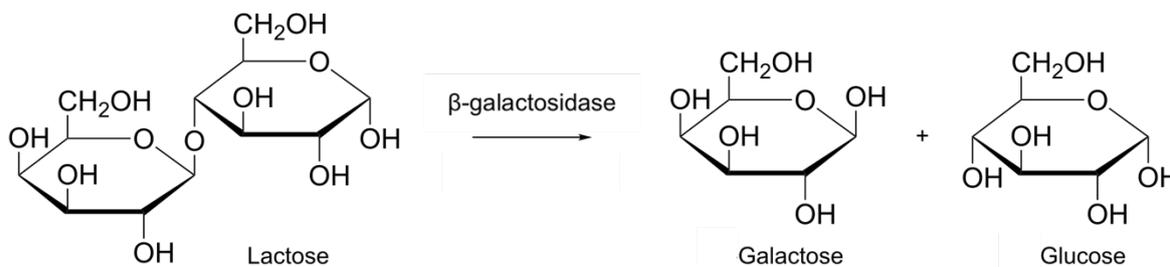


Figura 3.5: Hidrólise enzimática da lactose e formação de glicose e galactose.

Fonte: NATH *et al.* (2013).

A lactase ( $\beta$ -galactosidase) é sintetizada por vários microrganismos, como por exemplo, de leveduras (fungos unicelulares, geralmente *Kluyveromyces fragilis* ou *Kluyveromyces lactis*) e de fungos filamentosos ou bolores (fungos pluricelulares, em geral *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*). As lactases dessas duas fontes diferem basicamente no pH de atividade ótima, já que as de levedura tem pH ótimo entre 6,0 e 7,0, enquanto que as de fungos filamentosos entre 4,0 e 5,0. Devido a isso, as lactases de levedura são recomendadas para hidrolisar o leite, enquanto que as de fungos filamentosos são usadas para o soro de leite. As lactases podem ser inativadas por metais pesados ( $\text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $\text{Hg}^{2+}$ ) e as de levedura, em particular, são inibidas por  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  são ativadores em determinadas concentrações (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para quantificação da atividade desta enzima, utiliza-se a unidade lactásica. Esta é definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1 mol de glicose/min sob condições definidas. Caso seja utilizado o substrato sintético ortonitrofenil-beta-

D-galactopiranosídeo (ONPG), a unidade seria a quantidade de enzima que hidrolisa 1 mol de ONPG/min.

Outra possibilidade de utilização da  $\beta$ -galactosidase é a produção de galactooligossacarídeos (GOS) pela reação conhecida por transgalactosação. Nesse processo, a enzima é capaz de transferir galactose aos grupos hidroxila da glicose ou da galactose (EBRAHIMI *et al.*, 2010). Os galactooligossacarídeos são reconhecidos como prebióticos e estimulam o crescimento e a atividade de bactérias benéficas do intestino (ENGEL *et al.*, 2007 apud JOCHEMS *et al.*, 2011).

### 3.3 Enzimas na forma livre ou na forma imobilizada

As enzimas podem ser utilizadas nas formas livre ou imobilizadas em uma matriz ou suporte por algum método. Os sistemas com células imobilizadas têm como principal característica o uso de alguma estrutura física de confinamento que obriga as células a permanecerem em uma região particular de um suporte.

A escolha entre as formas livre e imobilizada de uma enzima depende da natureza do processo de conversão e da estabilidade operacional das duas formas. Além disso, em algumas situações a escolha seria afetada pelo fato de ser possível a remoção da enzima imobilizada do produto final ou pela possibilidade de mudança da cinética da reação. Logo, é inegável que a estabilidade operacional do sistema imobilizado apresenta um peso ponderável na decisão entre enzima livre e imobilizada (SCHMIDELL *et al.* 2001).

Segundo Giacomini *et al.* (1998), os parâmetros da enzima e do preço da  $\beta$ -galactosidase determinam o custo da hidrólise da lactose ou de formação de GOS. Além disso, enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas várias vezes e há possibilidade do desenvolvimento de processos de hidrólise contínua que liberam os produtos livres de enzimas.

Várias enzimas em estado livre são administradas por via oral para o tratamento de doenças como insuficiência pancreática e intolerância à lactose e seu uso na forma imobilizada ajuda na resistência a atividades proteolíticas dentro do intestino, além de não ser tóxico para o corpo e liberar a enzima no requerido local de ação para tratar uma determinada doença.

Em geral a imobilização de enzimas em vários suportes possui alguns benefícios, tais como o uso de processo contínuo, o reuso da enzima, o aumento

da estabilidade enzimática, a resistência a um pH extremo etc. (EL-MASRY *et al.*, 2001).

No caso particular da imobilização, há ainda a possibilidade de se modificar as características cinéticas da enzima ou ainda modificar a superfície do suporte para introduzir grupos funcionais que serão responsáveis pela imobilização (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

### 3.4 Técnicas de imobilização de enzimas

A imobilização é geralmente conseguida através do contato de um material utilizado para fixar as células vivas ou enzimas. Este material utilizado para a imobilização é denominado suporte.

Existem diversos métodos para imobilização enzimática em variadas matrizes com diferentes modos de ligação em suas superfícies. Muitas modificações nos suportes têm sido realizadas e estão evoluindo para atualizar os protocolos de imobilização para que as enzimas imobilizadas se tornem compatíveis com novas aplicações.

A evolução de novos protocolos de imobilização se concentra principalmente em: porcentagem de recuperação enzimática, estabilidade operacional, seletividade e redução na inibição por produtos ou qualquer outro componente presente no meio. Envolve otimização intensiva de soluções de imobilização para controlar a interação entre a matriz e a enzima e a orientação adequada da enzima para manter suas propriedades catalíticas.

O uso de reagentes tóxicos e altamente instáveis durante os processos de imobilização deve ser reduzido ao mínimo. Além disso, os reatores baseados em enzimas imobilizadas possuem design e controle da reação simplificados (DWEVEDI, 2016).

A  $\beta$ -galactosidase tem sido imobilizada em vários suportes, incluindo solventes líquidos estabilizados com surfactantes, resinas de troca aniônicas, esferas magnéticas, malhas de algodão, filmes de polietileno, partículas de quitosano, etc. Além dos suportes convencionais, as membranas têm sido utilizadas para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase (BARAN *et al.*, 1997).

A seguir serão descritas as técnicas de imobilização enzimática conforme classificação apresentada em Dwevedi (2016).

Na Figura 3.6 está apresentado um fluxograma com as técnicas utilizadas

para imobilização enzimática encontradas na literatura.



Figura 3.6: Técnicas de Imobilização de Enzimas

Fonte: Adaptado de Dwevedi (2016)

### 3.4.1 MÉTODOS FÍSICOS

As ligações enzimáticas em diferentes matrizes via ligações físicas envolvem forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. O processo é reversível pelo controle dos parâmetros físico-químicos.

#### 3.4.1.1 Adsorção física

Na adsorção física a enzima é aderida ao material do suporte por ligações não covalentes, incluindo interações iônicas ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals sem qualquer pré-ativação do suporte.

Os materiais mais utilizados na adsorção física podem ser inorgânicos (alumina, sílica, vidro etc.), polímeros naturais (alginato, ágar, celulose, etc.) e polímeros sintéticos (poliacrilamida). Esses materiais têm sido submetidos a tratamentos superficiais, visando a obtenção de estruturas macroporosas, com o intuito de se incrementar a capacidade de retenção do suporte (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O método de imobilização envolve otimização de variáveis, incluindo pH, temperatura, natureza do solvente, força iônica, concentração de enzima e adsorvente. A enzima é diretamente adicionada à superfície do suporte sem qualquer remoção de enzima não adsorvida durante a lavagem.

O método é simples, com uma ampla variedade de transportadores úteis para purificação e para imobilização enzimática sem qualquer alteração

conformacional.

#### 3.4.1.2 Aprisionamento em matrizes porosas

O aprisionamento em matrizes porosas envolve ligações inter cruzadas da enzima em um polímero (poliacrilamida, alginato, etc.) em qualquer direção, cobrindo quase todas as cadeias laterais presentes na superfície da enzima por aprisionamento físico dentro da rede polimérica. Isso permite a permeação de substratos de tamanho adequado e a liberação de moléculas de produto, o que garante uma transformação contínua.

Este método possui várias vantagens: simplicidade, nenhuma alteração nas propriedades das enzimas, não implica modificação química e as matrizes estão disponíveis em várias formas. Dentre as limitações deste método de imobilização podemos citar a possível ocorrência de lixiviação enzimática; somente substratos e produtos de pequeno porte podem ser usados; requer equilíbrio delicado entre as propriedades mecânicas da matriz e seu efeito sobre a atividade enzimática; e a resistência à difusão tanto de substratos quanto de produto.

#### 3.4.1.3 Microencapsulação

A técnica de microencapsulação é caracterizada pela compartimentação das enzimas em uma membrana fina ou microporosa. As enzimas são imobilizadas por inclusão em membranas poliméricas semipermeáveis, esféricas e com porosidade controlada. Estas membranas podem ser feitas de nitrato de celulose e poliestireno ou de surfactante líquido. Enzimas imobilizadas por encapsulamento têm áreas de superfície extremamente grandes devido ao fato de ter maior eficiência catalítica. No entanto, existem vários relatos sobre a inativação ocasional, apesar da presença de alta concentração de enzimas.

Esta técnica é muito utilizada na área farmacêutica, para liberação controlada de fórmulas, em defensivos agrícolas, usada na liberação de pesticidas minimizando perdas, e na indústria alimentícia, na preservação de cor e sabores e no controle de liberação de aromas.

### 3.4.2 MÉTODOS QUÍMICOS

Os métodos químicos envolvem ligações de enzimas em diferentes matrizes utilizando ligações covalentes ou iônicas em um processo irreversível.

#### 3.4.2.1 Ligação química covalente

Quando a enzima está ligada à matriz por meio de ligações covalentes, as moléculas enzimáticas estão ligadas diretamente aos grupos reativos presentes na matriz ou por um grupo funcional, artificialmente ligado à matriz através de várias reações químicas.

Segundo Schmidell *et al.* (2001), os suportes são especialmente funcionalizados para conter um grupamento químico que será responsável pela imobilização ao suporte. A literatura descreve várias técnicas que são utilizadas para a funcionalização do suporte. Uma das mais utilizadas é a silanização de esferas de vidro, seguida de reação com glutaraldeído. Esta técnica é considerada, também, como uma adsorção química.

As matrizes comumente usadas são naturais (vidro, Sephadex, agarose) ou sintéticas (acrilamida, ácido metacrílico, estireno) e a seleção de uma determinada matriz depende do custo, da disponibilidade, da capacidade de ligação, da hidrofobicidade, da rigidez estrutural e da durabilidade durante várias aplicações. Este método de imobilização envolve aminoácidos não essenciais levando a um mínimo de mudanças conformacionais. Isso ajuda a promover a maior resistência das enzimas imobilizadas para condições físicas e químicas extremas (temperatura, desnaturantes, solventes orgânicos). No entanto, este método leva a uma maior exigência sobre a enzima e às vezes acarreta mudanças drásticas nas propriedades conformacionais e catalíticas da enzima, devido a condições de imobilização e à concorrência de grupos amino semelhantes no sítio ativo envolvido durante a interação da enzima com a matriz.

#### 3.4.2.2 Ligação cruzada

Quando o método químico se caracteriza por apresentar ligações cruzadas, ocorre a formação de uma série de ligações covalentes entre a enzima e a matriz, geralmente devido à ação de reagentes multifuncionais (glutaraldeído, glioxal, di-

isocianatos etc.). A principal vantagem deste método é a sua simplicidade. No entanto, pode levar à perda de uma grande quantidade de enzimas pela dificuldade de controle de formação das ligações cruzadas. Além disso, este método de imobilização enzimática sofre limitações causadas pela difusão.

#### 3.4.2.3 Ligação iônica

Quando o método químico é baseado em ligações iônicas ocorrem interações iônicas entre as moléculas das enzimas com a matriz carregada. Quanto maior a densidade de carga da superfície na matriz, maior seria a quantidade de enzima ligada.

Às vezes, além das interações iônicas, moléculas de enzimas também são fisicamente adsorvidas à matriz. O método de imobilização enzimática é semelhante ao discutido na seção sobre adsorção física. Ligação enzimática através de interações iônicas durante a imobilização depende do pH da solução, da concentração da enzima e da temperatura. As matrizes comumente usadas são: derivados de polissacarídeos, polímeros sintéticos e materiais inorgânicos. Este método de imobilização leva a mudanças mínimas na conformação enzimática. Contudo, é dada especial atenção à manutenção de força iônica necessária e ao pH da solução em que a enzima imobilizada catalisa uma vez que existe uma maior chance de desprendimento de enzimas da matriz sob condições sub-ótimas.

#### 3.4.2.4 Conjugação por afinidade entre ligantes

No método que envolve a conjugação por afinidade entre ligantes, a ligação da enzima à matriz se dá pela utilização de ligantes específicos. Em alguns casos, os ligantes estão naturalmente presentes na enzima, enquanto que em outros casos são ligados artificialmente.

Este método de imobilização conduz a mudanças mínimas na conformação da enzima, com alta estabilidade e eficiência catalítica da enzima imobilizada devido ao não envolvimento de resíduos do sítio ativo e maior eficiência de imobilização devido à presença de altas densidades de ligantes na matriz. As enzimas imobilizadas por este método encontram diversas aplicações em biotecnologia, diagnóstico e medicina.

### 3.5 Imobilização de enzimas em membranas

Segundo Palai e Bhattcharya (2013) a enzima pode ser imobilizada na superfície da membrana por inclusão, gelificação, adsorção física, ligação iônica ou covalente, ou por ligação cruzada. O método de adsorção possui a melhor oportunidade de reuso do suporte, mas pode haver perda de enzimas.

As propriedades superficiais de uma membrana podem ser alteradas, por exemplo, para reduzir a adsorção ou introduzir grupos específicos que podem ser utilizados para melhorar a afinidade das membranas. A modificação também pode ser usada como um método para alterar as propriedades de separação de um material (MULDER, 1996).

As membranas têm várias vantagens na imobilização enzimática, como a ausência de limitações de transferência de massa e a ampliação conveniente pela adaptação da área de superfície da membrana disponível. Além disso, um certo nível de separação do produto também é alcançado juntamente com a conversão biocatalítica em biorreatores enzimáticos com membrana (EBRAHIMI *et al.*, 2010). Normalmente, as separações de membrana têm a vantagem de exigir apenas uma quantidade limitada de energia, porque não há mudança de fase envolvida em tais processos (JOCHEMS *et al.*, 2011). Há também, segundo Rios *et al.*, 2004 apud Palai *et al.*, 2014, algumas limitações no uso de membranas para imobilização enzimática, como por exemplo, *fouling* (incrustações).

Na Figura 3.7 é exemplificada a extensa diversidade de membranas utilizadas para imobilização da  $\beta$ -galactosidase encontradas na literatura.

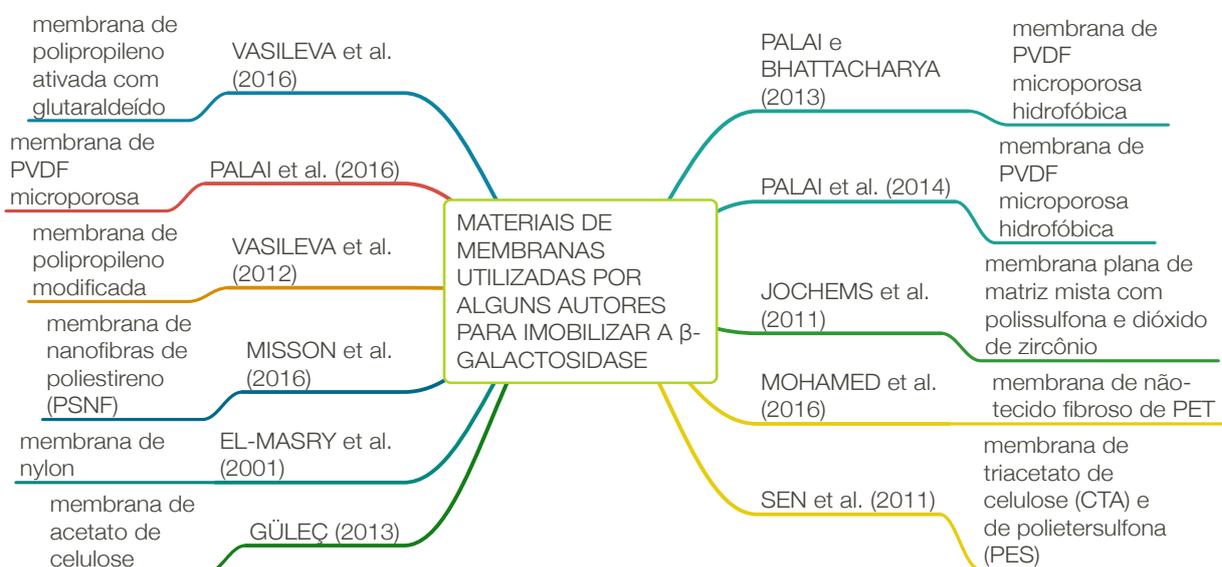


Figura 3.7 – Materiais das membranas utilizadas para imobilização da  $\beta$ -galactosidase.

## 4 METODOLOGIA

No presente estudo foi realizada uma revisão de literatura para identificar pesquisas que utilizaram membranas como suporte para imobilização da enzima lactase, bem como avaliar as técnicas e parâmetros ótimos utilizados para esta imobilização.

A busca bibliográfica foi realizada em setembro e outubro de 2017, nas bases de dados Science Direct, Scopus e Scielo e nas bibliotecas eletrônicas Periódicos Capes e Google Acadêmico. Foi utilizada como estratégia de busca a combinação dos seguintes descritores nos idiomas português e inglês: imobilização de enzimas, galactosidase, lactase, lactose, membranas, hidrólise de lactose e hidrólise enzimática. Foram incluídos no estudo artigos disponíveis na íntegra, publicados em português ou inglês, a partir de 2010.

Inicialmente foi identificado um grande número de artigos nas bases de dados (Tabela 1). Foi realizada uma seleção a partir da leitura de título e resumo. Foram selecionadas as publicações que trataram do uso de membranas para imobilização da  $\beta$ -galactosidase para hidrólise da lactose e artigos que utilizaram membranas para imobilização dessa enzima para outros fins.

Tabela 1 – Síntese da busca inicial nas bases de dados e bibliotecas eletrônicas.

DESCRITORES	BASE DE DADOS				
	Google Scholar	Science Direct	Scopus	Capes	Scielo
imobilização de enzimas	1.030	6.042	7.014	61	43
“imobilização de enzimas” lactose	184	436	101	3	1
“imobilização de enzimas” membranas	658	2863	782	1	0
hidrólise lactose membrana	4.140	3.547	58	10	2
galactosidase	40.900	19.795	11.038	185.646	98
hidrólise enzimas lactase	4.000	784	66	6	0

A partir dos artigos incluídos nesta revisão foi realizada a análise e a integração das informações obtidas. Além disso, buscou-se também algumas referências citadas nestes artigos para aprofundar o assunto tratado.

## 5 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir é apresentada a Tabela 2 com os estudos encontrados que utilizaram membranas como forma de imobilização da  $\beta$ -galactosidase para hidrólise de lactose. Estão resumidos os objetivos do estudo, o método de imobilização, o material do suporte utilizado e os resultados obtidos.

Tabela 2 – Estudos que utilizaram membranas para imobilização da  $\beta$ -galactosidase para hidrólise da lactose.

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
1	Modificar e caracterizar os nanotubos de carbono de paredes múltiplas para imobilizar a $\beta$ -galactosidase e comparar a hidrólise da lactose em enzimas imobilizadas e livres.	Ligação química covalente	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> 21000 U/g (Unidades de ONPG/min <sup>-1</sup> )	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (tamanho de partícula 50 a 60 nm; folhas de grafita cilíndricas de diâmetro até 100 nm) funcionalizados com glutaraldeído.	Parâmetros ótimos encontrados: pH 7,0 para ambas imobilizadas e livres; temperatura 40 °C para livres e 50 °C para imobilizadas. Maior retenção da atividade para imobilizadas (89% da atividade inicial após 6 usos); aumento gradual e constante da hidrólise de lactose para imobilizadas com o tempo e diminuição rápida para livres.	ANSARI <i>et al.</i> (2013)
2	Sintetizar e modificar a superfície de nanodiamantes com glutaraldeído para imobilização da $\beta$ -galactosidase e comparar a estabilidade e a atividade com as enzimas livres.	Ligação cruzada	$\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> (8500 U/g)	Nanodiamantes (nanopartículas de carbono com arquitetura octaédrica; 20 nm) funcionalizados com glutaraldeído.	Parâmetros ótimos encontrados: pH 4,5 para ambas imobilizadas e livres e maior estabilidade da atividade com o pH para imobilizadas; temperatura 50 °C para ambas. Maior retenção de atividade para imobilizadas (87% atividade inicial após 5 usos); aumento gradual e constante da hidrólise da lactose para imobilizadas com o tempo e diminuição rápida para livres.	ANSARI <i>et al.</i> (2015)

Tabela 2 – Continuação

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
3	Imobilizar a $\beta$ -galactosidase por ligação química covalente e comparar os parâmetros das enzimas imobilizadas com as enzimas livres.	Ligação química covalente (adsorção química).	$\beta$ -galactosidase de <i>Escherichia coli</i> 300 U/mg (Unidades de ONPG/mg de proteína).	Membrana de poli(2-hidroxietilmetacrilato)	Parâmetros ótimos encontrados: pH 7,5 para ambas imobilizadas e livres; temperatura 50 °C para livre e 55 °C para a adsorvida. Maior retenção de atividade após 15 usos para as imobilizadas: 95% da atividade inicial e 50% para livres. A capacidade de armazenamento aumentou com a imobilização. Após 7 dias, a atividade relativa foi de 80% para adsorvida, frente a 50% para livre.	BARAN <i>et al.</i> (1997)
4	Estimar a capacidade de imobilização da enzima em condições ótimas de concentração de enzima, temperatura, tempo de contato e pH e comparar com a enzima livre para observar os impactos significantes da imobilização.	Adsorção direta na membrana por submersão.	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (75000 $\mu\text{mol ONPG min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	Membrana plana de matriz mista de polisulfona contendo dióxido de zircônio preparada por inversão de fases (espessura 500 $\mu\text{m}$ , permeabilidade de água 296 L/h.m <sup>2</sup> e 13,8 kDa de MMC)	Parâmetros ótimos encontrados: pH 7,0; temperatura 25 °C; diluição 50 vezes; tempo de contato 60 minutos. Maior retenção da atividade após 7 dias para imobilizadas (60% da atividade inicial) que para livres (46%).	JOCHEMS <i>et al.</i> (2011)
5	Desenvolver um método efetivo de imobilização da $\beta$ -galactosidase.	Ligação química covalente e ligação cruzada.	$\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> (24,67 U)	Nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com polianilina cobalto (tamanho de partícula 18 a 23 nm)	Parâmetros ótimos encontrados: pH 4,5 para enzimas livres, pH 5,0 para imobilizada por ligação cruzada e pH 6,0 para ligada covalentemente; temperatura 50 °C para ambas livres e imobilizadas. Maior resistência à desnaturação por temperatura para imobilizadas (46% e 78% da atividade inicial) frente a livres (5%). Maior retenção da atividade após 10 usos para imobilizadas por ligação cruzada (92% da atividade inicial) que para as adsorvidas por ligação química covalente (74%).	KHAN <i>et al.</i> (2017)

Tabela 2 – Continuação

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
6	Estudar a hidrólise da lactose de soro de leite deproteinado por imobilização da $\beta$ -galactosidase em membrana.	Ligação cruzada	$\beta$ -galactosidase	Membrana de polietersulfona (30 kDa; diâmetro 4,8 cm)	Maior retenção da atividade após 6 usos consecutivos para imobilizadas (90% da atividade inicial) e 5% menos perda por lixiviação.	SEN <i>et al.</i> (2016)
7	Desenvolver uma membrana funcionalizada para imobilizar a $\beta$ -galactosidase.	Ligação cruzada e Ligação química covalente.	$\beta$ -galactosidase isolada de <i>Escherichia coli</i> 151 U/mg.	Membrana de polipropileno funcionalizada (espessura 150 $\mu$ m, porosidade efetiva de 90% e tamanho médio de poro de 0,2 $\mu$ m)	Parâmetros ótimos encontrados: pH entre 6,8 e 7,4 para as imobilizadas e 7,1 para as livres; temperatura 40 a 43 °C para imobilizadas e 37 °C para livres; A 50 °C a atividade para imobilizadas foi 60% e para livres 10,7%. Maior atividade relativa (92,77%) obtida com membrana modificada por hexametilenodiamina. A capacidade de armazenamento aumentou com a imobilização. Após 300 dias, a atividade relativa se manteve em 90% da capacidade inicial, frente a 45% para a livre.	VASILEVA <i>et al.</i> (2012)
8	Otimizar as condições de hidrólise da lactose por $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada em um processo batelada. Estudar a estabilidade da enzima e encontrar as condições ótimas de hidrólise de soro de leite para um reator contínuo de membrana de fibra oca. Avaliar o reuso da enzima imobilizada em um módulo de membrana contínuo.	Ligação cruzada via glutaraldeído	$\beta$ -galactosidase isolada de <i>Escherichia coli</i> 151 U/mg (Unidades de ONPG/mg de proteína).	Membrana de polipropileno (espessura 150 $\mu$ m, porosidade efetiva de 90% e tamanho médio de poro de 0,2 $\mu$ m).	Parâmetros ótimos: Para imobilizadas: pH 6,8, temperatura 40 °C e 10 h. Para livres: pH 7,1, temperatura 37 °C. A hidrólise da lactose com a enzima imobilizada foi 60% mais eficaz que com enzimas livres e a estabilidade foi 2 vezes maior. Parâmetros ótimos da membrana para processo contínuo: 100 cm <sup>2</sup> e 1,0 mL/min. Após 10 h a hidrólise foi de 91%. A retenção da atividade enzimática após 20 ciclos foi de 70%.	VASILEVA <i>et al.</i> (2016)

A seguir é apresentada a Tabela 3 com os estudos encontrados que utilizaram membranas como forma de imobilização da  $\beta$ -galactosidase para outros fins, tais como produção de galactooligossacarídeos pela transgalactosação da lactose. Foram considerados esses estudos para fins de comparação da manutenção da atividade enzimática e da estabilidade da imobilização (retenção da enzima no suporte).

Tabela 3 – Estudos que utilizaram membranas para imobilização da  $\beta$ -galactosidase para outros objetivos.

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
1	Estudar a atividade de membranas de nylon funcionalizadas com butilmetacrilato para imobilizar a $\beta$ -galactosidase.	Ligação cruzada	$\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> (8,0 U/mg).	Membrana de nylon/poli-butilmetacrilato (espessura 150 $\mu$ m e tamanho de poro 0,2 $\mu$ m)	Parâmetros ótimos: pH 4,5 para ambas imobilizadas e livres, temperatura 45 a 51 °C para livres e 62 a 66 °C para imobilizadas.	EL-MASRY <i>et al.</i> (2001)
2	Desenvolver e estudar um método para imobilização de $\beta$ -galactosidase em membrana de cromatografia de troca iônica para síntese de galactooligossacarídeos.	Ligação química covalente	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (2000 U/g).	Membrana de polietersulfona (tamanho de poro 0,8 $\mu$ m) e membrana de celulose reforçada (tamanho de poro > 3 $\mu$ m)	Parâmetros ótimos: Temperatura 10 a 15 °C (maiores atividades enzimáticas). A conversão da lactose variou entre 53 e 82% dependendo do fluxo pela membrana.	ENGEL <i>et al.</i> (2007)
3	Desenvolver um método efetivo de imobilização da $\beta$ -galactosidase em membranas de acetato de celulose funcionalizadas.	Adsorção direta (ligação química covalente)	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> .	Membrana plana assimétrica de ultrafiltração de acetato de celulose (0,2 a 5,0 $\mu$ m)	Parâmetros ótimos: pH 7,0, temperatura 25 °C. Retenção de atividade: 90% após 5 ciclos para a membrana de acetato de celulose com polietilenoimina (0,01-0,02 mg/mL).	GÜLEÇ (2013)

Tabela 3 – Continuação

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
4	Imobilizar a $\beta$ -galactosidase em uma membrana de nanofibras de poliestireno funcionalizada por oxidação superficial.	Adsorção (ligação química covalente)	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> .	Membrana de nanofibras de poliestireno (PSNF) fabricadas por eletrospinning.	Ganho de formação de GOS: 28% para imobilizadas e 9% livres após 1 h, mas a conversão de lactose foi de 86% para livres frente a 41% para imobilizadas.	MISSION <i>et al.</i> (2016)
5	Estudar a imobilizar da $\beta$ -galactosidase em uma membrana de UF funcionalizada com polietilenoimina (PEI) ou com glutaraldeído em um biorreator de membranas.	Ligação química covalente e ligação cruzada.	$\beta$ -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> .	Membrana plana de ultrafiltração de polietersulfona (MMC de 1,0 kDa)	Parâmetros ótimos para formação de galactooligossacarídeos: temperatura 45 °C, 0,045 M substrato, 25 mL/h alimentação.	NATH <i>et al.</i> (2013)
6	Imobilizar a $\beta$ -galactosidase em uma membrana de PVDF para conversão da lactose em GOS e investigar a influência da concentração de lactose na formação de GOS. Além disso, foi feito o estudo cinético do mecanismo da reação e avaliar a vida útil da membrana.	Ligação cruzada na membrana de PVDF tratada com solução aquosa de glutaraldeído 4% (v/v) para melhorar a capacidade de ligação covalente.	$\beta$ -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> (1,2 U/mg).	Membrana hidrofóbica microporosa de PVDF (tamanho de poro de 0,22 $\mu$ m, espessura de 125 $\mu$ m, diâmetro 0,047 m, porosidade de 75% e permeabilidade de água 9000 L/h.m <sup>2</sup> ).	A máxima formação de GOS observada foi de 28% a concentração inicial de lactose de 200 g/L e concentração de enzima de 12000 kU/L. Foi observado que a formação máxima de GOS aumentou com o aumento da concentração inicial de lactose. Os testes na membrana mostraram um aumento na resistência da membrana com a repetição da imobilização e a atividade da enzima se reduziu para 57% do valor inicial após a segunda imobilização.	PALAI; BHATTACHARYA (2013)

Tabela 3 – Continuação

Item	Objetivo do Estudo	Método de Imobilização	Enzima utilizada	Material do Suporte	Resultados	Ref. (ano)
7	Investigar e avaliar a cinética de formação de galactooligossacarídeos (GOS) com alimentação e recirculação parcial a partir de uma solução de lactose. Estudos foram realizados para observar o efeito da concentração de lactose e da taxa de alimentação na formação de GOS.	Ligação cruzada	$\beta$ -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> grau comercial (1,2 Units ONPG/mg de pó enzima a 40 °C e pH 6,0 em 1 minuto).	Membrana de PVDF microporosa hidrofóbica (tamanho de poro 0,22 $\mu$ m, diâmetro 0,047 m, espessura 125 $\mu$ m, porosidade de 75% e permeabilidade de água 9000 L/h.m <sup>2</sup> ).	Máxima formação de GOS: 30% após 60 h, conc. lactose inicial 50 g/L, 0,5 mL/min de taxa de alimentação e 1,5 mL/min de taxa de recirculação a 40 °C. Foi observado que a seletividade para GOS aumentou e que houve uma leve redução na produção de GOS com o aumento da concentração inicial de lactose. Após 30 dias, a atividade enzimática relativa foi de 50% inicial para imobilizadas frente a 100% de perda para a livre após 21 dias. O modelo cinético desenvolvido mostrou muito boa concordância com os resultados simulados mesmo a baixas concentrações de lactose.	PALAI <i>et al.</i> (2014)
8	Imobilizar a enzima $\beta$ -galactosidase em uma membrana e utilizar polímeros inteligentes para bioconjugação enzimática.	Ligação cruzada	$\beta$ -galactosidase	Membrana de PVDF microporosa hidrofóbica (tamanho de poro 0,22 $\mu$ m, diâmetro 0,047 m).	Parâmetros ótimos para o bioconjugado poli-n-isopropilacrilamida pH 5 para imobilizadas e pH 6 para livres, temperatura 60 °C. Estabilidade ao armazenamento: Após 30 dias a atividade residual foi de 70% para imobilizada e perda da atividade para livres após 20 dias. Após 10 usos consecutivos ainda era possível um produzir um ganho de 10% de galactooligossacarídeos.	PALAI <i>et al.</i> (2016)

## 6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES

De modo geral, observa-se que as membranas podem ser utilizadas como um eficiente suporte de imobilização de enzimas.

A imobilização enzimática é alcançada por interações complexas entre a enzima e o suporte e, apesar de haver muitos estudos sobre imobilização enzimática (conforme apresentado na Tabela 1), verificou-se que as interações entre a enzima e a membrana ainda são pouco entendidas e cada sistema necessita sua própria otimização de parâmetros.

Durante a imobilização enzimática ocorre uma modificação do microambiente devido a variadas interações das matrizes com os substratos e produtos de acordo com suas propriedades físico-químicas. Observa-se que a imobilização causa uma melhora significativa nas propriedades da  $\beta$ -galactosidase, como a estabilidade a um alto ou baixo pH e maior temperatura mantendo a atividade.

Dentre os autores pesquisados que utilizaram membranas como suporte de imobilização da  $\beta$ -galactosidase para hidrólise da lactose (Tabela 2), a maioria comparou parâmetros das enzimas livres e imobilizadas, tais como pH, temperatura, retenção da atividade enzimática, estabilidade ao armazenamento, e observaram ganhos expressivos em todos os parâmetros para enzimas imobilizadas frente às enzimas livres.

### 6.1 Parâmetros ótimos: pH

Dependendo da natureza e das cargas na superfície do suporte e da fonte da enzima, o pH ótimo é alterado para as enzimas livres ou imobilizadas (KHAN *et al.*, 2017). Ainda, segundo Vasileva *et al.* (2012), o pH ótimo de imobilização da enzima depende do tipo de ligante, do método de ativação da membrana, do método de imobilização enzimática. O pH ótimo pode ser mantido ou deslocado para uma região mais alcalina ou mais ácida em relação às enzimas livres e a mudança observada no perfil das curvas do pH ótimo ocorre pela distribuição desigual de cargas no microambiente da enzima imobilizada. Esta modificação pode ocorrer pela introdução de cargas positivas, por exemplo, grupos carboxílicos (deslocamento para lado alcalino) ou por cargas negativas, como grupos amínicos (deslocamento para o lado ácido).

Pode-se observar, pelo estudo de El-Masry *et al.* (2001), que para as enzimas imobilizadas o perfil de dependência do pH pela atividade é maior do que o da enzima livre, ou seja, o range de pH ótimo (atividade enzimática relativa maior que 95%) foi maior para enzimas imobilizadas que para livres, o que garante ao biocatalisador maior proteção contra agentes desnaturantes.

## **6.2 Parâmetros ótimos: temperatura**

A partir dos estudos analisados observa-se, também, que ocorre mudança na temperatura ideal para enzimas imobilizadas para temperaturas mais elevadas. Segundo Dwevedi (2016), a desnaturação da enzima é menos observada devido à proteção de aminoácidos no sítio ativo, bem como na superfície, enquanto a conversão do substrato continua em temperaturas maiores. A extensão do deslocamento ótimo da temperatura para as enzimas imobilizadas depende do tipo de matriz, bem como das interações entre as enzimas e a matriz.

Nos estudos de El-Masry *et al.* (2001) também foi observada essa mudança para temperaturas mais elevadas, o que indica que o processo de imobilização fornece maior resistência contra inativações térmicas e preserva a estrutura ativa do biocatalisador se comparado com o uso na forma livre.

## **6.3 Parâmetros ótimos: estabilidade enzimática e ensaios de reutilização**

A estabilidade das enzimas imobilizadas pode aumentar ou diminuir dependendo do tipo de matriz e pela interação entre a enzima e a matriz. Para que seja observada uma boa estabilidade é necessário avaliar o suporte de imobilização, as condições de imobilização e a rigidez das ligações multipontuais.

O ensaio de reutilização proporciona o cálculo efetivo do custo para o uso e a viabilidade econômica nos processos de catálise enzimática (KHAN *et al.*, 2017). Segundo Sen *et al.* (2016), apesar do alto valor inicial esperado na técnica de imobilização e na fabricação da membrana, o custo será reduzido em função da reutilização do biocatalisador. Para Vasileva *et al.* (2012), a atividade catalítica e a estabilidade estão entre as características mais importantes das enzimas e, em alguns casos, são consideravelmente maiores para diferentes efeitos físico-químicos em comparação com as enzimas livres.

## 6.4 Comparação dos resultados

Comparando-se os estudos apresentados na Tabela 2 e na Tabela 3 em relação à reutilização e à estabilidade enzimática, observa-se que há um ganho significativo para as enzimas imobilizadas frente às enzimas livres. Vale ressaltar que, nos estudos apresentados na Tabela 3, não foram utilizadas membranas para hidrolisar a lactose, mas para formar galactooligossacarídeos.

Na Tabela 4 estão apresentados diversos estudos salientando os sistemas ótimos com enzimas imobilizadas estudados pelos autores. Além disso, estão demonstrados os resultados quanto à manutenção da atividade enzimática pelo reuso em ciclos e quanto à retenção da atividade enzimática ao armazenamento.

Tabela 4 – Resultados dos sistemas ótimos estudados por diferentes autores.

Ref. (ano)	Sistema ótimo estudado pelo autor	Manutenção da atividade pelo reuso	Retenção da atividade ao armazenamento
ANSARI et al. (2013)	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; Ligação química covalente; $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> ; pH 7,0; temperatura 50 °C.	Após 6 usos manteve 89% da atividade inicial.	-
ANSARI et al. (2015)	Nanopartículas de carbono; Ligação cruzada com glutaraldeído; $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> ; pH 4,5; temperatura 50 °C.	Após 5 usos manteve 87% da atividade inicial.	-
BARAN et al. (1997)	Membrana de poli(2-hidroxietilmetacrilato); Ligação química covalente; $\beta$ -galactosidase de <i>Escherichia coli</i> ; pH 7,5; temperatura 50-55 °C.	Após 15 usos manteve 95% da atividade inicial.	Após 7 dias a atividade relativa foi de 80% da atividade inicial.
JOCHEMS et al. (2011)	Membrana plana de matriz mista de polisulfona com dióxido de zircônio; Adsorção direta; $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> ; pH 7,0; temperatura 25 °C; tempo de contato 1 h.	-	Após 7 dias a atividade relativa foi de 60% da atividade inicial.
KHAN et al. (2017)	Nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com polianilina cobalto; Ligação química covalente e ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> ; pH 5,0 (ligação cruzada) e pH 6,0 (ligação química covalente); temperatura 50 °C.	Após 10 usos manteve 92% da atividade inicial (ligação cruzada) e 74% (ligação química covalente)	-
SEN et al. (2016)	Membrana de polietersulfona funcionalizada com glutaraldeído; Ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase;	Após 6 usos manteve 90% da atividade inicial.	-
VASILEVA et al. (2012)	Membrana de polipropileno funcionalizada com hexametilenodiamina; Ligação cruzada e Ligação química covalente; $\beta$ -galactosidase isolada de <i>Escherichia coli</i> ; pH entre 6,8 e 7,4; temperatura 40 a 43 °C.	-	Após 300 dias a atividade foi de 90% da atividade inicial.

Tabela 4 – Continuação

Ref. (ano)	Sistema ótimo estudado pelo autor	Manutenção da atividade pelo reuso	Retenção da atividade ao armazenamento
VASILEVA et al. (2016)	Membrana de polipropileno funcionalizada com glutaraldeído; Ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase isolada de <i>Escherichia coli</i> ; pH 6,8; temperatura 40 °C; tempo de contato 10 h.	Após 20 usos manteve 70% da atividade inicial.	-
GÜLEÇ (2013)	Membrana plana assimétrica de ultrafiltração de acetato de celulose funcionalizada com polietilenoimina; Ligação química covalente; $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> ; pH 7,0; temperatura 25 °C.	Após 5 usos manteve 90% da atividade inicial.	
PALAI, BHATTACHARYA (2013)	Membrana hidrofóbica microporosa de polifluoreto de vinilideno (PVDF) funcionalizada com glutaraldeído; Ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> ;	-	-
PALAI et al. (2014)	Membrana hidrofóbica microporosa de polifluoreto de vinilideno (PVDF); Ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> ;	-	Após 30 dias a atividade relativa foi de 50% da atividade inicial.
PALAI et al. (2016)	Membrana hidrofóbica microporosa de polifluoreto de vinilideno (PVDF) com polímeros inteligentes para bioconjugação; Ligação cruzada; $\beta$ -galactosidase; pH 5; temperatura 60 °C.	Após 10 usos consecutivos ainda era possível um produzir um ganho de 10% de galactooligossacarídeos.	Após 30 dias a atividade foi de 70% da atividade inicial.

Pela análise dos dados apresentados na Tabela 4, percebe-se que as técnicas de ligação química covalente ou de ligação cruzada com glutaraldeído foram bastante utilizadas. Segundo Khan *et al.* (2017), o glutaraldeído é o reagente mais utilizado para modificação da estrutura das enzimas e do suporte. Ele interage com o grupo amino primário da enzima e faz uma ligação cruzada intermolecular entre as moléculas da enzima e do suporte. Além disso, em relação ao reagente utilizado para funcionalizar o suporte, é esperado que seja utilizado o de menor impacto ambiental e que sejam necessárias menos etapas para esta funcionalização.

Dentre os materiais utilizados pelos diferentes estudos, destaca-se o trabalho de Khan *et al.* (2017), em que foram utilizados nanotubos de carbono. Os autores alegam que esses materiais têm sido pesquisados para uso como suporte devido às excelentes propriedades elétricas e mecânicas. Nanotubos de carbono também foram utilizados nos estudos de Ansari *et al.* (2013) para imobilização da  $\beta$ -galactosidase. Ambos os autores obtiveram melhores resultados para as enzimas nas formas imobilizada frente às enzimas livres.

Em relação à retenção da atividade enzimática pelo reuso, Baran *et al.* (1997) e Khan *et al.* (2017) obtiveram os melhores resultados em comparação com os demais, mesmo utilizando sistemas diferentes.

Em relação à retenção da atividade enzimática pelo armazenamento, após 300 dias, Vasileva *et al.* (2012) conseguiram resultados expressivos, mantendo 90% da atividade inicial utilizando uma membrana de polipropileno funcionalizada com hexametilenodiamina. Os autores ainda esclarecem que a membrana hidrofóbica de polipropileno é adequada para a imobilização de enzimas e para hidrólise de soro do leite devido a esse material possuir baixa adsorção de proteínas e, desta forma, resultar em baixo *fouling* (incrustação) na membrana.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizada uma revisão de literatura para estudar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase em membranas para hidrólise da lactose.

Embora seja difícil fazer a comparação direta dos estudos em função de haver diferentes materiais de membranas e reagentes utilizados para funcionalizá-las, os resultados convergiram para obtenção de parâmetros ótimos para enzimas imobilizadas frente às enzimas livres.

Quanto à possível reutilização das enzimas em mais ciclos de hidrólise, o sistema que utilizou a membrana de poli(2-hidroxietilmetacrilato) como suporte de imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* por ligação química covalente e pH e temperatura ótimos, 7,5 e 50 °C manteve 95% de retenção da atividade após 15 ciclos de reuso. Para o sistema com o nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com polianilina cobalto como suporte de imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por ligação cruzada em pH 5,0 e temperatura 50 °C, foi obtida 92% de retenção da atividade após 10 ciclos de reuso. Conclui-se que, apesar dos sistemas possuírem condições diferentes de imobilização enzimática, os resultados foram satisfatórios para ambos.

Quanto à retenção da atividade enzimática com o armazenamento, o sistema que utilizou a membrana de polipropileno funcionalizada com hexametilenodiamina como suporte de imobilização da  $\beta$ -galactosidase isolada de *Escherichia coli* por ligação cruzada em pH entre 6,8 e 7,4 e temperatura entre 40 a 43 °C, manteve 90% da atividade enzimática inicial após 300 dias.

Finalmente, acredita-se que a partir deste estudo será possível referenciar futuros trabalhos para a escolha de um sistema de parâmetros ótimos para hidrólise de lactose pela  $\beta$ -galactosidase imobilizada em membranas. Adicionalmente, estabelecer critérios com base nos resultados da pesquisa para o uso em biorreatores de membranas.

## 8 REFERÊNCIAS

ANSARI, S. A., SATAR, R., CHIBBER, S., KHAN, M. J. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 258-263, 2013.

ANSARI, S. A., SATAR, R., ZAIDI, S. K., NASEER, M. I., KARIM, S., ALQAHTANI, M. H., RASOOL, M. Nanodiamonds as an effective and novel matrix for immobilizing  $\beta$ -galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 298-303, 2015.

BARAN, T., ARICA, M. Y., DENIZLI, A., HASIRCI, V. Comparison of  $\beta$ -galactosidase Immobilization by Entrapment in and Adsorption on Poly (2-hydroxyethylmethacrylate) Membranes. **Polymer International**, v. 44, p. 530-536, 1997.

DWEVEDI, A. **Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment**. Springer, 2016.

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

EL-MASRY, M. M., DE MAIO, A., PORTACCIO, M., DI MARTINO, S., BENCIVENGA, U., ROSSI, S., GAETA, F. S., MITA, D. G. Isothermal and non-isothermal characterization of catalytic nylon membranes chemically grafted: dependence on the grafting percentage. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 773-784, 2001.

ENGEL, L., SCHNEIDER, P., EBRAHIMI, M., CZERMAK, P. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in Adsorptive Membranes for the Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose. **The Open Food Science Journal**, v. 1, p. 17-23, 2007.

GIACOMINI, C., VILLARINO, A., FRANCO-FRAGUAS, L., BATISTA-VIERA, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 4, p. 313-327, 1998.

GÜLEÇ, H. A. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 83-90, 2013.

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

KHAN, M., HUSAIN, Q., BUSHRA, R. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 693-701, 2017.

MARIOTTI, M. P., YAMANAKA, H., ARAUJO, A. R., TREVISAN, H. C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized  $\beta$ -Galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n. 6, p. 1233-1240, 2008.

MISSION, M., DAI, S., JIN, B., CHEN, B. H., ZHANG, H. Manipulation of nanofiber-based  $\beta$ -galactosidase nanoenvironment for enhancement of galacto-oligosaccharide production. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 56-64, 2016.

MOHAMED, A., NEMESHWAREE, B., BRIGITTE, M., ANNE, P., KALIM, B., PASCAL, D., ANNE-SOPHIE, M., RÉNATO, F. Activity of enzymes immobilized on plasma treated polyester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 261-272, 2016.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Kluwer Academic Publishers, 1996.

NATH, A., BHATTACHARJEE, C., CHOWDHURY, R. Synthesis and separation of galacto-oligosaccharides using membrane bioreactor. **Desalination**, v. 316, p. 31-41, 2013.

PALAI, T., BHATTACHARYA, P. Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 668-673, 2013.

PALAI, T., SINGH, A. K., BHATTACHARYA, P. K. Enzyme,  $\beta$ -galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: Kinetic study with feed flow under recirculation loop. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 68-76, 2014.

PALAI, T., KUMAR, A., BHATTACHARYA, P. K. Enzyme immobilization/bioconjugation in producing galactio-oligosaccharidies from lactose: developments of kinetic models and bio-reactors. **Materials Today: Proceedings 3**, p. 3568-3586, 2016.

PEREIRA, M. C. S., BRUMANO, L. P., KAMIYAMA, C. M., PEREIRA, J. P. F., RODARTE, M. P., PINTO, M. A. O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 67, n. 389, p. 57-65, 2012.

RICANATA. Loja virtual para laticínios. Disponível em: <https://www.ricanata.com.br/lactase#.Wk-nbiMWpmA>. Acesso em: 05 jan. 2018.

RIOS, G. M., BELLEVILLE, M. P., PAOLUCCI, D., SANCHEZ, J. Progress in enzymatic membrane reactors: a review. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p. 189-196, 2004.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. Volume II. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SEN, D., SARKAR, A., GOSLING, A., GRAS, S. L., STEVENS, G. W., KENTISH, S. E., BHATTACHARYA, P. K., BARBER, A. R., BHATTACHARJEE, C. Feasibility study of enzyme immobilization on polymeric membrane: A case study with

enzymatically galacto-oligosacharides production from lactose. **Journal of Membrane Science**, v. 378, p. 471-478, 2011.

SEN, P., CHOUDHURY, N., DUTTA, M., BHATTACHARYA, R. Studies on hydrolysis of skimmed milk using immobilized  $\beta$ -galactosidase in a membrane reactor. **Materials Today: Proceedings 3**, p. 3403-3417, 2016.

VAPORTEC. Tecnologia Industrial. Ultrafiltração e osmose reversa na indústria alimentícia. 2016. Disponível em: <<http://www.vaportec.com.br/ind/2016/07/12/ultrafiltracao-e-osmose-reversa-na-industria-alimenticia/>>. Acesso em: 03 jan. 2018.

VASILEVA, N., IOTOV, V., IVANOV, Y., GODJEVARGOVA, T., KOTIA, N. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on modified polypropilene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p.710-719, 2012.

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