

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Produção contínua de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase
imobilizada em esferas de quitosana entrecruzada com genipina**

Fernanda Dias Cardoso

**Porto Alegre
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Produção contínua de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase
imobilizada em esferas de quitosana entrecruzada com genipina**

Fernanda Dias Cardoso

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para obtenção do Título de
Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Coorientador: Mestre Elí Emanuel Esparza Flores

**Porto Alegre
2022**

Trabalho de Conclusão de Curso

Produção contínua de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase
imobilizada em esferas de quitosana entrecruzada com genipina

Fernanda Dias Cardoso

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Manuela Poletto Klein
Doutora da Engenharia de Alimentos
UFCSPA

Lucas Dal Magro
Doutor em Ciência e Tecnologia de
Alimentos
ICTA/UFRGS

Plinho Francisco Hertz
Doutor em Ciência de Alimentos
ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Plinho Francisco Hertz, pela oportunidade de conhecer a pesquisa, pelos ensinamentos e a acolhida em seu laboratório desde o início da minha graduação.

Agradecimento em especial ao meu co-orientador Elí Emanuel Esparza Flores, pela ajuda, pela amizade construída nesse tempo, pelas conversas e toda a construção pessoal e profissional que tivemos nesses longos anos.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, pelos bons momentos compartilhados e o apoio nas análises.

Aos amigos que ganhei durante a minha graduação, em especial as minhas amigas que fizeram da minha estadia em Porto Alegre ser incrível. Obrigada por compartilhar os momentos mais difíceis e felizes comigo.

A esta Universidade, que tenho tanto orgulho de fazer parte.

À minha família, meus pais, Fátima e Claudio, minha irmã Jéssica e minhas avós Regina e Orlanda, pelo apoio em todas as minhas escolhas, compreensão nas faltas e carinho em todos os momentos. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Obrigada por apostarem em mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

RESUMO

A atratividade da produção de galacto-oligossacarídeos (GOS) para aplicar em alimentos se dá principalmente pela sua função prebiótica, estimulando seletivamente os microrganismos probióticos. Além disso, auxilia na saúde e pode ser aplicado em fórmulas lácteas infantis que substituem o leite materno. Uma forma de sintetizar GOS é por meio de enzimas, proteínas muito importantes na indústria de alimentos. A enzima β -galactosidase em presença de solução concentrada de lactose é capaz de produzir GOS através da reação de transgalactosilação. Para viabilizar o processo, a imobilização de enzimas se destaca como uma forma de aprimorar o método, uma vez que apresenta várias vantagens como a possibilidade de recuperação da enzima e sua reutilização. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção contínua em reator de leito fixo a partir de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de quitosana reticulada com genipina. Para a imobilização da β -galactosidase, esferas de quitosana foram entrecruzadas com genipina em uma concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ por 1 h a 60°C e, posteriormente, colocadas em contato com uma solução enzimática com 10 U mL^{-1} por 18 h. Para a verificação da atividade da enzima imobilizada, assim como os parâmetros de rendimento, eficiência do processo e atividade recuperada, foi utilizado como substrato o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) em uma reação de 3 min. A síntese de GOS em reator de leito fixo foi avaliada em dois sistemas diferentes, um utilizando esferas porosas e outro com esferas não porosas, a partir de uma solução de lactose com mesmo fluxo e concentração (300 g L^{-1}), e comparadas em relação ao tempo de residência, rendimento, produção de GOS e produtividade. A quantificação das concentrações dos produtos de reação foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A produção de GOS utilizando esferas porosas apresentou uma maior produtividade ($164,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em comparação com o sistema não poroso ($88,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Os dois reatores permaneceram em funcionamento por 25 dias e os dados demonstram a viabilidade da aplicação das esferas porosas para este tipo de bioprocessos.

Palavras-chave: Galacto-oligossacarídeos, Enzima imobilizada, β -galactosidase, Reator de leito fixo, Bioprocesso.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos funcionais dos prebióticos.	12
Figura 2: Rotas enzimáticas de conversão de lactose por β -galactosidase. A: baixa concentração de lactose (hidrólise); B: alta concentração de lactose (transgalactosilação)	13
Figura 3: Mecanismo de reação da formação de oligossacarídeos catalisada por β -galactosidase.	14
Figura 4: Esquema dos métodos de imobilização de enzima.....	16
Figura 5: Interação entre suporte e enzima.....	18
Figura 6: Estrutura da unidade monomérica da quitosana.	20
Figura 7: Estrutura molecular da genipina.....	21
Figura 8: Concentrações dos produtos de reação do reator com esferas porosas. ..	29
Figura 9: Concentrações dos produtos de reação do reator com esferas não porosas.	29
Figura 10: Percentual de rendimento da síntese de GOS no reator de esferas porosas.	30
Figura 11: Percentual de rendimento da síntese de GOS no reator de esferas não porosas.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de suportes quanto à composição química.....	18
Tabela 2: Determinação do fluxo do reator.	27
Tabela 3: Determinação da conversão de lactose em glicose de acordo com a velocidade da bomba.	27
Tabela 4: Dados referente a imobilização da β -galactosidase em esferas porosas e não porosas.....	28
Tabela 5: Dados de atividade enzimática, produtividade, rendimento e tempo de residência das esferas porosas e não porosas.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 PREBIÓTICOS.....	11
2.1.1 Galacto-oligossacarídeos	12
2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	15
2.2.1 Suporte para imobilização enzimática	17
2.2.2 Agente reticulante	20
2.2.3 Enzima β -galactosidase.....	21
2.3 REATORES ENZIMÁTICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 MATERIAIS.....	23
3.2 MÉTODOS.....	24
3.2.1 Produção do suporte de quitosana	24
3.2.2 Reticulação das esferas de quitosana	24
3.2.3 Imobilização da enzima β -galactosidase	24
3.2.4 Atividade da enzima imobilizada.....	25
3.2.5 Síntese de galacto-oligossacarídeos	25
3.2.6 Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)..	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Testes preliminares.....	26
4.2 Produção de galacto-oligossacarídeos	28
5 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde e o impacto dos alimentos no corpo e no ambiente têm crescido consideravelmente nos últimos tempos. A figura do alimento não está relacionada apenas a saciar a fome, mas também o quanto pode contribuir para o fornecimento de nutrientes e auxiliar na saúde. Os galacto-oligossacarídeos são exemplos de alimentos funcionais que estão diretamente relacionados com a saúde, uma vez que desempenham a função de prebiótico, ou seja, contribuem para o desenvolvimento dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal, proporcionando benefícios a saúde (Gibson et al., 2017; GIBSON & ROBERFROID, 1995). Esses ingredientes se destacam no ramo alimentício pois, além de trazerem vários benefícios para a saúde, apresentam propriedades que possibilitam a aplicação em fórmulas infantis usadas para complementar ou substituir o leite materno.

Os galacto-oligossacarídeos podem ser sintetizados a partir de enzimas, que são proteínas importantes na indústria de alimentos capazes de promover e acelerar reações químicas. A aplicação das enzimas na indústria em sua forma livre dificulta a recuperação e reutilização, tornando o processo mais oneroso. A imobilização enzimática tem potencial para reverter essa situação uma vez que permite a recuperação da enzima e a sua reutilização. Além disso, possibilita aumentar a estabilidade do biocatalisador, melhorar o controle da reação e o uso em reatores de biocatálise de fluxo contínuo. Neste trabalho, foi utilizada a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, enzima capaz de hidrolisar a lactose em glicose e galactose e, por reação de transgalactosilação, sintetizar galacto-oligossacarídeos.

Para a imobilização enzimática, diversos materiais podem ser utilizados como suporte, entre eles, a quitosana, substância que apresenta baixa toxicidade, é biocompatível, biodegradável, bacteriostática, versátil e, além disso, possui baixo valor agregado pois é obtida a partir do resíduo da indústria pesqueira. Para avaliar o desempenho do processo, alguns parâmetros podem ser variados, como a porosidade do suporte.

O método de ligação covalente para a imobilização da enzima requer a modificação da superfície por meio de um agente reticulante. A genipina é um dos agentes com maior destaque pois reage muito bem com proteínas, é um composto de origem natural (extraída da fruta jenipapo) e apresenta baixa toxicidade.

A partir disso e considerando o potencial dos galacto-oligossacarídeos na alimentação e na indústria de alimentos, o objetivo deste trabalho é estudar a produção contínua de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de quitosana reticulada com genipina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PREBIÓTICOS

O termo prebiótico pode ser definido como um componente alimentar não digerível que afeta de forma benéfica os microrganismos hospedeiros de maneira a estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de espécies de bactérias benéficas já residentes no cólon, conferindo benefícios a saúde (Gibson et al., 2017; Gibson & Roberfroid, 1995). Os prebióticos são capazes de estimular seletivamente microrganismos probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em detrimento a bactérias patogênicas, como as bactérias da classe *Clostridia* e *Escherichia coli* (Gibson et al., 2017).

Para ser considerado prebiótico, o componente precisa apresentar algumas características, como ser resistente ao pH ácido do estômago, não ser absorvido no trato gastrointestinal, ser fermentado pela microbiota intestinal e promover o crescimento e atividade das bactérias intestinais para melhorar a saúde do hospedeiro (Davani-Davari et al., 2019).

Os efeitos dos prebióticos na saúde humana são mediados por seus produtos de degradação por microrganismos. A partir da fermentação, ocorre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCS), incluindo ácido láctico, ácido butírico e ácido propiônico (Davani-Davari et al., 2019). Esses produtos têm diversos efeitos na saúde, alguns deles estão apresentados na Figura 1.

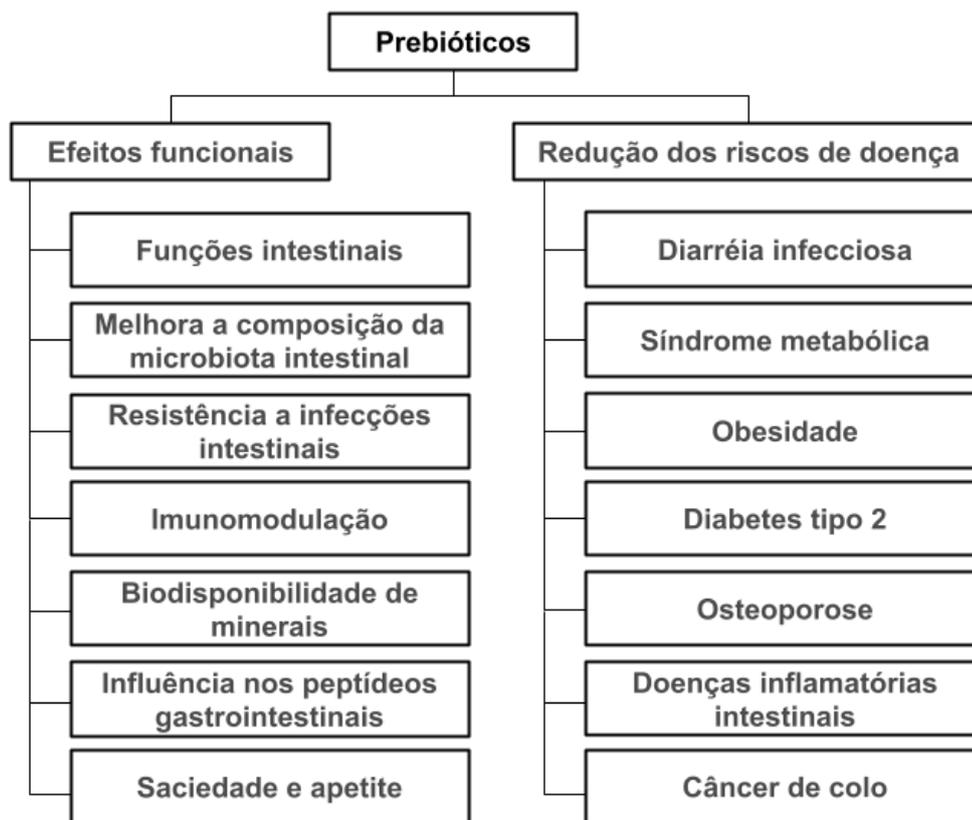


Figura 1: Efeitos funcionais dos prebióticos.

Fonte: Adaptado de Mollakhalili-Meybodi et al., 2021.

A maior parte dos compostos prebióticos são carboidratos não digeríveis formados por um subconjunto de grupos de carboidratos e são classificados de acordo com a quantidade de monômeros presentes em sua estrutura. Polissacarídeos apresentam mais de 10 monômeros, de 3 a 10 monômeros são chamados de oligossacarídeos e dissacarídeos apenas 2 monômeros (Manzoor et al., 2022). Ainda segundo Manzoor et al. (2022), os frutanos (fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina), os galactanos (galacto-oligossacarídeos (GOS)), a lactulose, os isomalto-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos (XOS) são exemplos de prebióticos.

2.1.1 Galacto-oligossacarídeos

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis, não hidrolisados por enzimas digestivas ou absorvidos no trato gastrointestinal e que favorecem seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no

cólon, como bifidobactérias e lactobacilos (Rodriguez-Colinas et al., 2013). São formados por moléculas de galactose contendo uma glicose terminal e a obtenção desses compostos se dão a partir lactase, enzima que favorece a reação de transgalactosilação, formando os GOS.

Alguns fatores são extremamente importantes para a produção de GOS, como a origem da enzima e a concentração de lactose inicial. Em altas concentrações a formação de GOS, pela reação de transgalactosilação, é favorecida, enquanto que em baixas concentrações é a hidrólise da lactose que prevalece. Esses fatores influenciam também em diferenças estruturais, tipos de ligações glicosídicas e rendimento do processo (Guerrero et al., 2015; Vera et al., 2016).

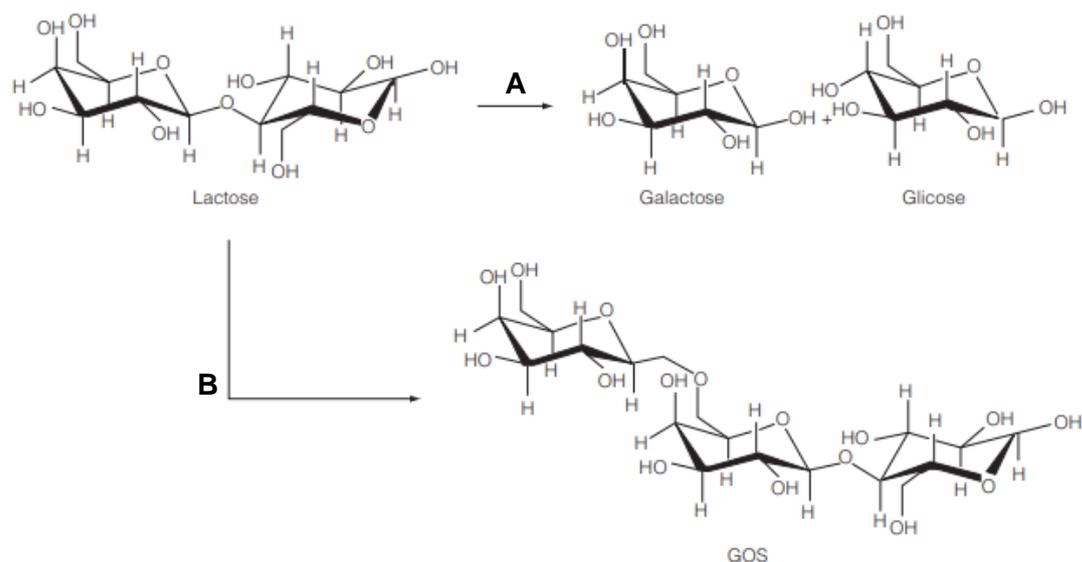


Figura 2: Rotas enzimáticas de conversão de lactose por β -galactosidase. A: baixa concentração de lactose (hidrólise); B: alta concentração de lactose (transgalactosilação).

Fonte: Martins, 2014.

O mecanismo bioquímico para a obtenção de GOS se dá da seguinte maneira: ocorre a formação do complexo enzima-galactosil e, paralelamente, a liberação da glicose. Em seguida, o complexo enzima-galactosil é transferido para um aceptor que contenha um grupo hidroxil. Nos casos de soluções com baixa concentração de lactose, a galactose é liberada porque a água é mais competitiva que outros açúcares e ela tem a função de ser o aceptor deste complexo. Já nas soluções com alta concentração de lactose, as moléculas de lactose e os mono, di e oligossacarídeos

atuam como aceptores do complexo enzima-galactosil, ocorrendo a formação do GOS (Fai & Pastore, 2015).

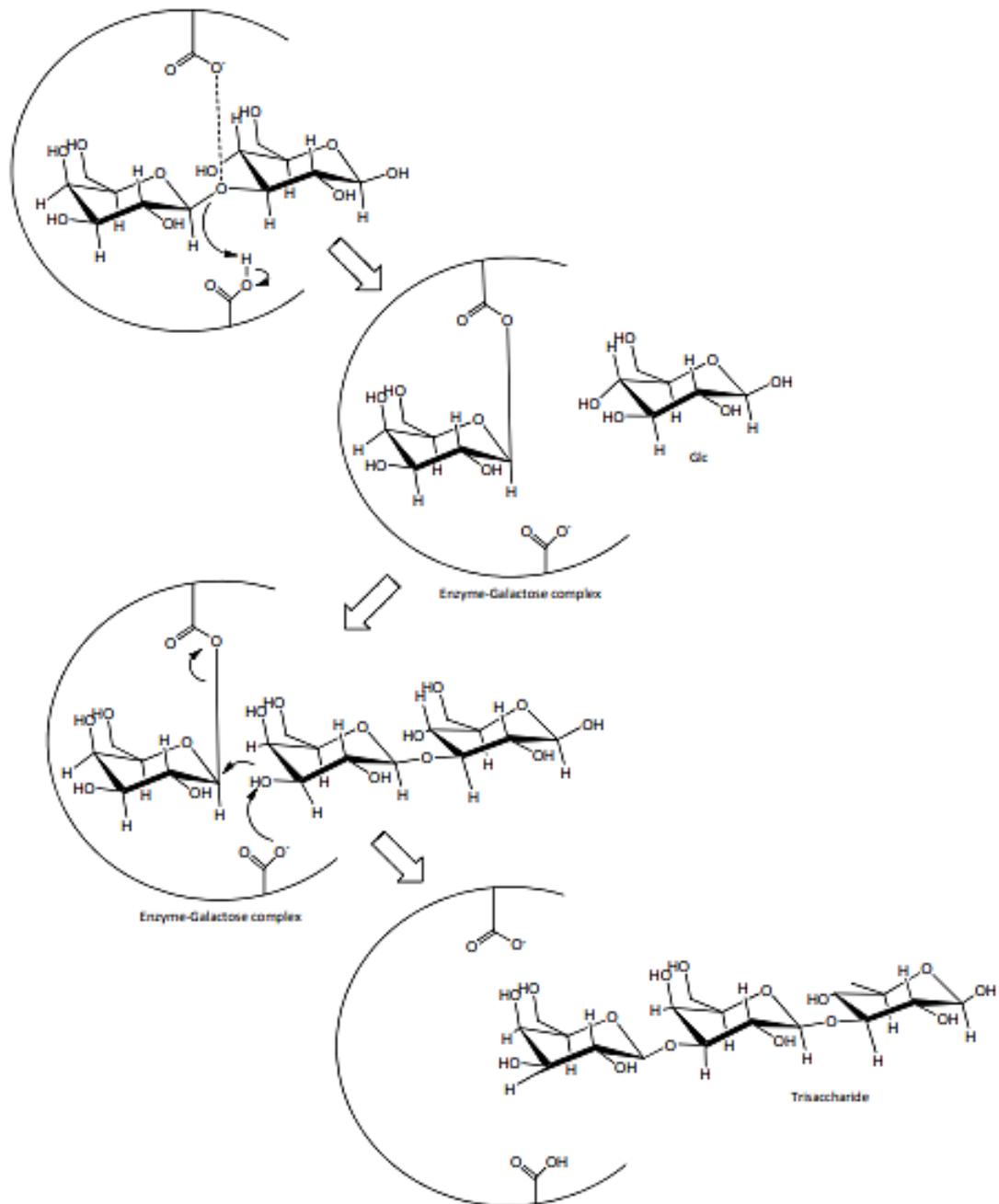


Figura 3: Mecanismo de reação da formação de oligossacarídeos catalisada por β -galactosidase.

Fonte: Benjamins, 2014.

A atratividade da produção de GOS para aplicar em alimentos se dá principalmente pela sua função prebiótica, auxiliando na saúde, mas, além disso, é um ingrediente que apresenta viabilidade para ser aplicado em fórmulas lácteas

infantis, substituindo o leite materno. O leite humano é composto por carboidratos, proteínas e glóbulos de gordura e, entre os carboidratos, estão os oligossacarídeos do leite humano (HMOs), sendo o terceiro componente sólido mais abundante do leite (Singh et al., 2022). Os HMOs são importantes para o desenvolvimento da microbiota intestinal e dos sistemas metabólico e imunológico do recém-nascido, que têm consequências para a saúde ao longo da vida (Gibson et al., 2017). Então, visto essa possibilidade, muitas empresas têm utilizado GOS como ingrediente nutritivo em formulações infantis como forma de substituir as funções que os HMOs apresentam no leite materno.

2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas são componentes importantes no metabolismo dos seres vivos, têm capacidade de promover e acelerar reações químicas e estão envolvidas em todos os processos bioquímicos nas células. Na indústria, o uso de enzimas tem sido cada vez mais relevante uma vez que são produtos naturais, não tóxicas, apresentam alta especificidade e seletivas, são versáteis e eficientes (Ricardi et al., 2021). Além disso, a obtenção das enzimas por meio da biotecnologia torna o processo mais facilitado para aplicação industrial e, em relação aos catalisadores químicos utilizados em processos convencionais, são mais favoráveis ambientalmente, gerando métodos ecologicamente corretos (Mussatto et al., 2007).

Em geral, as enzimas são aplicadas no processo em sua forma livre, dificultando a possibilidade de recuperação e reutilização. Porém, essa desvantagem pode ser revertida a partir da imobilização das enzimas em suportes sólidos. Esse processo em muitos casos é capaz de melhorar a estabilidade do biocatalisador, reduzir custos já que é possível a recuperação da enzima e a sua reutilização, melhora o controle da reação e possibilita o uso em reatores de biocatálise de fluxo contínuo (Duarte et al., 2017; Ricardi et al., 2021). Além desses pontos, a imobilização torna a enzima mais robusta e mais resistente a mudanças do ambiente reacional, como as influências da temperatura, pH e solventes orgânicos (Souza et al., 2017).

Segundo Chibata et al (1978), define-se enzima imobilizada como a enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada repetida e continuamente. Ou seja, a

imobilização consiste no aprisionamento da proteína em um suporte sólido, que seja insolúvel no meio reacional, sendo aquoso ou em solventes orgânicos. Existem diferentes métodos para a imobilização enzimática: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação, alguns deles são mostrados na Figura 4.

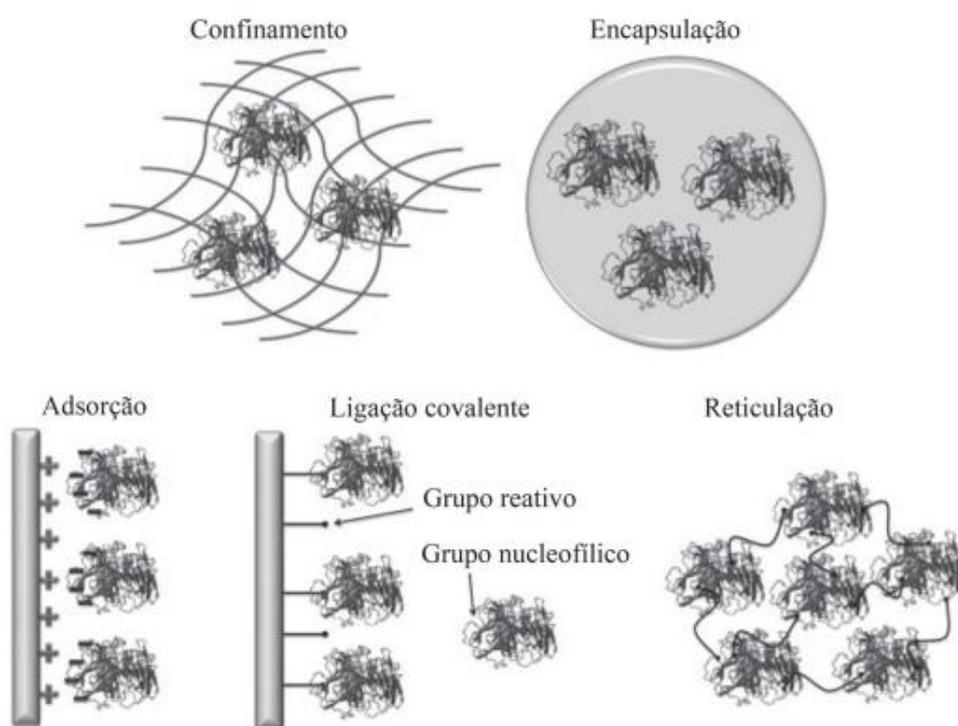


Figura 4: Esquema dos métodos de imobilização de enzima.

Fonte: Souza et al., 2017.

Todos esses métodos apresentam vantagens e limitações de processo e a eficácia de cada mecanismo de imobilização está relacionado à escolha do suporte e da enzima e depende das características físico-químicas do material, das propriedades do substrato, do meio reacional, a aplicação final, entre outros fatores (Souza et al., 2017).

O método utilizado para realização deste estudo fundamenta-se na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima (Furlani et al., 2020). A força deste tipo de ligação é elevada e proporciona maior

rigidez e estabilidade na estrutura da enzima, sendo capaz de aumentar a resistência do biocatalisador quanto à agentes desnaturantes como calor, presença de solventes orgânicos, mudanças de pH e outros (Souza et al., 2017). O método de imobilização por ligação covalente se destaca como mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas. A desvantagem desse método é o fato de ser um processo irreversível, ou seja, uma vez que a enzima é ligada ao suporte, não pode ser mais separado sem destruir a atividade biológica da enzima (Frota, 2018).

2.2.1 Suporte para imobilização enzimática

Com o aumento no interesse e aplicabilidade de enzimas imobilizadas, novas técnicas e diferentes suportes vêm sendo pesquisados e desenvolvidos. Em relação ao suporte para a imobilização enzimática, alguns fatores são importantes para a tomada de decisão, como: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, porosidade, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, alta afinidade com a proteína, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, baixa toxicidade, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos funcionais reativos presentes em sua superfície (Furlani et al., 2020; Souza et al., 2017).

O desempenho das enzimas imobilizadas é influenciado pelas propriedades da enzima e do material de suporte, como segue na Figura 5.

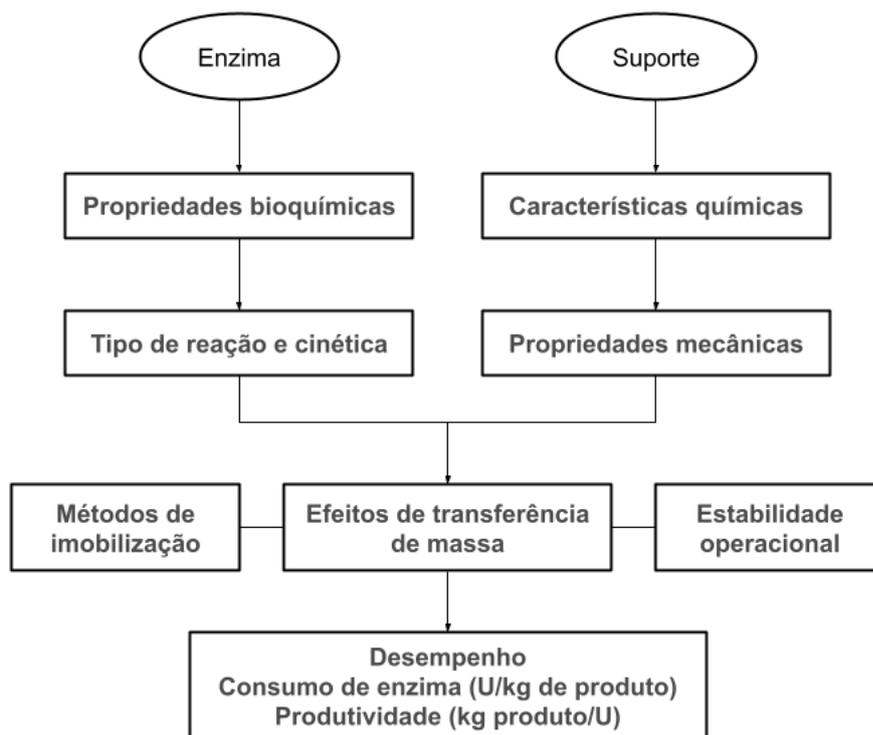


Figura 5: Interação entre suporte e enzima.

Fonte: Vieira, 2009.

Os suportes para imobilização enzimática podem ser classificados de acordo com a matéria prima utilizada, sendo divididos em orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais ou fabricados).

Tabela 1: Exemplos de suportes quanto à composição química.

Suportes orgânicos	Naturais	Polissacarídeos: celulose, ágar, quitina, quitosana, amido, entre outros. Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda, entre outros.
	Sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, polivinílico, náilon, entre outros.
Suportes inorgânicos	Minerais	Areia, bentonita, herneblenda, pedra-pomes.
	Fabricados	Vidro, cerâmica, sílica, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel, aços inoxidáveis, entre outros.

Fonte: Furlani et al., 2020.

Os suportes orgânicos divididos em naturais e sintéticos são materiais de grande importância no campo da imobilização. Os suportes naturais são destaques pois não causam danos ao ambiente e possuem facilidade na degradação, além de apresentarem custos mais baixos (Furlani et al., 2020). Já os sintéticos, apresentam maior variedade de propriedades físicas e químicas, formando um suporte ideal de acordo com as características e aplicações específicas (Mendes, 2009).

A outra classe de suportes, de material inorgânico, é mais apropriada para uso industrial, pois esta classe apresenta elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a materiais orgânicos e microbianos (Vieira, 2009). Enfim, é mais estável ao meio reacional. No entanto, a maioria das enzimas imobilizadas comercialmente são obtidas a partir de matrizes orgânicas, provavelmente devido à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos neste suporte.

A quitosana foi o material escolhido para desenvolver esse trabalho devido às suas características como não apresentar toxicidade, ser biocompatível, biodegradável, bacteriostática, baixo custo e versátil, podendo tomar diferentes formas, tamanhos e estruturas, e apresentar grupos reativos amino e hidroxila que estão disponíveis para modificações químicas (Ricardi et al., 2021; Lima et al., 2021; Hackenhaar et al., 2021; Flores et al., 2019). A quitosana comercial é obtida a partir da N-desacetilação da quitina, composto encontrado no exoesqueleto de crustáceos, resíduo da indústria pesqueira (Klein, 2012). Esse biopolímero de alto peso molecular possui estrutura molecular quimicamente similar à celulose, com grupos hidroxilas reativos, na qual a principal diferença é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura (Krajewska, 2004), como mostra a Figura 6:

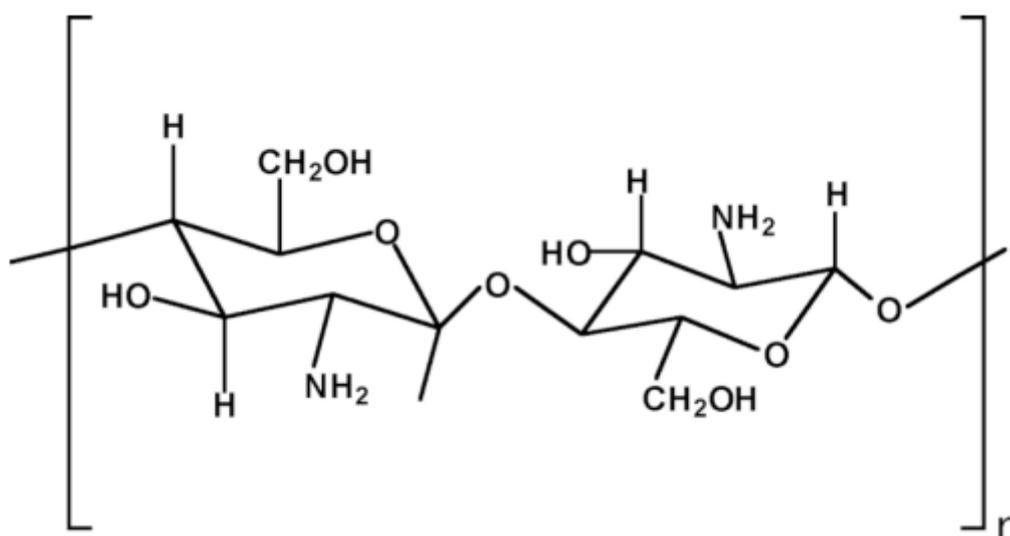


Figura 6: Estrutura da unidade monomérica da quitosana.

Fonte: Almeida (2018).

A quitosana é insolúvel em água, mas é solúvel em meio ácido aquoso em pH menor que 6,5. Quando dissolvida possui alta carga positiva nos grupos -NH_3^+ , assim, quando precipitada em pH alcalino, ocorre a gelificação inotrópica, ação desejável para a formação de esferas, metodologia utilizada neste trabalho (Krajewska, 2004).

2.2.2 Agente reticulante

Para a imobilização enzimática através do método de ligação covalente, frequentemente é realizada a modificação da superfície do suporte por meio da ativação do mesmo, onde os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (Souza et al., 2017). Os agentes reticulantes possuem ao menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos da enzima e ao suporte (Furlani et al., 2020).

Um dos agentes reticulantes com destaque é a genipina, composto encontrado no fruto *Genipa americana* L. e *Gardenia jasminoides* J. Ellis, plantas pertencentes à família *Rubiaceae* (Neves et al., 2022; Flores et al., 2019). A *Genipa americana* L. é uma planta nativa distribuída desde o sul do México, passando pela América Central até o norte do Brasil. Uma de suas características estruturais é a possibilidade de reagir com grupos amina primários de aminoácidos, peptídeos ou proteínas, por reticulação, para formar um corante azul (Neves et al., 2022). Por ser um composto

de origem natural, apresentar baixa toxicidade e sua afinidade por proteínas torna um agente de ativação ideal para a preparação de biocatalisadores a serem aplicados em alimentos e na área biomédica (Albuquerque et al., 2022; Flores et al., 2019). A Figura 7 mostra a fórmula molecular da genipina:

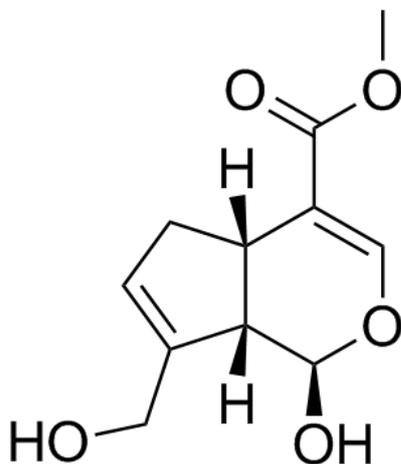


Figura 7: Estrutura molecular da genipina.

Fonte: Muzzarelli, 2009.

A genipina apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidepressiva, antifúngica, antiangiogênica, antidiabética, imunossupressora, utilizada em tratamentos de icterícia, edema e hipertensão, inibe a proliferação de várias células cancerígenas, incluindo leucemia, mama, próstata e carcinoma hepatocelular (Flores et al., 2019; Lee et al., 2018; Shanmugam et al., 2018; Hobbs et al., 2018). Essas características relacionadas à saúde tornam a genipina um composto muito estudado para aplicação biomédica.

2.2.3 Enzima β -galactosidase

A β -galactosidase têm um papel importante nas indústrias de laticínios, pois é capaz de hidrolisar a lactose em glicose e galactose, permitindo o consumo de produtos lácteos por pessoas intolerantes à lactose, e, na presença de solução com alta concentração de lactose, por reação de transgalactosilação, sintetizar galacto-oligossacarídeos (GOS), um importante ingrediente alimentar prebiótico, naturalmente presente no leite humano.

Além de desempenhar essas funções, segundo Jurado (2002), a β -galactosidase é capaz de:

- Proporcionar melhores características tecnológicas em derivados lácteos, tais como melhor solubilidade e redução de riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado;
- Proporcionar melhores características sensoriais em derivados lácteos, tal como incremento no poder dulçor, implicando em menor adição de sacarose e consequente redução no conteúdo calórico;
- Proporcionar melhores características reológicas como a melhor textura e a maior cremosidade, em especial na redução do ponto de congelamento de sorvetes;
- Formar monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas; e
- Ao produzir GOS, reduzir a probabilidade de ocorrência da reação de Maillard, pois os oligossacarídeos obtidos não atuam como açúcares redutores.

Esta enzima pode ser encontrada na natureza em diversas plantas, animais e microrganismos. Comparado às fontes animais e vegetais, a partir dos microrganismos (fungos filamentosos, bactérias e leveduras) é a forma com maior rendimento e é tecnologicamente mais importante. As principais enzimas de interesse comercial são isoladas da levedura *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Candida kefyr* e dos fungos *Aspergillus niger* ou *A. oryzae* (Grosová et. al, 2008)

Para esse estudo, foi utilizada a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, uma enzima monomérica de 113 kDa, apresentando boa atividade tanto para a hidrólise da lactose como para a síntese de GOS (Flores et al., 2018). Esta enzima é reconhecida como segura para aplicação em alimentos, ou seja, apresenta o status GRAS (Generally Recognized As Safe) do FDA (Food and Drug Administration) (Serey et al., 2021) além de ser reconhecida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O pH ótimo para atividade da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* é de 4,5, o que é apropriado para hidrólise de lactose de soro ácido (Shi et al., 2022).

2.3 REATORES ENZIMÁTICOS

A aplicação de enzimas em processos industriais tem se destacado cada vez mais nos últimos tempos. Reatores enzimáticos são uma alternativa para a aplicação dos biocatalisadores e uma forma de aprimorar as reações enzimáticas. Entende-se por reator enzimático um equipamento no qual, no interior dele, biocatalisadores agem para que ocorram reações enzimáticas, gerando produtos. Os reatores são formados por duas fases, a fase líquida, representada pelos substratos e produtos dissolvidos, e a fase sólida, que corresponde ao biocatalisador imobilizado (Klein, 2014).

Reatores enzimáticos em operação contínua possibilitam ao processo várias vantagens, como o aumento da produtividade da reação, controle do processo, apresentam maior eficiência energética, podem ser operados por longos enquanto apresentarem atividade, o que minimiza os custos, tempo de produção e torna a sua aplicação economicamente viável (Freitas, 2018; Klein, 2014).

Os reatores contínuos podem ser de três formas: reator de tanque agitado, reator em coluna de leito fluidizado e reator em coluna de leito fixo.

O sistema com leito fixo possui algumas deficiências pois pode provocar o aparecimento de caminhos preferenciais, ineficiência na transferência de massa, facilidade de obstrução do leito de partículas e queda de pressão. No entanto, as vantagens no uso podem ser maiores que as desvantagens, tornando o reator de leito fixo uma boa alternativa para a aplicação de enzimas imobilizadas, possibilitando ao processo elevada estabilidade operacional, fácil operação em modo contínuo e alta eficiência volumétrica. Além disso, pelo fato das partículas do biocatalisador ficarem empacotadas no sistema, as tensões de cisalhamento são eliminadas, reduzindo as chances de danificação do suporte (Freitas, 2018; Klein, 2014). Considerando estas vantagens, o sistema de reator com coluna de leito fixo foi escolhido para ser utilizado neste trabalho como poderá ser visto a seguir.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae*, a quitosana (de cascas de camarão, $\geq 75\%$ desacetiladas), o o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e a lactose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A genipina de *Genipa americana* foi

obtida por extração enzimática, seguindo a metodologia de Bellé et al., 2018. A coluna da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizada foi uma Aminex HPX-87C. Todos os solventes e outros produtos químicos eram de grau analítico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Produção do suporte de quitosana

Os suportes foram preparados a partir de uma solução de quitosana a 3% (p/v) preparada em ácido acético a 2% (p/v) e sonicada durante 20 minutos para remover as bolhas de ar presente na solução.

Para a produção das esferas, a solução de quitosana foi gotejada em NaOH 1 N sob agitação para coagulação. Após, as esferas de quitosana já formadas foram lavadas com água destilada até a neutralidade.

Já para as esferas porosas, a solução de coagulação foi composta por NaOH 1N adicionada de Na₂CO₃ 50 mM. O processo foi idêntico e, após formadas as esferas, seguiu o mesmo procedimento de lavagem até neutralidade.

3.2.2 Reticulação das esferas de quitosana

As esferas de quitosana porosas e não porosas foram colocadas em uma solução de genipina utilizando 1,5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato (0,1 M, pH 9.0) durante 1 hora a 60 °C sob agitação. Após esse processo, as esferas foram lavadas com água destilada para remover possíveis excessos de genipina.

3.2.3 Imobilização da enzima β-galactosidase

Com as esferas já reticuladas, 300 esferas de cada tipo de suporte foram adicionadas a 30 mL de uma solução de β-galactosidase (10 U mL⁻¹) dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e deixado para imobilização por 18 horas, sob agitação à temperatura ambiente (25°C).

Após a imobilização, o suporte foi lavado com solução com solução tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5), NaCl (0,1 M) e etilenoglicol (30% v/v) para remover as proteínas de ligação não covalente e possíveis excessos de enzima.

3.2.4 Atividade da enzima imobilizada

A análise da atividade da enzima imobilizada se dá pela simulação da reação utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. Para isso, 3 esferas de cada biocatalisador foram adicionadas a 460 μ L de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e depois foram adicionados 540 μ L do substrato ONPG (40 mM em tampão acetato 0,1 M pH 4,5) para reagir durante 3 minutos a 40 °C em um banho termostático e sob agitação. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL de tampão carbonato (0,1 M, pH 10) e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro da absorbância medida a 415 nm.

Os parâmetros de imobilização foram calculados a partir das equações descritas por Sheldon e Van Pelt (2013), mostradas abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada (U)}}{\text{Atividade inicial (U)}} \times 100$$

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade observada (U)}}{\text{Atividade imobilizada (U)}} \times 100$$

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \frac{\text{Atividade observada (U)}}{\text{Atividade inicial (U)}} \times 100$$

O rendimento associa a atividade inicial, que é a atividade da solução enzimática oferecida ao suporte, e a atividade imobilizada, que se refere à diferença entre a atividade oferecida ao suporte e a atividade determinada no sobrenadante e nas frações de lavagem. A eficiência relaciona a atividade observada, que é a atividade medida no suporte após a imobilização, e a atividade imobilizada. E a atividade recuperada relaciona a atividade observada e a atividade inicial.

3.2.5 Síntese de galacto-oligosacarídeos

A síntese de GOS se deu por meio de um reator de leito fixo contínuo composto por β -galactosidase imobilizada em esferas porosas e não porosas. Os reatores consistem em uma coluna de vidro revestida com água a temperatura controlada

(40°C) e cada reator foi preenchido com 280 esferas. A solução de lactose 300 g L⁻¹ tamponada em pH 4,5 percorreu o reator que foi mantido a temperatura controlada de 40 °C para reduzir a cristalização da lactose e por ser a temperatura ótima para a atividade da enzima (Klein et al., 2016). A cada 24 horas foi retirada uma amostra para assim obter resultados para a analisar a produção de GOS.

3.2.6 Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os carboidratos envolvidos na reação de transgalactosilação (lactose, galactose, glicose e galacto-oligossacarídeos) foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipado com detector de índice de refração (RID) e coluna Aminex HPX-87C (300 mm x 7,8 mm) modo isocrático. O solvente de eluição utilizado na análise foi água Milli-Q com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de forno de 85°C (KLEIN, 2014). A concentração dos componentes foi calculada através de curvas padrões de lactose, glicose, galactose, rafinose e estaquiose. As concentrações foram calculadas como equivalente de rafinose e estaquiose.

O percentual de rendimento da síntese de GOS foi definido segundo Klein (2014) como a porcentagem de GOS produzida em comparação com o peso inicial de lactose no meio de reação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Testes preliminares

Para a realização do experimento, alguns testes preliminares foram realizados a fim de determinar alguns parâmetros importantes para o reator. Após a ativação e imobilização da enzima, um reator com esferas porosas foi preparado para determinar o fluxo do reator. Para essa determinação, foram utilizadas duas bombas peristálticas com configurações para a velocidade diferente e os resultados estão na Tabela 2. A bomba 1 desempenha velocidades maiores, a partir de 1 rpm, e a bomba 2 velocidades a partir de 0,1 rpm.

Tabela 2: Determinação do fluxo do reator.

Bomba	Velocidade da bomba (rpm)	Fluxo Médio (mL min⁻¹)
Bomba 1	6	1,40 ± 0,03
	5	1,07 ± 0,04
	4	0,88 ± 0,02
	3	0,67 ± 0,03
	2	0,40 ± 0,02
Bomba 2	1	0,23 ± 0,01
	0,5	0,12 ± 0,00
	0,3	0,07 ± 0,00
	0,2	0,046 ± 0,00
	0,1	0,023 ± 0,00

Considerando que o fluxo está diretamente relacionado com o tempo de residência, ou seja, o tempo disponível para reação, foi realizada a análise de conversão de lactose em glicose para uma solução de lactose 5% para algumas velocidades. Os dados obtidos podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação da conversão de lactose em glicose de acordo com a velocidade da bomba.

Velocidade da bomba (rpm)	% de conversão
3	26,33 ± 0,13
2	35,86 ± 0,09
1	38,95 ± 0,96

A partir da correlação entre velocidade da bomba, fluxo e % de conversão, pode ser observado que quanto menor a velocidade da bomba, maior a % de conversão da lactose em glicose, o que prevê que velocidades menores trazem melhores resultados para o objetivo do estudo.

4.2 Produção de galacto-oligossacarídeos

Os reatores contínuos de leito fixo foram compostos por 280 esferas cada, um com esferas porosas e o outro com esferas não porosas, com um total de atividade de 65,40 e 63,49 U respectivamente, com os seguintes dados da enzima imobilizada:

Tabela 4: Dados referente a imobilização da β -galactosidase em esferas porosas e não porosas.

	Atividade Imobilizada (U g ⁻¹)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)
Esferas porosas	779,08	66,90	33,31	22,29
Esferas não porosas	566,85	56,30	38,40	21,62

As esferas porosas apresentam maior atividade imobilizada em razão da utilização de Na₂CO₃ no processo de coagulação. Esse componente possibilita a formação de bolhas de CO₂, o que faz aumentar o tamanho e o número de poros formados na matriz polimérica, aumentando a área superficial externa da esfera e a superfície interna dos poros. Assim, é possível que mais enzimas se liguem a esfera (Dragan & Dinu, 2020; Hsieh et al., 2007).

A velocidade da bomba peristáltica foi ajustada em 0,3 rpm uma vez que velocidades menores favoreciam a cristalização da solução de lactose, impedindo o fluxo. Para essa velocidade, o fluxo nos reatores era de 0,07 mL min⁻¹ e o tempo de residência era de 26 minutos para as esferas porosas e 46 minutos para as esferas não porosas. Essa diferença é um reflexo das características físicas dos dois suportes. As esferas porosas ocupam mais espaço no reator uma vez que, por apresentarem poros maiores, a densidade é menor e por isso no processo de produção de esferas elas ficam maiores. Ou seja, esferas maiores ocupam mais espaço no reator e possibilitam a presença de menor quantidade de solução para percorrer o trajeto, fazendo com que permaneça por menos tempo em contato com o biocatalisador.

Dentre os fatores fundamentais para a formação de GOS, o mais significativo é a concentração inicial de lactose (Grosová et. al, 2008). Nesse experimento, a

solução de lactose utilizada foi com uma concentração de 300 g L^{-1} e os perfis de comportamento dos reatores em relação a concentração de GOS-3 (rafinose), GOS-4 (estaquiose) e somatório dos GOS; e rendimento da síntese estão mostrados abaixo:

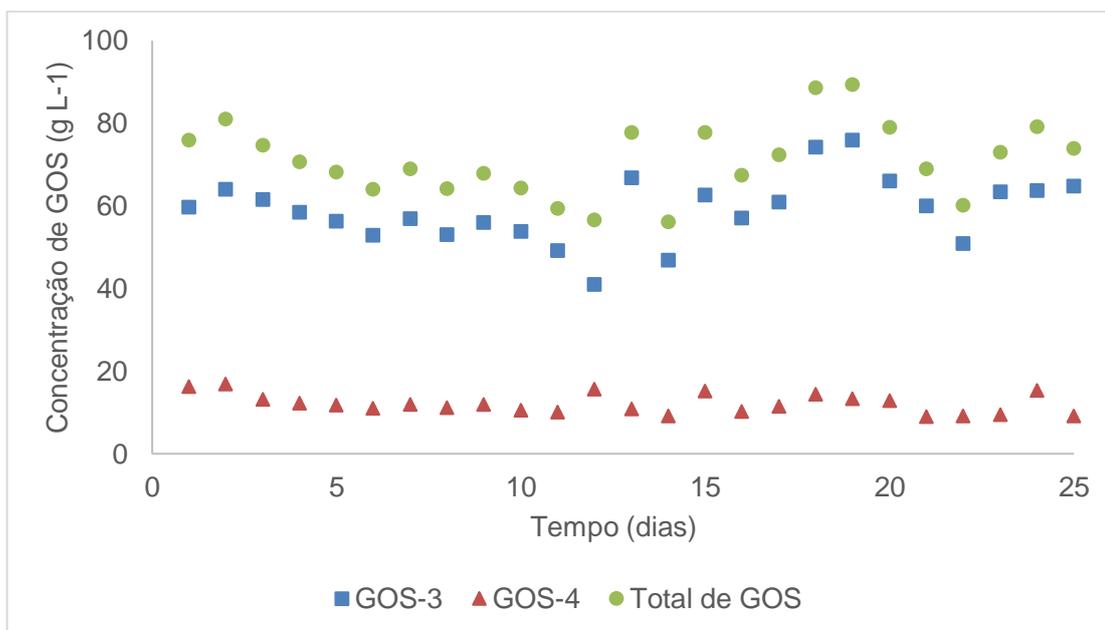


Figura 8: Concentrações dos produtos de reação do reator com esferas porosas.

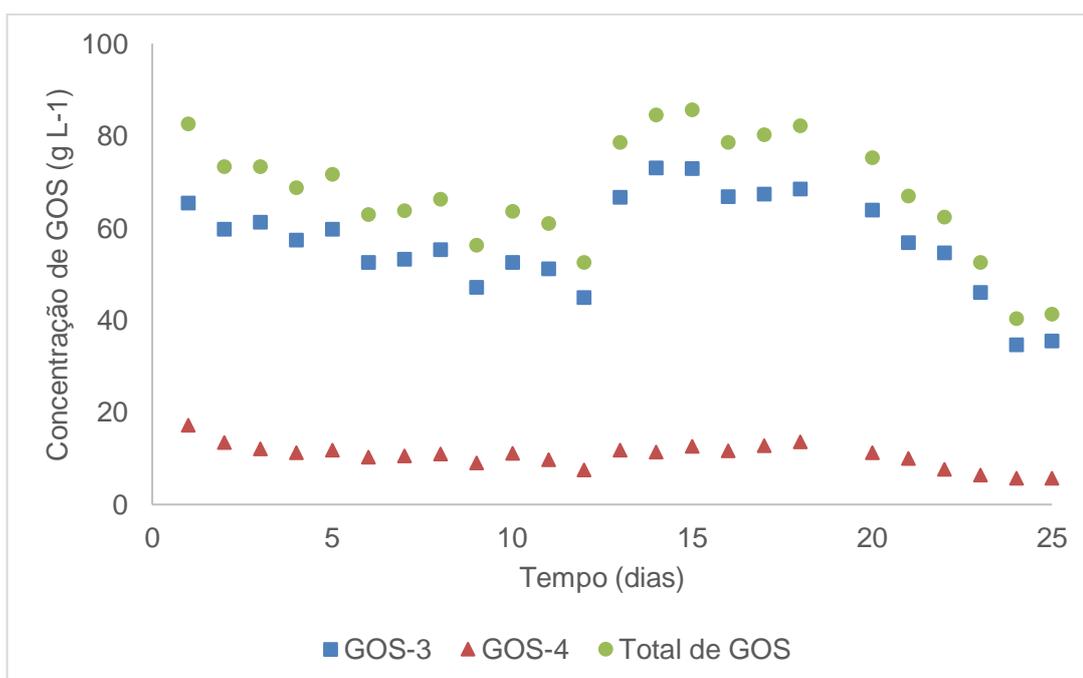


Figura 9: Concentrações dos produtos de reação do reator com esferas não porosas.

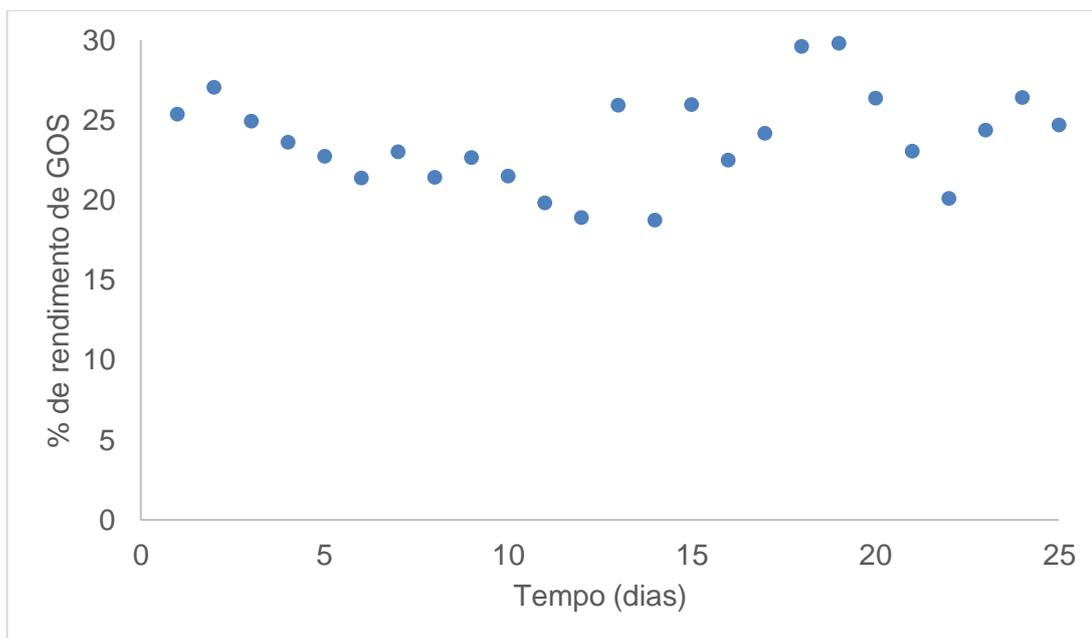


Figura 10: Percentual de rendimento da síntese de GOS no reator de esferas porosas.

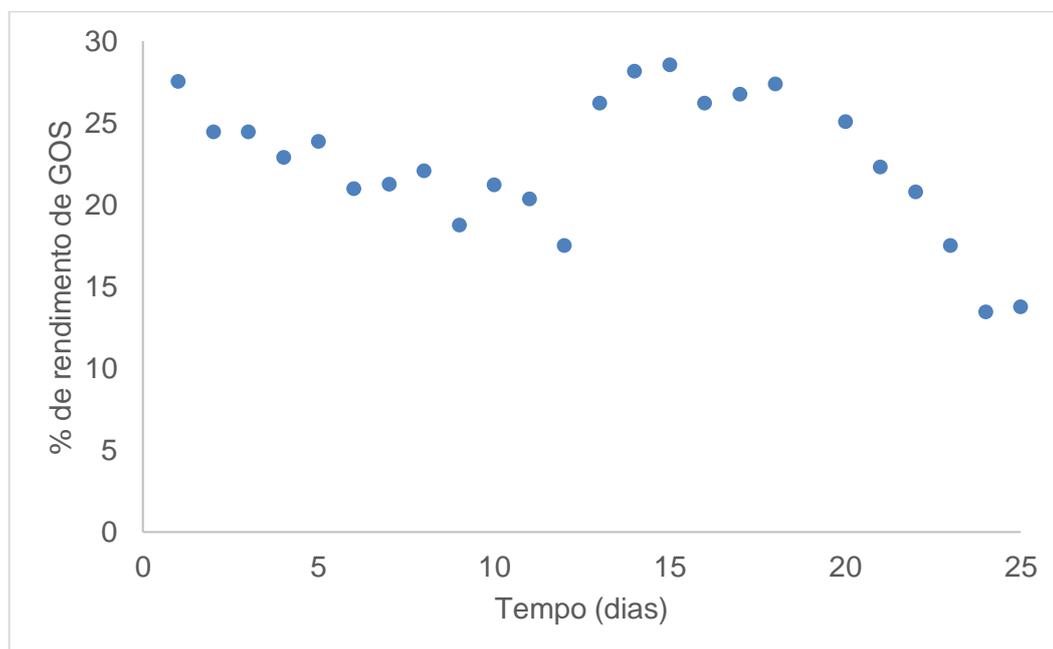


Figura 11: Percentual de rendimento da síntese de GOS no reator de esferas não porosas.

A produção de GOS foi acompanhada durante 25 dias e os perfis de comportamento de cada reator mostram que o reator com esferas porosas apresenta estabilidade superior ao reator de esferas não porosas, pois a partir do vigésimo dia a

produção de GOS começa a cair, atingindo as menores produções do prebiótico. Em relação a integridade do biocatalisador, nos dois casos se manteve estáveis.

A partir da relação entre a concentração da produção de GOS e tempo de residência, tem-se a produtividade em $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ que pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5: Dados de atividade enzimática, produtividade, rendimento e tempo de residência das esferas porosas e não porosas.

	Atividade enzimática total do biorreator (U)	Tempo de residência (min)	Média de GOS produzido (g L^{-1})	Média de rendimento (%)	Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Esferas porosas	65,40	26,00	$71,10 \pm 9,03$	$23,70 \pm 2,95$	164,11
Esferas não porosas	63,49	46,00	$67,70 \pm 12,74$	$22,60 \pm 4,25$	88,33

Em dados da literatura, Valero (2009) obteve uma produção de GOS a partir de *A. oryzae* imobilizada em reator de fluxo em pistão durante 10 dias de 25% (p/p) a partir de solução de lactose a 400 g L^{-1} . Para Hackenhaar (2018), em um sistema de bateladas utilizando β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em esferas de quitosana entrecruzada com glutaraldeído, a partir de uma solução de soro de leite o rendimento foi de 40% em 300 minutos e para uma solução de permeado de soro de leite de 41% em 240 minutos, ambos utilizando 400 g L^{-1} de lactose. Para Klein (2014), a concentração máxima de GOS de 26 g L^{-1} foi obtida a partir de um reator de leito empacotado, com fluxo contínuo, com β -D-Galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em esferas de quitosana ativada com glutaraldeído.

Em comparação com os dados da literatura, considerando que o reator de leito fixo com fluxo contínuo manteve-se durante 25 dias, os dois reatores tiveram um bom desempenho. Nos dois casos, o perfil de comportamento de produção e rendimento são muito próximos, com média de produção de GOS de $71,10 \text{ g L}^{-1}$ e rendimento de 23,70% para as esferas porosas e $67,70 \text{ g L}^{-1}$ e 22,60% para as esferas não porosas. Porém, o reator com esferas porosas apresentou uma maior produtividade ($164,11 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) em comparação com o sistema não poroso ($88,33 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), em consequência do menor tempo de residência (26 minutos para as esferas porosas e 46 minutos para

as esferas não porosas). Isso pode ser devido ao aumento da porosidade das esferas que provavelmente facilita o contato do sítio ativo da enzima com o substrato e a entrada do substrato e saída de produtos.

5 CONCLUSÃO

Com o avanço nas técnicas para imobilização em consequência do grande interesse e aplicabilidade do uso de enzimas imobilizadas na indústria, o objetivo do trabalho foi estudar a produção contínua de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de quitosana entrecruzada com genipina a partir de solução concentrada de lactose. Foram avaliados dois tipos de suportes para a produção de GOS, esferas porosas e não porosas, com o mesmo fluxo e concentração da solução. A partir dos resultados de produtividade dos reatores (164,11 g L⁻¹ h⁻¹ para as esferas porosas e 88,33 g L⁻¹ h⁻¹ para as esferas não porosas) e considerando o tempo de 25 dias de funcionamento dos reatores, os dados demonstram a viabilidade da aplicação das esferas porosas para este tipo de bioprocessos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Tiago Lima de; SOUSA, Marylane de; SILVA, Natan Câmara Gomes e; GIRÃO NETO, Carlos Alberto Chaves; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA, Maria Valderez Ponte. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: characterization, production, immobilization and applications - a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Fortaleza, Ceará, v. 191, p. 881-898, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>

ALMEIDA, Carolina Lima de. **PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS À BASE DE QUITOSANA E POLICAPROLACTONA (PCL)**. 2018. 49 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

BELLÉ, Anelise S.; HACKENHAAR, Camila R.; SPOLIDORO, Luiza S.; RODRIGUES, Eliseu; KLEIN, Manuela P.; HERTZ, Plinho F.. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 246, p. 266-274, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>.

BENJAMINS, Frédéric. **Galacto-oligosaccharide synthesis using immobilized β -galactosidase**. 2014. 95 f. Doctor of Philosophy, University Of Groningen, Groningen, Nederland, 2014.

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

DAVANI-DAVARI, Dorna; NEGAHDARIPOUR, Manica; KARIMZADEH, Iman; SEIFAN, Mostafa; MOHKAM, Milad; MASOUMI, Seyed; BERENJIAN, Aydin; GHASEMI, Younes. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 92, 9 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods8030092>.

DUARTE, Lovaine Silva; SCHÖFFER, Jéssie da Natividade; LORENZONI, André Soibelman Glock; RODRIGUES, Rafael C.; RODRIGUES, Eliseu; HERTZ, Plinho Francisco. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 55, p. 96-103, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>.

FAI, Ana Elizabeth Cavalcante; PASTORE, Gláucia Maria. Galactooligosaccharides: production, health benefits, application to foods and perspectives. **Scientia Agropecuaria**, [S.L.], p. 69-81, 20 mar. 2015. Universidad Nacional de Trujillo. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.07>.

FLORES, Elí Emanuel Esparza; CARDOSO, Fernanda Dias; SIQUEIRA, Larissa Bertoldo; RICARDI, Natália Carminatti; COSTA, Tania Haas; RODRIGUES, Rafael C.; KLEIN, Manuela Poletto; HERTZ, Plinho Francisco. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 84, p. 73-80, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.001>.

FREITAS, Vitória Olave de. **AVALIAÇÃO DO USO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS**. 2018. 78 f. Tese (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

FROTA, Elionio Galvão. **Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de cálcio reticulados**. 2018. 112 f. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2018.

FURLANI, Izadora; AMARAL, Bruno; OLIVEIRA, Regina; CASS, Quezia. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, São Carlos, Sp, v. 43, n. 4, p. 463-473, 16 abr. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>.

GIBSON, Glenn R.; HUTKINS, Robert; SANDERS, Mary Ellen; PRESCOTT, Susan L.; REIMER, Raylene A.; SALMINEN, Seppo J.; SCOTT, Karen; STANTON, Catherine; SWANSON, Kelly S.; CANI, Patrice D.. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (isapp) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 491-502, 14 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

GIBSON, Glenn R.; PROBERT, Hollie M.; VAN LOO, Jan; RASTALL, Robert A.; ROBERFROID, Marcel B.. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 259-275, dez. 2004. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1079/nrr200479>.

GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B.. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1 jun. 1995. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.

GOSLING, Aaron; STEVENS, Geoff W.; BARBER, Andrew R.; KENTISH, Sandra E.; GRAS, Sally L.. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 121, n. 2, p. 307-318, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>.

GROSOVÁ, Zuzana; ROSENBERG, Michal; REBROŁ, Martin. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech J. Food Sci.**, Slovak Republic, v. 26, p. 1-14, 2008.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; CONEJEROS, Raúl; ILLANES, Andrés. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme And Microbial**

Technology, [S.L.], v. 70, p. 9-17, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>.

HACKENHAAR, Camila Regina; SPOLIDORO, Luiza Strapasson; FLORES, Elí Emanuel Esparza; KLEIN, Manuela Poletto; HERTZ, Plinho Francisco. Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 36, p. 102136, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102136>.

HACKENHAAR, Camila Regina. **OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO**. 2018. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

HOBBS, Cheryl A.; KOYANAGI, Mihoko; SWARTZ, Carol; DAVIS, Jeffrey; MARONPOT, Robert; RECIO, Leslie; HAYASHI, Shim-Mo. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 118, p. 695-708, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.001>.

KLEIN, Manuela P.; NUNES, Michael R.; RODRIGUES, Rafael C.; BENVENUTTI, Edilson V.; COSTA, Tania M. H.; HERTZ, Plinho F.; NINOW, Jorge L.. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 2456-2464, 10 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm3006984>.

KLEIN, Manuela P. **HIDRÓLISE DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO B- GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM SUPORTES À BASE DE QUITOSANA**. 2014. 174 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

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**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002

KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme And Microbial Technology**, Ingardena, Poland, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>.

LEE, Suk-Young; KIM, Hong Jun; OH, Sang Cheul; LEE, Dae-Hee. Genipin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by the suppression of HIF-1 α accumulation and VEGF expression. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 116, p. 70-76, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.005>.

LIMA, Pâmela Cristina; GAZONI, Isadora; CARVALHO, Alexandra Melissa Gonçalves de; BRESOLIN, Daniela; CAVALHEIRO, Darlene; OLIVEIRA, Débora de; RIGO, Elisandra. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in genipin-activated chitosan: an investigation on immobilization, stability, and application in diluted uht milk. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 349, p. 129050, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129050>.

MANZOOR, Sabeena; WANI, Shoib Mohmad; MIR, Sajad Ahmad; RIZWAN, Danish. Role of probiotics and prebiotics in mitigation of different diseases. **Nutrition**, [S.L.], v. 96, p. 111602, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2022.111602>.

MARTINS, André R.; BURKERT, Carlos André V.. Revisão: galacto-oligossacarídeos (gos) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 12, n. 03, p. 230-240, 2 out. 2009. Institute of Food Technology. <http://dx.doi.org/10.4260/bjft2009800900017>.

MARTINS, André Rosa. **CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA**. 2014.

116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos., Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009.

MOLLAKHALILI-MEYBODI, Neda; ARAB, Masoumeh; NEMATOLLAHI, Amene; KHANEGHAH, Amin Mousavi. Prebiotic wheat bread: technological, sensorial and nutritional perspectives and challenges. **Lwt**, [S.L.], v. 149, p. 111823, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111823>.

MUSSATTO, Solange Inês; FERNANDES, Marcela; MILAGRES, Adriane Maria Ferreira. **ENZIMAS: poderosa ferramenta na indústria. PODEROSA FERRAMENTA NA INDÚSTRIA**. 2007. Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://cienciahoje.org.br/artigo/enzimas-poderosa-ferramenta-na-industria/#:~:text=O%20uso%20de%20enzimas%20em,e%20maior%20velocidade%20de%20rea%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: 03 mar. 2022.

MUZZARELLI, Riccardo A.A.. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 1-9, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>.

NEVES, Maria Isabel Landim; VALDÉS, Alberto; SILVA, Eric Keven; MEIRELES, Maria Angela A.; IBÁÑEZ, Elena; CIFUENTES, Alejandro. Study of the reaction between genipin and amino acids, dairy proteins, and milk to form a blue colorant ingredient. **Food Research International**, [S.L.], v. 157, p. 111240, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111240>.

PIMENTEL, Tatiana Colombo; ASSIS, Bianca Beatriz Torres de; ROCHA, Caique dos Santos; MARCOLINO, Vanessa Aparecida; ROSSET, Michele; MAGNANI, Marciane.

Prebiotics in non-dairy products: technological and physiological functionality, challenges, and perspectives. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 46, p. 101585, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101585>.

RICARDI, Natália Carminatti; ARENAS, Leliz Ticona; BENVENUTTI, Edilson Valmir; HINRICHS, Ruth; FLORES, Elí Emanuel Esparza; HERTZ, Plinho Francisco; COSTA, Tania Maria Haas. High performance biocatalyst based on β -d-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 359, p. 129890, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129890>.

RODRIGUEZ-COLINAS, B., Kolida, S., Baran, M., Ballesteros, A.O., Rastall, R.A., Plou, F.J., 2013. Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97, 5743–5752. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4892-z>.

SEREY, Marcela; VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ILLANES, Andrés. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 167, p. 1564-1574, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110>.

SINGH, Ravindra Pal; NIHARIKA, Jayashree; KONDEPUDI, Kanthi Kiran; BISHNOI, Mahendra; TINGIRIKARI, Jagan Mohan Rao. Recent understanding of human milk oligosaccharides in establishing infant gut microbiome and roles in immune system. **Food Research International**, [S.L.], v. 151, p. 110884, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110884>.

SHANMUGAM, Muthu K.; SHEN, Hongyuan; TANG, Feng Ru; ARFUSO, Frank; RAJESH, Mohanraj; WANG, Lingzhi; KUMAR, Alan Prem; BIAN, Jinsong; GOH, Boon Cher; BISHAYEE, Anupam. Potential role of genipin in cancer therapy. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 133, p. 195-200, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.007>.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, [S.L.], v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 27 mar. 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60075k>.

SHI, Xin; WU, Dan; XU, Yan; YU, Xiaowei. Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. **Journal Of Dairy Science**, Wuxi, Republic Of China, v. 105, n. 6, abr. 2022. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2021-21760>.

SOUZA, Livia Tereza de Andrade; VERÍSSIMO, Lizzy Ayra Alcântara; JOÃO, Benevides Costa Pessela; SANTORO, Marcelo Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A.. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria - Vol. 4**, [S.L.], p. 529-568, 31 jan. 2017. Editora Blucher. <http://dx.doi.org/10.5151/9788521211150-15>.

VERA, Carlos; CÓRDOVA, Andrés; ABURTO, Carla; GUERRERO, Cecilia; SUÁREZ, Sebastián; ILLANES, Andrés. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, Chile, v. 32, n. 12, 18 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4>.

VALERO, Juan Ignacio Sanz. **PRODUCTION OF GALACTO-OLIGOSACCHARIDES FROM LACTOSE BY IMMOBILIZED β -GALACTOSIDASE AND POSTERIOR CHROMATOGRAPHIC SEPARATION**. 2009. 270 f. Tese (Doutorado), The Ohio State University, Ohio, 2009.

VIEIRA, Danielle Cristina. **Imobilização de B-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 115 f. Tese (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009