

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS
LÁCTEOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE**

Manuela Poletto Klein

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS
LÁCTEOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE**

Manuela Poletto Klein
(Engenheiro de Alimentos – UFRGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre
2010

CIP – CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

Klein, Manuela Poletto
K64i Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose / Manuela Poletto Klein. – Porto Alegre, 2010.

91f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

Orientador: Jeverson Frazzon

Bibliografia

1.Produto lácteo 2.Lactose 3.Enzima. 4. β -galactosidase - imobilização. I. Título. II. Frazzon, Jeverson (orient.)

CDU 637.1:577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Manuela Poletto Klein
Engenheiro de Alimentos – UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologado em:
Por:

Jeverson Frazzon
Orientador – PPGCTA/UFRGS

José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Plinho Francisco Hertz
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

Marco Antônio Zachia Ayub
Banca – UFRGS

Rafael Costa Rodrigues
Banca – UFRGS

Adriano Brandelli
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Jorge Luiz Ninow
Banca – UFSC

Agradecimentos

Agradeço ao professor Jeverson por sua orientação, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e principalmente por ter acreditado em mim.

Ao meu co-orientador, professor Plinho, por ter contribuído tanto durante estes dois anos, para o trabalho e para minha formação.

À professora Simone pela solicitude.

Ao Michael e à "Carla da química" por terem me ajudado a entender um pouco mais sobre os materiais utilizados como suportes para a imobilização.

Aos amigos de *Montevideo*, em especial à Karen e Carmen, e ao professor Batista por ter possibilitado tamanho aprendizado permitindo a minha *pasantía* em seu laboratório.

A todos amigos e colegas dos laboratórios pelos conselhos, conversas e companheirismo!

Aos meus estagiários, Nicole, Cléo e principalmente ao André, por sua disposição, motivação e amizade!

Agradeço a duas grandes amigas, Natalia e Patrícia, que sempre escutaram com muita paciência todos os meus anseios e dividiram comigo muitas das minhas alegrias!

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio, incentivo e amor. Aos meus pais, Ivar e Mirian, por tudo que sou hoje e ao meu irmão, Renan, por sua grande amizade e companheirismo.

Pequeno Príncipe (trecho)

E foi então que apareceu a raposa:

- Bom dia, disse a raposa.
- Bom dia, respondeu polidamente o príncipezinho que se voltou, mas não viu nada.
- Eu estou aqui, disse a voz, debaixo da macieira...
- Quem és tu? Perguntou o príncipezinho.

Tu és bem bonita.

- Sou uma raposa, disse a raposa.
- Vem brincar comigo, propôs o príncipe, estou tão triste...
- Eu não posso brincar contigo, disse a raposa.

Não me cativaram ainda.

- Ah! Desculpa, disse o príncipezinho.

Após uma reflexão, acrescentou:

- O que quer dizer cativar?
- Tu não és daqui, disse a raposa. Que procuras?
- Procuo amigos, disse. Que quer dizer cativar?
- É uma coisa muito esquecida, disse a raposa.

Significa criar laços...

- Criar laços?
- Exatamente, disse a raposa. Tu não és para mim senão um garoto inteiramente igual a cem mil outros garotos.

E eu não tenho necessidade de ti.

E tu não tens necessidade de mim.

Mas, se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás para mim o único no mundo. E eu serei para ti a única no mundo...

Mas a raposa voltou a sua ideia:

- Minha vida é monótona. E por isso eu me aborreço um pouco. Mas se tu me cativas, minha vida será como que cheia de sol. Conhecerei o barulho de passos que será diferente dos outros. Os outros me fazem entrar debaixo da terra. O teu me chamará para fora como música.

E depois, olha! Vês, lá longe, o campo de trigo? Eu não como pão. O trigo para mim é inútil. Os campos de trigo não me lembram coisa alguma. E isso é triste! Mas tu tens cabelo cor de ouro. E então serás maravilhoso quando me tiverdes cativado. O trigo que é dourado fará lembrar-me de ti. E eu amarei o barulho do vento do trigo...

A raposa então se calou e considerou muito tempo o príncipe:

- Por favor, cativa-me! Disse ela.
- Bem quisera, disse o príncipe, mas eu não tenho tempo. Tenho amigos a descobrir e mundos a conhecer.
- A gente só conhece bem as coisas que cativou, disse a raposa. Os homens não têm tempo de conhecer coisa alguma. Compram tudo prontinho nas lojas. Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos. Se tu queres uma amiga, cativa-me!

Os homens esqueceram a verdade, disse a raposa.

Mas tu não a deves esquecer.

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas"

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 β -galactosidase	13
1.2 Hidrólise enzimática da lactose	15
1.3 Imobilização de enzimas	18
1.3.1 Métodos de imobilização de enzimas	19
1.3.2 Suportes para imobilização	24
1.3.3 Efeitos da imobilização.....	27
2 RESULTADOS	29
2.1 Application of a silica based hybrid material as a support for β -galactosidase immobilization	30
2.2 Immobilization of β -galactosidase in a Ionic Liquid/Cellulose Film.....	48
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
4 CONCLUSÕES.....	72
PERSPECTIVAS FUTURAS	72
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase livre (U/mL).	80
APÊNDICE B – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade específica da β -galactosidase livre (U/mg).	80

APÊNDICE C – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β-galactosidase imobilizada em sílica.	80
APÊNDICE D – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β-galactosidase imobilizada em celulose.....	81
APÊNDICE E – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β-galactosidase livre (U/mL).....	81
APÊNDICE F – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade específica da β-galactosidase livre (U/mg).	81
APÊNDICE G – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β-galactosidase imobilizada em sílica.....	81
APÊNDICE H – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β-galactosidase imobilizada em celulose.....	82
ANEXOS	83

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE

Autor: Manuela Poletto Klein

Orientador: Jeverson Frazzon

RESUMO

A β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) é uma das enzimas mais empregadas na indústria de alimentos sendo utilizada na hidrólise da lactose. Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias para imobilização desta enzima. Na primeira delas foi empregado como suporte um material híbrido à base de sílica que possui um grupo orgânico catiônico covalentemente ligado. A adsorção da enzima a este material apresentou eficiência que variou de 74 a 53% com o aumento da quantidade de enzima aplicada ao suporte. A baixa estabilidade térmica da enzima imobilizada obtida e as prováveis fracas interações envolvidas na sua adsorção a este suporte podem explicar o decréscimo de atividade observada durante as sucessivas bateladas de hidrólise da lactose. Na primeira batelada o grau de hidrólise foi de 90,9% e no final da última batelada (4^a), a enzima foi capaz de converter apenas 13% do substrato. A segunda metodologia utilizada foi imobilização covalente da enzima em um filme de celulose/líquido iônico modificado com uma poliamina e ativado com glutaraldeído. A presença da poliamina foi confirmada por análises de infravermelho. Após a imobilização, a enzima reteve 60% de sua atividade inicial. Bons resultados de hidrólise da lactose em batelada foram obtidos tanto a 7°C como a 35°C e foi possível reutilizar a enzima imobilizada por 16 ciclos consecutivos, a 7°C, sem mudanças significativas na atividade enzimática. O valor de K_m para a enzima imobilizada no material híbrido à base de sílica foi de 9,17 mM e para a enzima imobilizada nos filmes de celulose foi de 11,22 mM, ambos apresentaram um acréscimo quando comparados ao K_m enzima livre (1,25 mM), devido à dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Não houve mudança no pH e temperatura ótimos da enzima imobilizada em relação à enzima livre em nenhum dos métodos testados.

Palavras-chave: β -galactosidase, imobilização, sílica, celulose

^{1/} Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de concentração Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, fevereiro de 2010.

IMOBILIZATION OF β -GALACTOSIDASE TO OBTAIN DAIRY PRODUCTS WITH LOW TEOR OF LACTOSE

Author: Manuela Poletto Klein

Advisor: Prof. Jeverson Frazzon

ABSTRACT

β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) is the most widely used enzymes in the food industry and its employed in the lactose hydrolysis process. In this study, two methodologies were used to test their immobilization. In the first, the enzyme was immobilized by adsorption in one silica based hybrid material that contains a cationic organic group covalently linked. The efficiency of immobilization showed a decrease of 74 to 53% by increasing the protein load applied to the support. The low thermo stability of the immobilized enzyme and the probable weak interactions involved in their adsorption, could explain the decrease in enzyme activity observed in the successive batch hydrolysis of lactose. In the first run, the degree of lactose hydrolysis was 90.9% and, at the end of the last run (4th), the enzyme was able to convert only 13% of the substrate. The second methodology used was the covalent immobilization of the enzyme on a cellulose/ionic liquid film, modified with a polyamine and activated using glutaraldehyde. The presence of a polyamine was confirmed by infrared analysis. After immobilization, the enzyme retained 60% of its initial activity. Highly efficient lactose conversion was achieved in a batch process at 7°C and 35°C and was possible to reuse the immobilized enzyme in 16 repeated cycles, at 7°C, without any drastic decrease in enzyme activity. K_m value for the immobilized enzyme in silica based hybrid material was 9.17 mM and for the enzyme immobilized in the film of cellulose/ionic liquid was 11.22 mM, both showing an increase compared with the K_m value for free enzyme (1.25 mM), due to the difficulty of access of the substrate to the active sites of the enzyme. The immobilized enzyme did not show any changes in the optimal pH and temperature when compared to the free enzyme in both methods tested.

Key words: β -galactosidase, immobilization, silica, cellulose

^{1/} Master of Science dissertation in Food Science and Technology, (Area of Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, February, 2010.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.	21
Figura 2 - Método multi-camada de encapsulação.....	23
Figura 3 - Representação de algumas formas de imobilização de enzimas. a) ligação covalente, b) fibra, c) co-entrecruzamento, d) inclusão em esferas de gel, e) forças iônicas, f) micro-encapsulação, g) inclusão em filme gel, h) entrecruzamento.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1) Propriedades de algumas β-galactosidasas microbianas	14
----------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem havido grande desenvolvimento da tecnologia de enzimas e em particular, da imobilização de enzimas. As lactases, devido a sua capacidade de hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos (glicose e galactose), pertencem ao grupo de biocatalisadores cuja imobilização tem despertado crescente interesse, devido ao grande potencial de aplicação na indústria de alimentos.

Como exemplo de aplicações, pode-se citar a hidrólise da lactose para obtenção de produtos com baixo teor de lactose, a produção de galactooligossacarídeos, a melhoria da qualidade sensorial de produtos como doce de leite, sorvete e leite condensado, a melhor biodegradabilidade do soro de queijo após a hidrólise da lactose, entre outros (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006).

O custo relativamente alto destas enzimas é um dos fatores limitantes de sua utilização, o que faz com que sua aplicação direta seja, muitas vezes, economicamente inviável. Tal problema pode ser resolvido se a enzima for utilizada em sua forma imobilizada.

A grande vantagem da aplicação de enzimas imobilizadas é, em comparação a sua forma livre, a possibilidade da reutilização do biocatalisador imobilizado e melhor controle do processo. Além disso, a utilização de enzimas imobilizadas facilita sua separação do meio reacional, não há contaminação do produto final pela enzima, há melhoria, na maioria dos casos, de sua estabilidade operacional e térmica e permite o desenvolvimento de sistemas de operação contínua. Assim, numerosas técnicas e suportes têm sido desenvolvidos a fim de aperfeiçoar a imobilização de enzimas e otimizar sua aplicação (GROSOVÁ et al., 2008).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram testar a imobilização de uma lactase comercial e estudar as condições de hidrólise da lactose para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose, através da reutilização da enzima imobilizada.

Os estudos conduzidos neste trabalho tiveram adicionalmente a importância de fornecer conhecimentos básicos do comportamento enzimático da β -galactosidase após sua imobilização.

1.1 β -galactosidase

Uma das maiores aplicações de enzimas na indústria de alimentos é na hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase [lactase; β -D-galactoside galactohidrolase; EC 3.2.1.23]. Esta enzima pertence ao grupo das enzimas conversoras de sacarídeos da família das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc) dando origem a uma mistura isomolecular de glicose e galactose (SANTIAGO et al., 2004).

As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais - particularmente entre amêndoas, pêssego, damasco, maçã - em órgãos de animais como intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas para aplicações comerciais (SANTIAGO et al., 2004). A legislação brasileira especifica, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006). Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias.

As propriedades das diferentes β -galactosidases dependem de sua origem. Em geral, lactases fúngicas possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Estas diferentes condições de pH ótimo permitem selecionar a lactase mais apropriada para uma aplicação específica. Assim, lactases fúngicas são mais adequadas para hidrólise de soro ácido, enquanto lactases de leveduras e bactérias são mais apropriadas para hidrólise do soro doce e do leite (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985). A tabela 1 apresenta um quadro comparativo das diferentes propriedades de algumas β -galactosidases microbianas.

A β -galactosidase utilizada neste estudo (Maxilact LX 5000) é uma preparação comercial líquida e purificada derivada da levedura *Kluyveromyces lactis* (DSM FOOD SPECIALITIES, 2009). Esta enzima é uma glicoproteína contendo 45% (p/p) de

Tabela 1) Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas

Fonte	PM (KDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Íons ativadores	Inibidores	K _m (mM)		
						ONPG	Lactose	
Fungos	<i>A. niger</i>	117	3.5 – 4.5	55 - 60	Não requer	Galactose	1.61	68.8
	<i>A. oryzae</i>	90	5.0	50 - 55	Não requer	Galactose	0.77	50
Leveduras	<i>K. fragilis</i>	201	6.6	37	K ⁺ , Mn ⁺	Ca ⁺²	2.5	24
	<i>K. lactis</i>	200	6.9 – 7.3	35 - 40	K ⁺ , Mg ⁺	Glicose e galactose	1.7	17.3

Fonte: Cavaille; Combes (1995), Shukla (1975).

carboidrato. Apresenta-se como um dímero, composto de duas subunidades iguais e possui um peso molecular de 200 KDa. Galactose e glicose são inibidores competitivos e não-competitivos, respectivamente, sendo a inibição por glicose ($K_i = 794 \text{ mM}$) muito menor que a inibição por galactose ($K_i = 42 \text{ mM}$) (CAVAILLE; COMBES, 1995). A atividade enzimática desta enzima é fortemente afetada por íons: o zinco e o cobre ($>5 \times 10^{-4} \text{ M}$) exercem um forte efeito inibidor sobre a enzima e o cálcio é inibidor em altas concentrações ($>10^{-4} \text{ M}$). Entretanto, a atividade desta enzima é aumentada pelo magnésio (10^{-4} M), manganês (10^{-4} M) e potássio (10^{-1} M). Concentrações de fosfatos de até 10^{-2} M tem um efeito positivo na estabilidade pois promovem a formação de ligações de cálcio (DSM FOOD SPECIALITIES, 2009).

A pureza dos preparados enzimáticos comerciais costuma ser baixa, sendo na maioria dos casos extratos concentrados, estabilizados e normalizados (OVSEJEVI, 1998). Maxilact LX 5000 é o preparado de lactase com maior grau de purificação produzido pela empresa DSM. Apresenta-se como um líquido viscoso de cor castanho pálido a castanho escuro, possui glicerol como estabilizante e se armazena entre $4 - 8^\circ\text{C}$ (DSM FOOD SPECIALITIES, 2009).

1.2 Hidrólise enzimática da lactose

A hidrólise da lactose (4-*O*- β -D-galactopyranosyl-D-glucose) pode ser feita por tratamento ácido a altas temperaturas (150°C), ou por catálise enzimática pela enzima β -galactosidase, permitindo a utilização de condições moderadas de temperatura e pH (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985). Assim, a hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos, apresentando diversos benefícios e vantagens principalmente em três áreas: saúde, tecnologia de alimentos e meio-ambiente.

Saúde - A intolerância à lactose foi descrita pela primeira vez por Hipócrates aproximadamente no ano de 400 depois de Cristo, porém os sintomas clínicos foram reconhecidos somente nos últimos 50 anos (MATTHEWS et al., 2005).

A lactose é naturalmente encontrada em alta concentração somente no leite e em produtos lácteos. O leite de vaca contém de 4,5 a 5 % de lactose o que perfaz mais de um terço do seu teor de sólidos totais, aproximadamente 20% do teor de sólidos do sorvete e em torno de 72% do teor de sólidos totais no soro do leite (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006).

Este açúcar não pode ser absorvido prontamente pelo organismo e precisa ser hidrolisado em seus monossacarídeos pela ação da β -galactosidase presente no intestino delgado (ROSSI; LENTZE, 1984).

Aproximadamente 75% da população mundial adulta possuem alguma deficiência de β -galactosidase na mucosa do intestino delgado, resultando em diferentes níveis de intolerância à lactose. Para essas pessoas, o consumo de leite e produtos lácteos pode causar dor abdominal, diarreia, flatulência, entre outros sintomas desagradáveis. Este problema pode ser contornado se a lactose do leite e produtos lácteos for previamente hidrolisada em seus açúcares prontamente digeríveis, possibilitando assim, o consumo de produtos nutricionalmente ricos e com reduzido teor de lactose por pessoas intolerantes a este dissacarídeo (SIEBER et al., 1997).

Outra vantagem da hidrólise enzimática da lactose é a simultânea formação de galactooligosacarídeos (GOS), usados como ingredientes prebióticos em alimentos. Estes compostos são indigeríveis, atuando como fibra alimentar. Eles promovem o crescimento das bifidobactérias intestinais (*Bifidobacterium sp.* e *Lactobacillus sp.*), com conseqüente efeito benéfico para a saúde. Comparado a outros oligossacarídeos, que promovem a atividade metabólica de todas as bactérias intestinais, os GOS são seletivos para bactérias probióticas (PENNISIN, 1997).

Os GOS são produzidos simultaneamente durante a hidrólise da lactose devido à atividade de transgalactosilação da β -galactosidase. A produção de GOS envolve três etapas principais: primeiro, a glicose é liberada como produto e deixa o complexo enzima-galactosil para posterior reação. Segundo, este complexo é transferido para um acceptor contendo um grupo hidroxil (água ou outro sacarídeo). Em soluções com baixa concentração de lactose, o acceptor é a água, resultando na formação de galactose. Em soluções concentradas de lactose, a molécula de lactose atua como acceptor e se liga ao complexo enzima-galactose resultando na formação do complexo galactosil-oligosacarídeo, sendo esta a última etapa. A atividade de transgalactosilação da β -galactosidase aumenta com o aumento da concentração inicial de lactose, sendo também influenciada por fatores como fonte e concentração da enzima, pH e temperatura (MAHONEY, 1998; RUSTOM et al., 1998).

Atualmente, a demanda pela produção de GOS, bem como o desenvolvimento de uma produção efetiva e de baixo custo tem aumentado significativamente (TUOHY et al., 2003).

Tecnologia de Alimentos - A alta concentração de lactose em produtos como sorvete, leite condensado e doce de leite pode levar a uma excessiva cristalização da lactose resultando em produtos com textura arenosa. A utilização de β -galactosidase no processamento de tais

produtos reduz a concentração de lactose a níveis aceitáveis e aumenta a concentração de glicose e galactose, que são açúcares mais solúveis quando comparados à lactose e, portanto menos propensos à cristalização. Desta forma, a hidrólise enzimática da lactose melhora as características tecnológicas e sensoriais de produtos lácteos, aumentando sua digestibilidade, cremosidade, suavidade, etc. (ZADOW, 1993).

Na produção de iogurte, a hidrólise prévia da lactose reduz o tempo de fermentação, uma vez que os monossacarídeos resultantes são mais facilmente utilizáveis pelas bactérias lácteas. Além disso, a glicose e a galactose possuem uma doçura relativa maior que a da lactose, diminuindo a quantidade de adoçante a ser adicionada, resultando numa menor quantidade de calorias no produto final (ZADOW, 1993).

Meio-ambiente – Aproximadamente 47% do soro de queijo produzido anualmente ao redor mundo é descartado no meio ambiente, gerando sérios problemas ambientais, uma vez que a lactose está associada a uma alta demanda química e bioquímica de oxigênio (GUIMARÃES et al., 1992). O cultivo de microrganismos tendo como substrato o soro de queijo pode ser uma boa alternativa de utilização deste subproduto. Porém, o número de microrganismos comercialmente interessantes capazes de diretamente utilizar a lactose como fonte de carbono é notavelmente menor que o número de microrganismos capazes de utilizar a glicose e a galactose diretamente. Assim, a hidrólise prévia da lactose aumentaria significativamente o número de microrganismos capazes de utilizar este substrato, aumentando também a faixa de produtos que podem ser obtidos, como exemplo, biomoléculas (lactatos, acetatos, etanol, butanodiol, etc.), biopolímeros e biomassa (COTÉ et al., 2004; GUIMARÃES et al., 1992).

Além disso, a hidrólise da lactose presente no soro converte este subproduto em xaropes de alto teor glicose, muito utilizados em laticínios, confeitaria, panificação e na indústria de refrigerantes (PIVARNIK et al., 1995). Muitos estudos também demonstram a oportunidade de hidrolisar o soro de queijo usando β -galactosidase para produção de galactooligossacarídeos (FODA; LOPEZ-LEIVA, 2000; NOVALIN et al., 2005).

1.3 Imobilização de enzimas

De acordo com Chibata (1978), uma enzima imobilizada é definida 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”. Um dos primeiros relatos sobre a utilização de enzimas imobilizadas, de 1916, é sobre a imobilização de invertase em $\text{Al}(\text{OH})_3$ e em carvão (CAO, 2005a). Na década de 50 houve considerável difusão dessa técnica, mas foi a partir da década de 70 que houve grande crescimento tanto do número de artigos publicados como do número de patentes registradas referentes ao emprego de enzimas imobilizadas (ROSEVEAR, 1984). Em 1997, estimava-se que existiam cerca de 25000 enzimas na natureza, e destas, 3000 já haviam sido identificadas e apenas 10% encontravam-se disponíveis comercialmente (FABER, 1997).

Enzimas são catalisadores de reações e diferentemente da grande maioria dos catalisadores inorgânicos, possuem a vantagem de serem facilmente encontradas na natureza e apresentarem maior atividade catalítica e alta especificidade, além de uma maior sensibilidade ao controle catalítico (OLIVEIRA, 2007). Apesar das inquestionáveis vantagens, existem alguns problemas práticos no uso de enzimas, como exemplo, o alto custo para seu isolamento e purificação, a instabilidade de suas estruturas, uma vez que são isoladas de seus ambientes naturais, e sua sensibilidade às condições que são diferentes de suas ótimas e à substâncias que podem atuar como inibidores. Além disso, muitas enzimas operam dissolvidas em sistemas homogêneos, podendo contaminar o produto, e, como regra, não podem ser recuperadas em sua forma ativa para posterior reutilização (KRAJEWSKA, 2004).

Muitos métodos têm sido propostos para superar essas limitações, sendo a imobilização de enzimas o de maior sucesso (GROSOVÁ et al., 2008; GIACOMINI et al., 1998; REJIKUMAR; DEVI, 2001). Mimetizando o modo natural de ocorrência em células vivas, onde a maioria das enzimas está ligada às membranas celulares, a imobilização estabiliza a estrutura da enzima e, conseqüentemente, sua atividade. Assim, comparadas às enzimas livres, enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes às mudanças no ambiente (KRAJEWSKA, 2004).

De acordo com vários autores (SHULER; KARGI, 1992; KRAJEWSKA, 2004; GROSOVÁ et al., 2008), podemos apresentar algumas das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas:

- 1 - Facilidade na recuperação da enzima e produtos;

- 2 - Reutilização do suporte e redução de custos com o processo contínuo;
- 3 - Facilidade na interrupção das reações enzimáticas;
- 4 - Grande variedade de desenhos de reatores com enzimas imobilizadas;
- 5 - Em muitos casos, melhora do desempenho do biocatalisador.

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

1.3.1 Métodos de imobilização de enzimas

Mais de 5000 trabalhos, incluindo patentes, têm sido publicados sobre técnicas de imobilização de enzimas. Centenas de enzimas têm sido imobilizadas de diferentes formas e aproximadamente uma dúzia delas (amino acilase, penicilina G acilase, lipases, proteases, nitrilase, amilase, invertase, etc.) são cada vez mais usadas como catalisadores indispensáveis em muitos processos industriais (CAO, 2005a). Embora os métodos básicos de imobilização possam ser categorizados em alguns métodos apenas, muitas variações baseadas em combinações desses métodos originais têm sido desenvolvidas (KATZBAUER, 1995).

Considerando enzimas solúveis e de acordo com Mosbach (1980), os métodos básicos possíveis de imobilização são:

Adsorção – É o mais simples e antigo método de imobilização de enzimas em suportes. A imobilização por adsorção é baseada em interações físicas fracas entre o biocatalisador e o suporte (van der Waals, pontes de hidrogênio). Apesar de sua simplicidade, este método de imobilização é limitado pela tendência de desorção da enzima do suporte e por ser sensível às condições do ambiente, como temperatura e concentração de íons (TANAKA; KAWAMOTO, 1999 citado por GROSOVÁ et al., 2008). Para aumentar a estabilidade das enzimas adsorvidas, uma etapa de entrecruzamento pode ser adicionalmente utilizada. Isto

implica a formação de ligações intermoleculares entre os grupos que pertencem a enzima usando reagentes bifuncionais como o glutaraldeído (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Embora existam muitas classificações de enzimas imobilizadas por métodos não-covalentes, como exemplo, adsorção física não-específica, ligação iônica, coordenação (efeito quelante) e adsorção por afinidade, a imobilização não-covalente de enzimas a um suporte pode ser classificada nas seguintes categorias (CAO, 2005a):

- 1 - Adsorção física não-específica, na qual a enzima é adsorvida por forças não-específicas, como van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofílicas;
- 2 - Adsorção bio-específica, normalmente utiliza ligantes para adsorção de enzimas;
- 3 - Adsorção por afinidade em corantes ou metais imobilizados;
- 4 - Interação eletrostática (também ligação iônica), baseada na interação carga-carga entre o suporte e a enzima;
- 5 - Interação hidrofóbica, baseada na interação hidrofóbica entre regiões hidrofóbicas da enzima e do suporte.

Um exemplo da utilização do método de adsorção é a imobilização de β -galactosidase por adsorção física em cerâmica porosa e entrecruzamento intermolecular com glutaraldeído apresentando boa estabilidade operacional por até 135 dias de operação contínua (PAPAYANNAKOS; MARKAS, 1993).

Ligação Covalente – Este é o método mais utilizado para imobilização de β -galactosidase. Geralmente envolve dois passos, a ativação do suporte e a ligação da enzima ao suporte. Esta ligação ocorre entre um grupo nucleofílico (geralmente grupo amino) que está presente na enzima e um grupo eletrofílico que é formado no suporte após uma ativação adequada. O suporte deve possuir grupos livres como hidroxila, carboxila, amida ou amina, ou então deve ser modificado para introdução de tais grupos que devem ser ativados para posterior imobilização da enzima (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Comparado a outras técnicas, a imobilização covalente de enzimas tem as seguintes vantagens: a enzima não se solta do suporte, interage facilmente com o substrato desde que esteja na superfície do suporte. Por outro lado, a maior desvantagem são os altos custos e em alguns casos, o baixo rendimento, devido à exposição da enzima a reagentes tóxicos ou condições severas de reação (TANAKA; KAWAMOTO, 1999 citado por GROSOVÁ et al., 2008). Além disso, depois da perda de atividade da enzima imobilizada, o suporte não pode ser reutilizado para uma nova imobilização, uma vez que, normalmente, a enzima inativa não pode ser separada do suporte.

Existem muitos procedimentos para estabelecer ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Segundo Cao (2005a) algumas classes de reações utilizadas são:

- 1 - Diazotização
- 2 - Formação de ligação amida (peptídica)
- 3 - Alquilação ou arilação
- 4 - Formação de base de Schiff
- 5 - Reação de Ugi

A estabilidade da enzima imobilizada pode ser aumentada se a imobilização covalente ocorrer em suportes altamente ativados com espaçadores curtos e envolvendo múltiplos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (figura 1). Essa ligação covalente multipontual promove a rigidificação da estrutura da enzima imobilizada e reduz as mudanças conformacionais envolvidas na sua inativação (MARTINEK et al., 1977, MOZHAEV et al., 1990). Embora a imobilização possa ser feita a valores neutros de pH, a incubação a pHs alcalinos, onde a reatividade dos nucleófilos da proteína (geralmente lisina) pode ser aumentada, é conveniente para alcançar uma intensa reação entre a enzima e o suporte. Deve-se ter em mente que enquanto o pK dos grupos amino terminais da proteína é entre 7 e 8, os grupos de Lis expostos terão um pK acima de 10,5 (MATEO et al., 2007b). Além disso, a imobilização por grupos epóxi do suporte é geralmente utilizada uma vez que tais grupos são relativamente estáveis, podem se ligar à lisina e reagem em condições moderadas (MATEO et al., 2007c).

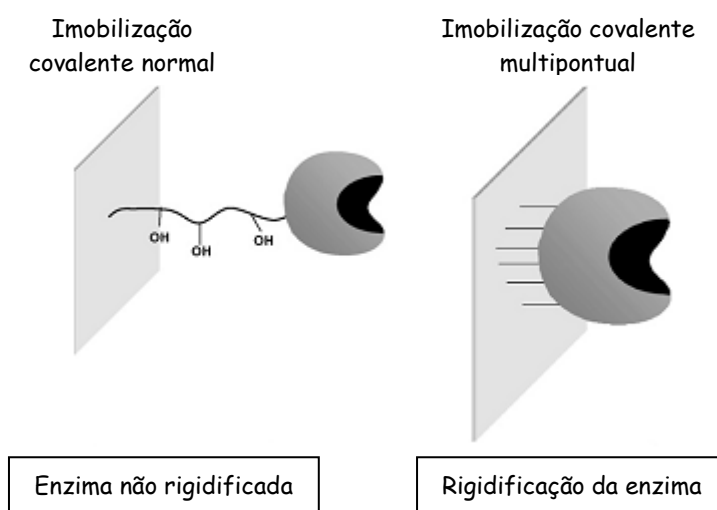


Figura 1 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.
Fonte: MATEO et al., (2007c)

Como exemplo de ligação covalente, pode-se citar a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em placas de grafite através da formação da base de Schiff entre grupos ativados da superfície do suporte e a enzima utilizando glutaraldeído para promover o entrecruzamento. A imobilização aumentou a estabilidade térmica e deslocou o pH ótimo para valores mais alcalinos (7,7) comparado com a enzima livre (6,6) (ZHOU; CHEN, 2001).

Inclusão – As enzimas podem ser aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, micro cápsulas, fibras, filmes ou membranas. Um procedimento comum é preparar a solução contendo a enzima e o material polimérico e na seqüência utilizar uma técnica (secagem, polimerização) para coagular o material polimérico contendo a enzima na forma desejada. Em alguns casos, uma etapa de entrecruzamento adicional é necessária para garantir a imobilização (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Este método é geralmente aplicado a substratos de baixo peso molecular para permitir a livre difusão entre estes e os produtos. A maior desvantagem desta técnica é a possível perda de enzima, devido à suas pequenas dimensões moleculares, através da difusão durante repetidos usos, mesmo que a matriz possua pequenos poros (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008).

De acordo com Tanaka; Kawamoto (1999) citado por Grosová et al., (2008), a imobilização por inclusão pode ser classificada em cinco tipos:

- 1 - Malhas;
- 2 - Micro cápsulas;
- 3 - Lipossomas;
- 4 - Membranas;
- 5 - Micelas.

Para imobilização de β -galactosidase, o método de malhas é o mais amplamente utilizado. A enzima é aprisionada dentro da matriz de vários polímeros sintéticos ou naturais. O alginato, um polissacarídeo de ocorrência natural que forma géis por gelificação ionotrópica, é o polímero mais utilizado (GROSOVÁ et al., 2008). Mammarella; Rubiolo (2005) imobilizaram β -galactosidase de *K. fragilis* em gel de alginato e carragena formando esferas. A presença da κ -carragena teve influência positiva na reação enzimática, uma vez que o gel é formado com íons K^+ que melhoram a atividade enzimática.

Outro método bastante utilizado de inclusão é pela utilização de matrizes de sílica sol-gel formada por polimerização hidrolítica. Reetz; Jaeger (1998) usaram precursores

alquilsilano ($\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$) ou suas combinações [$\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ e $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$] para promover a inclusão da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* na matriz sol-gel. Ajustando as condições de polimerização, alguns parâmetros como porosidade do polímero, rede estrutural e tamanho de partícula podem ser modificados.

Similar à inclusão, a encapsulação protege a enzima do meio externo, porém, tem limitada aplicação, uma vez que substratos maiores estão sujeitos a limitações difusionais (LALONDE; MARGOLIN, 2002). Zhang et al., (2008, 2009) desenvolveram um método de imobilização em camadas por inclusão e encapsulação (figura 2) no qual a enzima β -glicuronidase foi misturada com carboximetilcelulose e CaCl_2 . A solução foi gotejada em uma solução de alginato a 1% (w/v). As cápsulas formadas foram deixadas reagir com protamina (pequena proteína rica em arginina) que, sendo muito grande para entrar na cápsula, foi ionicamente associada à superfície do alginato. A protamina precipitou os silicatos na superfície para formar uma casca rígida para as cápsulas, prevenindo seu inchaço ou compressão.

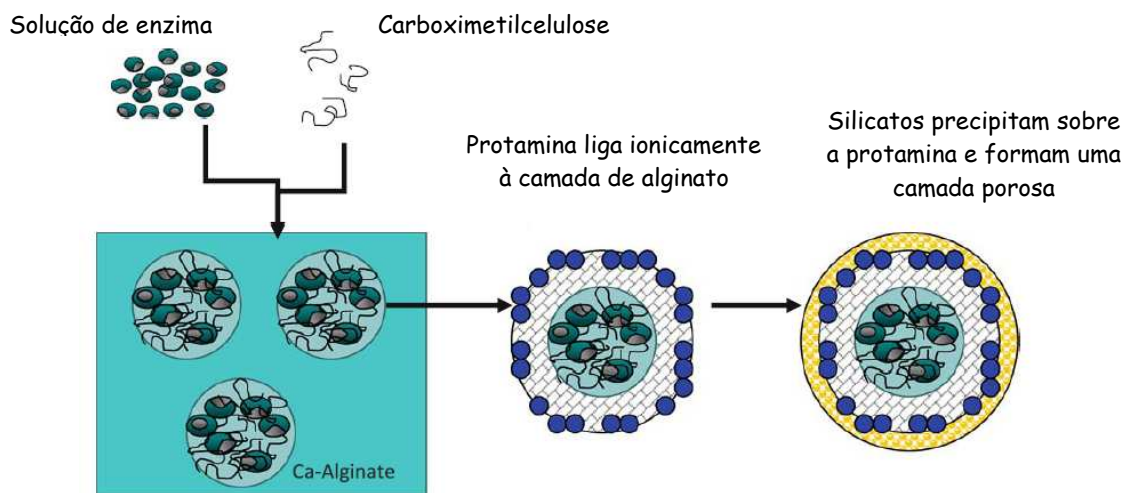


Figura 2 - Método multi-camada de encapsulação.

Fonte: Zhang et al., (2008).

Entrecruzamento - Formação de uniões intermoleculares entre as enzimas, gerando ligações irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. Essas ligações podem ser apenas entre as enzimas ou entre a enzima e um segundo composto (chamada co-entrecruzamento), como exemplo: a cristalização de enzimas e co-entrecruzamento com albumina). O co-entrecruzamento é indicado quando há efeitos difusionais causados pelo entrecruzamento, aplica-se então uma segunda proteína não enzimática como a albumina

(OLIVEIRA, 2007). Para imobilização de β -galactosidase, o entrecruzamento é utilizado geralmente em combinação com outros métodos, principalmente adsorção e inclusão (GROSOVÁ et al., 2008).

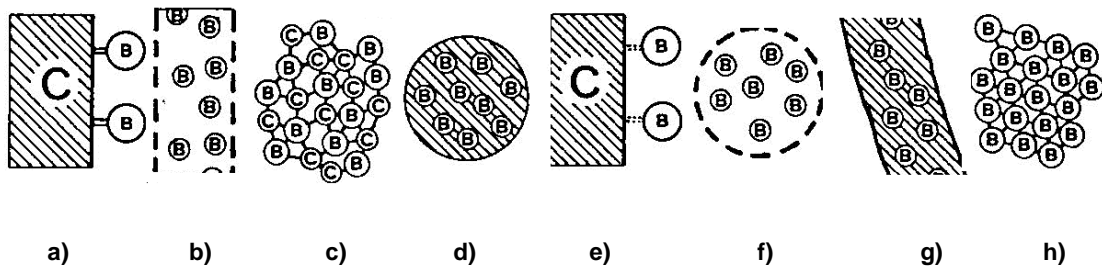


Figura 3 - Representação de algumas formas de imobilização de enzimas. a) ligação covalente, b) fibra, c) co-entrecruzamento, d) inclusão em esferas de gel, e) forças iônicas, f) micro-encapsulação, g) inclusão em filme gel, h) entrecruzamento.

Fonte: Oliveira (2007).

1.3.2 Suportes para imobilização

Correspondentemente às várias técnicas de imobilização de enzimas existentes, muitos suportes têm sido desenvolvidos para este fim. Mesmo não existindo um suporte universal, existem certas características a serem consideradas para sua escolha:

- 1- Estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano;
- 2- Funcionalidade química;
- 3- Durabilidade e capacidade de reutilização;
- 4- Elevada área superficial e alta porosidade;
- 5- Compatibilidade aceitável com a enzima e substrato;
- 6- Tamanho e forma adequados;
- 6- Custo;
- 7- Facilidade de manuseio.

Para se obter uma imobilização eficiente é indispensável conhecer previamente as características da enzima, do suporte e das possíveis interações entre eles. Se a interação da enzima com o suporte não for estável o suficiente, pode vir a ocorrer, por exemplo, perda de enzima para o meio ao longo do processo. Ou ainda, se a afinidade da enzima com o suporte

for maior do que com o substrato a eficiência do processo estará comprometida (LASKIN, 1985).

Os suportes sólidos podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, porém esta classificação não é muito adequada, pois não se considera nem a área superficial e nem o tamanho de poros, propriedades que afetam consideravelmente a carga protéica do suporte. Assim, baseando-se em sua morfologia e de acordo com Cabral; Kennedy (1991), os suportes podem ser classificados como:

Suportes não-porosos: Geralmente apresentam mais desvantagens do que vantagens. Sua área superficial é muito baixa e, portanto, está limitada a área de imobilização. Para aumentar esta superfície, pode-se trabalhar com partículas muito finas, porém, com a desvantagem de ser difícil sua separação do sistema e de não poder trabalhar em sistemas contínuos do tipo coluna, uma vez que não suportam altas pressões sem se compactar, nem em leitos fluidizados, pois está limitada a velocidade de fluxo. Possuem, ao contrário, a vantagem de não apresentarem problemas difusionais, uma vez que a enzima é imobilizada na superfície externa do suporte.

Suportes porosos: Apresentam uma grande área superficial por unidade de peso, o que aumenta sua capacidade de imobilização. A principal desvantagem é que a maior área disponível é a interna, e, por isso, aumentam os problemas de difusão. Para superar tais problemas, existem suportes de poro controlado, de forma que é possível selecionar o suporte mais adequado de acordo com o tamanho da enzima, substrato e produto. De modo geral, os poros de determinado suporte devem ser da mesma ordem de grandeza da enzima ou maior, para que a mobilidade da enzima não seja significativamente diminuída (CAO, 2005a). Em um amplo estudo realizado por Artyomova et al., (1986), a máxima capacidade para a imobilização de várias enzimas e proteínas foi obtida quando o tamanho do poro das sílicas utilizadas como suporte excederam de 5 a 10 vezes o tamanho do glóbulo protéico.

Muitos suportes porosos podem ser classificados com géis. Por serem elásticos, podem assumir a conformação mais adequada (membranas, partículas), porém seus poros são deformáveis e se compactam em altas pressões.

Os suportes podem também ser classificados como orgânicos e inorgânicos (CABRAL; KENNEDY, 1991; HULTIN, 1983):

Suportes orgânicos:

·Polímeros naturais: polissacarídeos como celulose, amido, ágar, agarose, alginatos, carragena, quitosana, etc.

·Polímeros sintéticos: poliestireno, poliacrilatos, poliacrilamida, álcool polivinílico, poliamidas, etc.

·Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, seda, queratina, etc.

Suportes inorgânicos:

·Minerais: bentonita, pedra pomes, areia, titânio, celite, etc.

·Manufaturados: óxidos metálicos, vidro de porosidade controlada, cerâmicas, géis de sílica, etc.

Dentre os suportes orgânicos, a kappa-carragena, quitosana, e alginato são indicados por seu baixo custo, segurança e bom potencial de uso, apesar de apresentarem baixa resistência mecânica. O alginato é uma das matrizes orgânicas mais empregadas conforme citações de Hulst; Tramper (1989) e Cheetam (1979). Nestes mesmos trabalhos são apresentadas as vantagens de sua utilização: baixo custo, fácil manuseio, boa reprodutibilidade e uniformidade de gel. Mas também a sua desvantagem principal é apresentada: o decréscimo de sua estabilidade mecânica com o tempo de uso (BRUKE, 1984).

A celulose é um polímero natural que também tem sido relatada como um atrativo suporte para imobilização de enzimas uma vez que é atóxico, biocompatível, é geralmente obtido de fontes renováveis, possui boas propriedades mecânicas e é susceptível a funcionalização química (VIGO, 1998). Em trabalhos recentes, a celulose tem sido modificada através de reações em líquidos iônicos. Líquidos iônicos são sais orgânicos que são líquidos a temperatura ambiente, e, diferentemente dos solventes tradicionais, que podem ser descritos como líquidos moleculares, líquidos iônicos são compostos por íons. Propriedades como não-inflamabilidade, não-volatilidade, excelente estabilidade química e térmica e capacidade de dissolver uma série de compostos químicos fazem dos líquidos iônicos uma alternativa atrativa aos convencionais solventes orgânicos (YANG; PAN, 2005). Turner et al., (2005) utilizaram o líquido iônico [C₄mim]Cl para dissolução e regeneração de celulose microcristalina para obter filmes transparentes e esferas contendo funções amina para promover uma superfície reativa para imobilização de lacase. Recentemente, Gelesky et al., (2009) adicionaram o líquido iônico 1-*n*-butil-3-metilimidazolium bis(trifluorometano sulfonil)imide (BMI.(NTf)₂) em xarope de acetato de celulose obtendo filmes de celulose com alta flexibilidade, menor viscosidade e melhor formabilidade, devido provavelmente ao aumento na separação entre as macromoléculas de celulose.

Os suportes inorgânicos são bastante adequados para imobilização de enzimas, pois permitem maior variação de parâmetros de processo devido a sua maior resistência química,

física, térmica e microbiológica. Gaspari et al., (1999) imobilizaram a enzima inulinase em diferentes suportes como quitina, alginato de sódio e de cálcio, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada. A sílica de porosidade controlada apresentou os melhores resultados devido a uma maior estabilidade e resistência física comparada aos outros suportes avaliados. A sílica pode ser um dos mais indicados suportes inorgânicos, porém, tem como desvantagem seu alto custo.

1.3.3 Efeitos da imobilização

A imobilização de uma enzima é obtida mediante uma suspensão da enzima em solução tampão adequada e o suporte. O suporte e a enzima não são superfícies complementares e logo após a primeira ligação entre eles, a enzima perde flexibilidade. Quando a enzima está em solução, ela se comporta como qualquer outra molécula dispersa no meio e tem total liberdade de movimento e acesso ao substrato, o que não é possível quando esta enzima está imobilizada em um suporte físico (BICKERSTAFF, 1997). O ambiente onde a enzima se encontra imobilizada é consideravelmente diferente do ambiente onde ela é naturalmente encontrada e assim, os componentes deste novo ambiente podem de alguma forma interferir em sua atividade (WISEMAN, 1985). Assim, é um grande risco supor que após a imobilização todas as enzimas estarão perfeitamente viáveis.

Resultados como o de Cabral et al., (1993) onde a ação da enzima frutossiltransferase na obtenção de frutooligossacarídeos é relativamente menor sob a forma imobilizada do que livre no meio são comumente encontrados. Ou ainda, estudos como o de Manolov et al., (1993), no qual a enzima pululanase imobilizada em quitosana apresentou o mesmo valor de pH ótimo, comparada com a sua forma livre e com relação a temperatura, a imobilização causou uma diminuição de 5°C no valor ótimo.

Muitas vezes a baixa eficiência obtida por determinado método de imobilização não é necessariamente um problema quando as repetidas reutilizações da enzima imobilizada podem compensar por isto. Como exemplo, podemos citar o trabalho de Carpio et al., (2000), onde a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* via adsorção em pó de osso apresentou um alto rendimento de imobilização (83%), porém a enzima imobilizada perdeu continuamente sua atividade e somente 20% de sua atividade inicial foi mantida após quatro sucessivas

reutilizações em batelada. Por outro lado, β -galactosidase imobilizada em fibras compostas de alginato e gelatina utilizando glutaraldeído pra promover o entrecruzamento reteve apenas 56% de sua atividade, porém foi ativa durante 35 dias sem perda de atividade (TANRISEVEN; DOGAN, 2002).

Efeitos negativos não devem ser encarados como um fracasso da metodologia e sim avaliados e considerados no processo como um todo, mais uma vez cabe ressaltar que não existe um método totalmente eficaz para nenhuma enzima ou suporte (FABER, 1997; WISEMAN, 1985; ROSEVEAR, 1984).

Algumas técnicas de pós-imobilização podem aumentar a estabilidade da enzima imobilizada. Entre elas, o bloqueio do excesso de funcionalidades ativas tem se mostrado eficiente, uma vez que altera a natureza do microambiente da enzima imobilizada (CAO, 2005b). Entretanto, o efeito estabilizante pode estar relacionado à natureza (carregada ou neutra) dos reagentes utilizados (PARK et al., 2003).

Da mesma forma como ocorre o entrecruzamento na enzima livre, a enzima imobilizada também pode sofrer entrecruzamento inter ou intramolecularmente para melhorar sua estabilidade conformacional e sua termoestabilidade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1995). Recentemente, catalase de fígado bovino, uma enzima tetramérica bastante lábil, imobilizada covalentemente em glioxil agarose altamente ativada foi significativamente estabilizada com dextrano-aldeído (dextrano parcialmente oxidado). Esta enzima é geralmente dissociada em soluções diluídas e não pode ser eficientemente estabilizada por uma imobilização covalente normal devido à limitada ligação multipontual (BETANCOR, 2003). O uso de dextrano-aldeído pode intensificar a ligação multipontual e criar um microambiente favorável. Este método tem sido bastante aplicado a enzimas como glicose oxidase, D-aminoácido oxidase e tripsina (BETANCOR, 2004). Uma maior estabilidade tem sido obtida com todas estas enzimas imobilizadas.

2 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos a serem submetidos para publicação nas revistas *Biotechnology Techniques* e *International Journal of Food Science & Technology*. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos, já formatados de acordo com as normas das respectivas revistas.

2.1 Application of a silica based hybrid material as a support for β -galactosidase immobilization

Application of a silica based hybrid material as a support for *β -galactosidase immobilization*

Manuela Poletto Klein¹; Michael Ramos Nunes²; Plinho Francisco Hertz¹; Edilson V. Benvenuti², Tania M. H. Costa², Jeverson Frazzon^{1*}

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 15090, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

²LSS, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 15003, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

A silica based hybrid material containing a cationic organic group covalently linked was used to immobilize the enzyme *β -galactosidase* by adsorption. The immobilization efficiency was found to be high, namely 74%, when the lowest enzyme load was applied to the support. K_m value for the immobilized enzyme was found to be of seven folds for the free enzyme. Optimal pH and temperature for enzyme activity did not change after immobilization. The degree of lactose hydrolysis was approximately 90.9% at 35°C over a period of 2.5 h at its first use. At the end of the last use (4th), the enzyme was able to convert 13% of the substrate in the same conditions described above.

Key words: *β -galactosidase*, immobilization, silica based hybrid material

*Corresponding author: jeverson.frazzon@ufrgs.br

Introduction

The enzyme β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), also called lactase, is responsible for the hydrolysis of the disaccharide lactose present in abundance in both milk and milk whey, leading to the formation of two monosaccharides, glucose and galactose, which are more digestible when compared to lactose. This would allow people with lactose intolerance to consume dairy products without having adverse effects.

Some great advantages of using immobilized enzymes when compared with their free form are the possibility of reusing the immobilized biocatalyst and the existence of a better control of the whole process, which allows an easy separation of the immobilized enzyme from the medium reaction, avoiding the contamination of the products with the enzyme. In many cases, the immobilization process can improve the operational stability of the enzyme, making possible the development of systems of continuous operation (Krajewska 2004). Thus, a variety of techniques and materials have been developed for the immobilization of enzymes.

It's possible to combine, at a molecular or nanometric level, organic and inorganic components to generate new materials which are known as organic inorganic hybrids. Hybrid materials that present silica as an inorganic component is highly important often studied and technologically applied (Benvenuti *et al.* 2009). The preparation of these hybrids enables a major control of the chemical processes involved during gelation reactions. This feature is due to the fact that the silicon alkoxide precursors have slow kinetics in the reactions of gelation (Brinker & Scherer 1990). Thus, it is possible to interfere in the system and architect of properties of the materials, for example, size and shape of particles, volume and size of pores (Benvenuti *et al.* 2009), which are essential characteristics for immobilization of enzymes.

Recently, many organofunctional groups have been bonded to silica matrix for application in ion-exchange processes. Materials with these organic groups covalently linked to the silica matrix combine physical properties of a glass, such as thermal stability and rigidity with the exchange properties of the organofunctional groups (Lin *et al.* 2006, Kanungo & Collinson 2005, Lin *et al.* 2004).

A newly synthesized hybrid material containing the double charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride organic group bonded to the silica framework presented good chemical stability and interesting results for adsorption of the hexacyanoferrate anionic complex by an anion exchange process, where their electrochemical behavior was studied by

cyclic voltammetry (Arenas *et al.* 2006). In the same way, this material was successfully used as adsorbent for organic dyes (Arenas *et al.* 2008a). These recent studies encouraged us to test the immobilization, via adsorption, of the enzyme β -galactosidase to this hybrid material to make their reuse possible in the lactose hydrolysis process.

Materials and methods

The β -galactosidase used in this study was Maxilact LX 5000, a liquid preparation of yeast lactase derived from *Kluyveromyces lactis*, purchased from Globalfood (Brazil). The protein content, determined by the Lowry assay, was 48mg/ml. ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) and lactose was obtained from Sigma-Aldrich. Glucose determination kit was purchased from Reacur (Reactivos del Uruguay, Uruguay). The support applied to this study was the hybrid based silica xerogel sample containing 80% molar of double charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group. All other chemicals used here were of reagents or analytical grades.

Synthesis of the hybrid material

Firstly, the 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (dabco), previously sublimed, was dissolved in dimethylformamide (DMF), afterwards, it was added the 3-chloropropyltrimethoxysilane (CPTMS) in the stoichiometric ratio of 1:2. The mixture was stirred up for 72 h, under argon atmosphere at 90 °C. The settling down white powder was washed with methanol and dried at 90°C for 2h. This resulting solid, di-3-n-propyltrimethoxysilane (1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane) dichloride was assigned as (R₂dabco)Cl₂ (Arenas *et al.* 2008b).

Starting from the organic precursor (R₂dabco)Cl₂, a hybrid silica based xerogels was synthesized. A solution containing the organic precursor was dissolved in a mixture of 25 mL of formamide, water and 0.1 mL of HF (48%) at 60 °C. At this solution, it was added, by dropping under stirring, a freshly prepared inorganic precursor solution containing tetraethylorthosilicate (TEOS), water and 7.0 mL of ethylic alcohol. The resulting solutions were left to gelation and solvent evaporation during 30 days at 40 °C, just covered in the

absence of sealing. The obtained solids were washed with ethylic alcohol and dried at 90 °C for 2 h (Arenas *et al.* 2008b).

Enzyme immobilization

The hybrid material used as a support for enzyme immobilization was previously equilibrated with phosphate-potassium buffer 0.1M, pH 7.0 with 1.5 mM MgCl₂ (activity buffer) and dried overnight at 37°C. The support (1g) was submerged in an enzyme solution (5mL), which was prepared using the same buffer. This solution was incubated at 4°C for 2 hours under gentle agitation. The excess of the enzyme was removed by successive washings with buffer, until there was no more activity was detected in the washing fractions. The effect of the load enzyme was evaluated in two concentrations, 0.3 and 1.2 mg/mL of protein, corresponding to 238U and 1173U of enzyme.

Measurement of enzyme activity

The β -galactosidase activity in solution was assayed at room temperature (24°C), using the chromogen ONPG as substrate. An aliquot of enzyme solution (0.1 ml) was added to 0.9 mL of ONPG in activity buffer (end ONPG concentration 14 mM). The released *o*-nitrophenol (ONP) was determined spectrophotometrically at 415 nm. The immobilized enzyme activity was assayed by incubating a suitable aliquot of this derivative with 1 mL of ONPG (14 mM) during 1 min. The absorbance was read at 415 nm upon addition of 3 mL borate buffer pH 9.8. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme which catalyses the conversion of 1 μ mol of ONPG to *o*-nitrophenol per minute under the conditions stated above. An extinction coefficient for ONPG of $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used.

The protein content of the enzyme solutions were determined by the Lowry assay at 750 nm using BSA as the standard. The immobilized protein was estimated as the difference between the amount of protein applied to the support and the amount recovered from the pooled supernatant and washing fractions.

Scanning electron microscopy

The support containing the enzyme was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) in Jeol equipment, model JEOL JSM 6060, with 10 kV and magnification of 750x.

Kinetic parameters (K_m and V_m)

K_m and V_m values for free and immobilized β -galactosidase were determined using varying concentrations of ONPG in the activity buffer. These values were calculated by the Lineweaver-Burk plots.

Optimal temperature and pH for free and immobilized enzyme activity

Optimal pH and temperature for free and immobilized β -galactosidase were evaluated using the 2^2 full factorial central composite design (CCD) and the analysis of response surface. A total of 11 sets of experiments were employed in this study with the objective of determining the significant factors affecting the β -galactosidase activity (table1). The significance of the regression coefficients was determined by Student's *t*-test; the second-order model equation was determined by Fisher's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R^2 . Statistica 7.0 software (Statsoft, USA) was used for regression and graphical analysis.

Table 1) Experimental design and results for free and immobilized β -galactosidase according to the 2^2 full factorial central composite design.

Treatment	Coded setting levels ($x_1 = T$; $x_2 = \text{pH}$)		Actual levels ($X_1 = T$; $X_2 = \text{pH}$)		Free β -galactosidase activity (U/mL)	Immobilized β -galactosidase activity (U/mL)
	x_1	x_2	X_1	X_2		
1	-1	-1	13	5,6	426	25.77
2	1	-1	57	5,6	25,8	6.25
3	-1	1	13	8,4	523	8.39
4	1	1	57	8,4	384	14.35
5	0	0	35	7	19392	126.39
6	0	0	35	7	19620	118.75
7	0	0	35	7	19380	122.66
8	-1,41	0	4	7	1884	21.95
9	0	-1,41	35	5	3,74	14.17
10	1,41	0	66	7	579,33	26.70
11	0	1,41	35	9	1394	26.29

X_1 = temperature ($^{\circ}\text{C}$); X_2 = pH.

Inactivation Kinetics

Inactivation kinetics for free and immobilized β -galactosidase were monitored for 2.5 h at 35 $^{\circ}\text{C}$ and 45 $^{\circ}\text{C}$, using either the immobilized enzyme with low load (32 U/g) or high load (174 U/g). Aliquots of each derivative were incubated for 30, 60, 120, 150 min in capped tubes. At the specified times, they were cooled down to room temperature and the residual activity determined. Similar aliquots of free enzyme solution, containing 24 U, were treated in the same way.

Lactose hydrolysis in batch process

The lactose hydrolysis was evaluated by incubating the immobilized β -galactosidase (56 U), at 35°C, with 20 mL 5 % (w/v) lactose solutions in activity buffer, in Erlenmeyers flasks. Aliquots were taken at different time intervals, filtered and immediately heated for 5 min in boiling water. Lactose hydrolysis was monitored by using glucose-oxidase-peroxidase coupled assay procedure. After its first batch, the immobilized enzyme was incubated repeatedly in the same conditions described above in order to evaluate their reusability.

Results and discussion

Enzyme immobilization

In this study, we used one silica derivative which provides cationic groups on the surface for enzyme adsorption. The enzyme we used here, a β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, presents a pI of 5.1 (Shukla 1975), consequently, the electrostatic factor contributes to the adsorption interaction in the pH range > 5.1 , whereas the molecules are negatively charged above this value. Studies previously published demonstrated that this hybrid silica containing bridged positively charged 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octane chloride group possess the capacity of anionic exchange (Arenas *et al.* 2008a). So, this is a probable mechanism that takes place when the enzymatic solution is kept in contact with the support. At this moment the negatively charged enzyme molecules binds, electrostatically, in the positively charged support.

The activity was found to be varied with enzyme loading on the silica support. The higher the enzyme loading is, the slower the immobilization efficiency gets. As shown in table 2 at the lowest enzyme load the enzyme activity was more preserved, thus 74% of the adsorbed enzyme remained active. Otherwise, immobilization efficiency of the highest enzyme load derivative decreased to 53%. This effect could be attributed to a possible adsorption of the new enzymes molecules onto the previously adsorbed ones rather than onto the support surface, therefore leading to diffusion limitations caused by support overload that

reduces the access of substrate to active sites (Kierstan & Coughlan 1991, Fuentes *et al.* 2001). The immobilization yield increased from 18 to 28% when the enzymatic load was increased.

Table 2: Effect of the load in the enzyme activity.

Applied activity (U/g soporte) ^a	Immobilization yield (%) ^b	Immobilization efficiency (%) ^c
238	18	74
1173	28	53

^aEnzyme units (EU) per gram of dry support

^bCalculated by taking the difference between applied and recovered activity in the supernatant and washings.

^cCalculated using the expression $E_i/(E_A - E_R) \times 100$; where E_A , is total enzyme activity applied in immobilisation, E_i , is immobilized enzyme activity and E_R enzyme activity remaining in solution.

According to the results above, β -galactosidase easily adsorbs in the support resulting in an active immobilized biocatalyst. The simplicity of the physical adsorption used to immobilize the enzyme is an important factor and could make this material suitable for these applications. Scanning electron microscopic (SEM) micrographs taken from the silica after immobilization (figure 1), shows the structure of the used material.

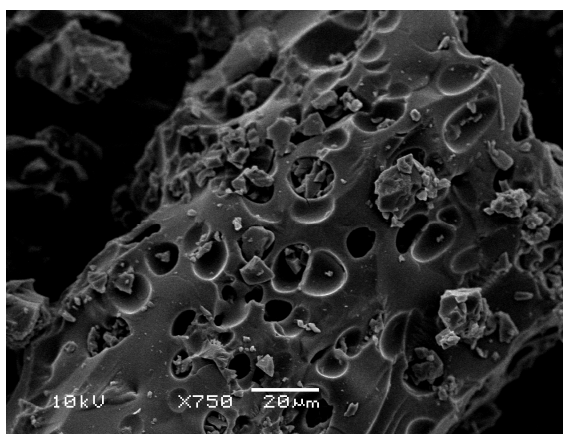


Figure 1) Scanning electron microscopic (SEM) micrographs taken of the support after enzyme immobilization.

Properties of enzyme derivative

Thermal stability - After incubating the low load enzyme derivative for 2.5h at 35°C it lost 65% of its initial activity (figure 2) while the free enzyme has had almost no change in its activity. At 45°C, the free enzyme lost, approximately, 55% of their initial activity while both derivatives were completely inactive. The immobilization process diminished the thermal stability of β -galactosidase, suggesting that the charge-charge interaction of the enzyme with the carrier might induce a less thermo stability when compared to the native enzyme. Another explanation could be attributed to the fact that the commercial lactase contains stabilizing agents, such as glycerol, which can help in the stabilization effect, as it was observed for the free enzyme. After the immobilization process, the enzyme became adsorbed to the support and the stabilizers are lost throughout the successive washings with buffer. In a previous work it was described that the thermal stability of the same enzyme (Maxilact LX-5000) decreased when diluted in deionized water without stabilizers. While commercial lactase diluted in deionized water (95.4 mg/l) presented a half-live at 40°C of 3.7 min, lactase without stabilizers diluted in deionized water (119.25 mg/l lactase), showed a half-live at 40°C of 1.6 min, demonstrating the protector effect of stabilizers in the thermal stability of this enzyme (Cavaille & Combes, 1995).

The remaining activity of high-load derivative was 68% after the same incubation time at 35°C, as shown in figure 2. This observed stabilization effect might be the result of loading excess of enzyme (Brena *et al.* 1993). When stored in the fridge at 4°C for 28 days, the enzyme inactivation was found to be, approximately 25 e 30% for the high load and low load, respectively, as shown in figure 3.

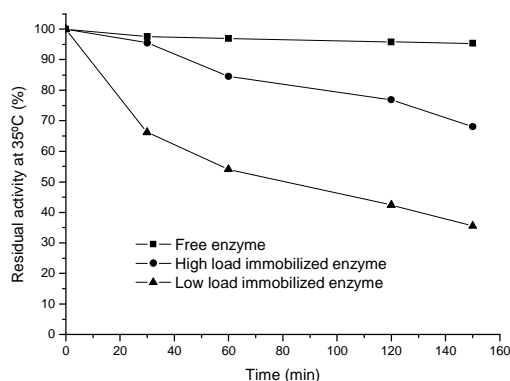


Figure 2) Inactivation kinetics of β -galactosidase at 35°C.

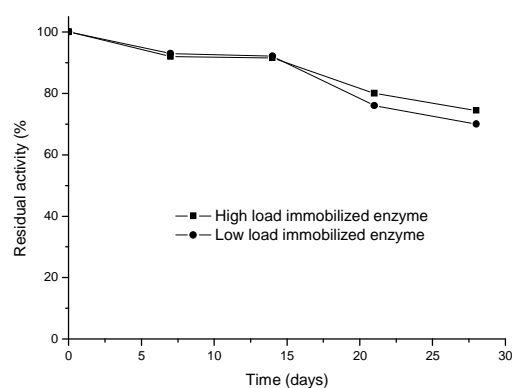


Figure 3) Stability of immobilized enzyme at 4°C.

K_m and V_m - Michaelis-Menten constants, K_m and V_m , for the free enzyme have been determined to be around 1,25 mM of ONPG and 25000 U/mL, respectively. These data are comparable to those reported by other author, where the K_m was reported to be 1.7 mM of ONPG (Cavaille & Combes 1995). In this work, after the enzyme was adsorbed in silica, K_m and V_m was 9,17 mM of ONPG and 344 U/g silica, respectively, and it was determined using the high load derivative. Diffusion effects, caused by the presence of the support may be mainly responsible for the increase in K_m . Another reason for this is the steric factor caused by the neighboring enzyme molecules that could hinder the access of the substrate to some of the active sites causing diffusional constraints (Giacomini *et al.* 1998).

Optimum pH and temperature - The contour plot for free enzyme, generated from the obtained data is presented in the figure 4. In the tested conditions, the maximum enzyme activity was observed in an interval of temperatures of approximately 30-40°C and pHs of 6.7-7.3, covering the central point of the experiment. Therefore, the combination of pH and temperature of the central point (35°C e pH 7) was considered optimum for the performance of the enzyme. This result agree with those reported in the literature for β -galactosidase from *K. lactis*, that is, optimum pH between 6.9-7.3 and optimum temperature between 35-40°C (Shukla 1975, Gekas & López-Leiva 1985).

Some immobilized enzyme systems have been reported to exhibit a change in optimum pH as a result of surface charge effects on local microenvironment (Budriene *et al.* 2005, Lamb & Stuckey 2000). In this work, the immobilization did not shift the position of the optimum pH and temperature of the enzyme, presenting optimum activity (figure 5) at the central point (35°C e pH 7). Similar results were obtained by others authors (Haider & Husain

2007, Tanriseven & Dogan 2002). It's important, in this case, not to change the pH optimum of the adsorbed enzyme, because milk and sweet whey have a neutral pH.

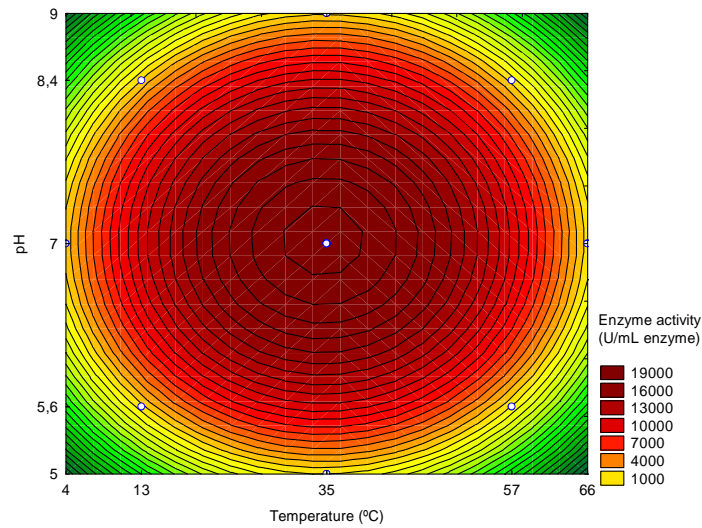


Figure 4) Contour plot to the effect of pH and temperature on the activity of free enzyme.

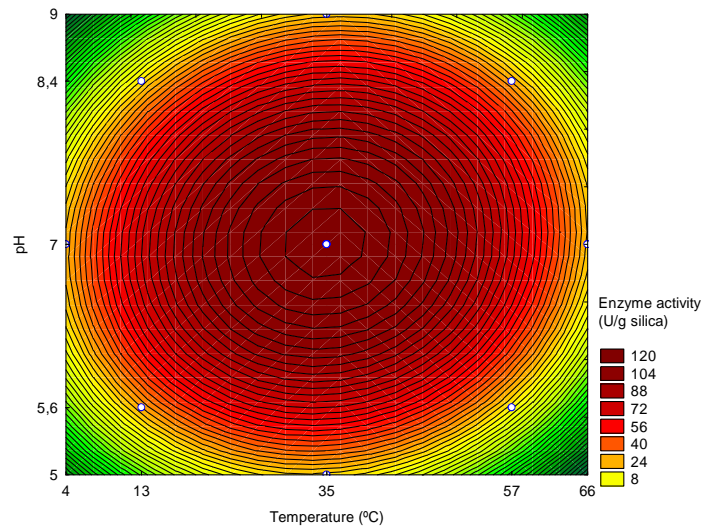


Figure 5) Contour plot to the effect of pH and temperature on the activity of immobilized enzyme

The analysis of the model was carried through the analysis of variance (ANOVA) for the determination of significant parameters and to estimate the activity for free and immobilized β -galactosidase as a function of pH and temperature. The computed F-value for free (715.64) and immobilized (78.12) enzyme activity was higher than the F-value in statistic tables (5.05), indicating that the model was significant at high confidence level (95%). The coefficient of determination R^2 of the model for the activity of the free enzyme was calculated

to be 0.9986 indicating that the model is able to explain 99.86% of the variability in the response. And, for the activity of the immobilized enzyme the R^2 was calculated to be 0.9873 indicating that the model is able to explain 98.73% of the variability in the response. So, the variation considered by the models is significantly superior to the possible random variations. In this work, for the free enzyme, T , pH and second-order T and pH were significant at confidence level of 95% ($p < 0.05$), but the interaction between them have no significant effect on β -galactosidase activity. We proposed then that the second order polynomial model for pH and temperature interactions representing the enzyme activity for free β -galactosidase (Y) should be reduced to:

$$Y = 19466.04 - 298.23x_1 - 9301.23x_1^2 + 302.83x_2 - 9569.22x_2^2 \quad (1)$$

where, Y represents the response variable and x_1 and x_2 represent the studied variables, respectively, temperature and pH in coded values.

For the immobilized enzyme, just second-order T and pH were significant at confidence level of 95% ($p < 0.05$), which indicates that they can act as limiting factors and even small variations in their values will alter β -galactosidase activity to a considerable extent. However, the interaction $x_1 x_2$ ($p < 0.079$) was maintained in the model because of its magnitude. So, we proposed the second order polynomial model for pH and temperature interactions representing the enzyme activity for immobilized β -galactosidase (Y) should be reduced to:

$$Y_i = 122.63 - 51.45x_1^2 - 53.51x_2^2 + 6.37x_1x_2 \quad (2)$$

where, Y represents the response variable and x_1 and x_2 represent the studied variables, respectively, temperature and pH in coded values.

To confirm the applicability of the model, β -galactosidase activity in its free and immobilized forms was determined at 35°C and pH 7, which are the optimum values suggested by it. In this case, the coded settings of the tested variables were $x_1 = 0$ and $x_2 = 0$, respectively, with the model predicting enzymatic activity of 19466.04 U/mL and 122.63 U/g silica for free and immobilized enzyme, respectively. Experimentally, 19386 U/mL and 120.7 U/g silica was obtained for free and immobilized enzyme, respectively, confirming the closeness of the model to the experimental results.

Lactose hydrolysis

Studies of lactose hydrolysis in buffered lactose solutions (5%, w/v) were performed in a batch process by incubating the immobilized β -galactosidase at 35°C. The degree of conversion in its first batch was 90.9% in 2.5h. As shown in figure 6, the rate of lactose hydrolysis decreased with the reuse of the derivative, each cycle requiring longer reaction time to reach the same degree of conversion. At the end of 150 min, the extent of lactose conversion was 64.1, 28.3 and 13% for the successive batches, respectively.

The decrease of the enzymatic activity could be attributed to the weak interactions involved in the mechanism of adsorption and to the inactivation due to the low thermal stability showed by the immobilized enzyme. Also, it can be explained by the pore structure presented by the material used as a support. In a previous work, it was proposed that the pore structure of the hybrid material is imposed by the bridged organic group, which had an estimated length of 1.43 nm (Gushikem *et al.* 2008). β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* is a large molecule (200 KDa) (Cavaille & Combes 1995) and cannot go into these pores, being adsorbed just in the surface of the material and, in this way, the enzyme is more exposed to the conditions of the environment, such as temperature and ions concentrations that could desorb the enzyme weakly adsorbed in the support.

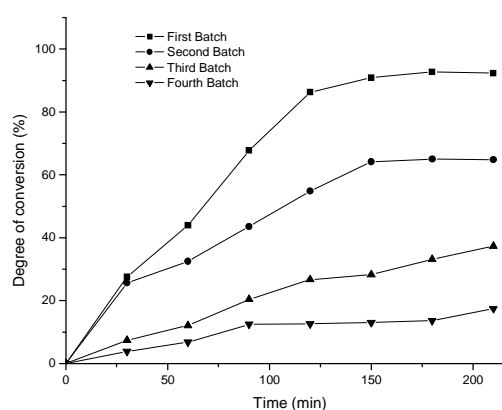


Figure 6) Hydrolysis of buffered lactose solution (5% w/v) at 35°C.

Conclusion

The hybrid material containing the double charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride organic group bonded to the silica framework was tested here for the immobilization of β -galactosidase. The material showed to be able to adsorb the enzyme and the immobilization efficiency was found to be high, around 53 and 74%. The Michaelis-Menten constants, pH and temperature optimum and operational stability of the resultant adsorbed biocatalyst were also determined.

In this work, we also demonstrate the possibility of using the hybrid material as a tool for manufacturing hydrolysed-lactose products, whereas the immobilized enzyme could be used in some batches for lactose hydrolysis despite its low thermo stability. However, we know that it's possible to interfere during the reactions involved in the synthesis of the hybrid material and modify some important properties as volume and size of pores. By increasing the pore size of the material, to match the size of the pore with the size of the enzyme, it could be possible to improve the retention of the enzyme, as well as its thermo stability, since the enzyme could be adsorbed inside the pores and not just in their outer surface. Consequently, this material warrants further modifications that will be carried out by adding surfactants, during the reactions of synthesis, to generate pores presenting a bigger size.

Acknowledgment

The authors thank Dr^a. Simone Hickmann Flôres for her valued contribution in the statistical analysis.

References

Arenas LT, Dias SLP, Moro CC, Costa TMH, Benvenuti EV, Lucho AMS, Gushikem Y (2006) Structure and property studies of hybrid xerogels containing bridged positively charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane dichloride. *J. Col. Interf. Sci.* 297: 244-250.

Arenas LT, Gay DSF, Moro CC, Dias SLP, Azambuja DS, Gushikem Y, Costa TMH, Benvenuti EV (2008a) Brilliant yellow dye immobilized on silica and silica/titania based hybrid xerogels containing bridged positively charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane: Preparation, characterization and electrochemical properties study. *Micropor.Mesopor.Materials.* 112: 273-283.

Arenas LT, Leliz T, Pinheiro AC, Ferreira JD, Livotto PR, Pereira VP, Gallas MR, Gushikem Y, Costa TMH, Benvenuti EV (2008b) Anisotropic self-organization of hybrid silica based xerogels containing bridged positively charged 1,4 diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group. *J. Colloid Interf. Sci.* 318: 96–102.

Benvenuti EV, Moro CC, Costa TMH, Gallas MR (2009) Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Quím. Nova.* 32: 1926-1933.

Brena B, Ovsejevi K, Luna B, Batista-Viera F (1983) Thiolation and reversible immobilization of sweet potato b-amylase on thiosulfonate-agarose. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 84: 381-390.

Brinker CJ, Scherer GW (1990) Sol–Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing, *Academic Press, Inc.: San Diego*.

Budriene S, Gorochovceva N, Romaskevicius T, Yugova LV, Miezeliene A, Dienys, G, Zubriene A (2005) Properties and immobilization. *Cent. Eur. J. Chem.* 3: 95-105.

Cavaille D, Combes D (1995) Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 22: 55-64.

Fuentes IE, Viseras CA, Ubiali D, Terreni M, Alcântara AR (2001) Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 11: 657–663.

Gekas V, López-Leiva M (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* 20: 2-12.

Giacomini C, Villarino A, Franco-Fraguas L, Batista-Viera F (1998) Immobilization of β -galactosidase from *Kluyfomyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 4: 313–327.

Gushikem Y, Benvenuti EV, Kholin YV (2008) Synthesis and applications of functionalized silsesquioxane polymers attached to organic and inorganic matrices. *Pure Appl Chem.* 80: 1593–1611.

Haider T, Husain Q (2007) Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *Internat J. Biol. Macromol.* 41: 72–80.

Kanungo M, Collinson M (2005) Controlling Diffusion in Sol-Gel Derived Monoliths. *Langmuir.* 21: 827-829.

Kierstan MPJ, Coughlan MP (1991) Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications. In: R. F. Taylor eds, *Protein immobilization, fundamentals and applications*. New York: Marcel Dekker, pp.13-71.

Krajewska B (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzym. Microb. Technol.* 35: 126–139.

Lamb SB, Stuckey DC (2000) Enzyme immobilization on colloidal liquid aphrons (CLAs): the influence of system parameters on activity. *Enzyme Microb. Tech.* 26: 574–581.

Lin C, Tien P, Chau L (2004) Electrochemical behavior of an anion-exchanger modified electrode prepared by sol-gel processing of an organofunctional silicon alkoxide. *Electrochim. Acta.* 49: 573–580.

Lin T, LI G, Chau L (2006) Sol-gel monolithic anion-exchange column for capillary electrochromatography. *Anal. Chim. Acta.* 576: 117–123.

Shukla TP (1975) Beta-galactosidase Technology: a Solution to the lactose problem. *CRC, Crit. Rev. Food Technol.* 5: 325-356.

Tanriseven A, Dogan S (2002) A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Process Biochem.* 38: 27–30.

2.2 Immobilization of β -galactosidase in an Ionic Liquid/Cellulose Film

Immobilization of β -galactosidase in an Ionic Liquid/Cellulose Film

Manuela Poletto Klein¹, Carla Weber Scheeren², André Soibelman Glock Lorenzoni¹, Jairton Dupont², Jeverson Frazzon¹, Plinho Francisco Hertz¹

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Catálise Molecular, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

β -galactosidase was immobilized in an ionic/liquid cellulose film that presents properties as increased flexibility and formability that could make possible their use as a coating for many configurations of reactors for enzymatic process. A polyamine was added during the preparation of the film and their presence was detected by infrared analysis. Glutaraldehyde was used to activate the films in order to generate conditions for enzyme immobilization. The immobilization preserved 60% of the initial β -galactosidase activity. The Michaelis-Menten kinetics parameters, K_m and V_m , for immobilized enzyme were estimated to be 11.22 mM of ONPG and 460.83 $\mu\text{mol of ONP min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ enzyme, respectively. No marked shifts in optimum pH and temperature were observed after immobilization. Storage stability was also determined. Highly efficient lactose conversion was achieved in a batch process at 7°C and 35°C and was possible to reuse the immobilized enzyme in 16 repeated cycles, at low temperature, without any drastic decrease in enzyme activity.

*Corresponding author. E-mail: plinho@ufrgs.br

1. Introduction

One of the major applications of enzymes in the food industry is the preparation of lactose-hydrolysed products, using β -galactosidase (EC 3.2.1.23). This enzyme, commonly known as lactase, catalyses the hydrolysis of lactose producing an isomolecular mixture of glucose and galactose. It makes possible the consumption of milk and other dairy products for people with lactose intolerance. Another advantage, related to food technology, is the use of β -galactosidase to process products such as ice-cream, condensed milk and milk sweet, to reduce lactose concentrations thus avoiding the crystallisation of lactose (sandy texture), which improve some technological and sensorial quality of dairy foods as well as digestibility, softness, creaminess, etc. Additionally, the enzymatic lactose hydrolysis can occur with simultaneous formation of galactooligosaccharides (GOS) that can be used as prebiotic food ingredients (Grosová, Rosenberg & Rebroš, 2008). However, the use of β -galactosidase could be limited because of economic considerations, unless it is used in an immobilized form. Immobilized enzymes offer several advantages over their free form equivalent. Examples include better stability, possible reuse, ease in enzyme and product recovery and continuous operation.

A wide variety of materials is being used as support for enzyme immobilization. Typical materials used for these purposes include silica, porous glass, acrylics, agarose, alginate, chitosan, cellulose and others (Grosová, Rosenberg & Rebroš, 2008). Cellulose is the most abundant natural polymer and it exhibits excellent biocompatibility and hydrophilicity. It is also nontoxic, biodegradable and inexpensive, which make it a useful support for enzyme immobilization (Vigo, 1998). Many enzymes and cells have been fixed in fibers, in membranes and in gels of cellulose or cellulose derivatives using different methods (Gemeiner, Stefuca & Bales, 1993) Chemical attachment of enzymes through covalent bonds to the surface of cellulose is the preferred mechanism due to its increased stability.

Ionic liquids are a promising new class of solvents as they are nonvolatile and nonflammable and dissolve a wide range of chemical compounds (Pfruender, Jones, Weuster-Botz, 2006). Some works have reported the use of ionic liquids as a solvent for microcrystalline cellulose with further modification by the introduction of polyamines in the matrix in order to generate conditions for enzyme immobilization (Turner et al., 2005 & Bagheri et al., 2008).

Previous work reported that the introduction of the ionic liquid 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane sulfonyl)imide (BMI.(NTf)₂) in a syrup of cellulose acetate results in films of cellulose with higher flexibility, lower viscosity and better formability probably due to an increase in the separation between the cellulose macromolecules (Gelesky et al., 2009).

So, in this work we use the cellulose prepared with the ionic liquid (BMI.(NTf)₂) and added a polyamine (triethylenetetramine hydrate) to provide amino groups to the cellulose films for further immobilization of β -galactosidase via a conventional coupling by glutaraldehyde.

2. Experimental section

2.1. Materials

β -galactosidase from *K. lactis* (Maxilact LX 5000), was obtained from Globalfood (Brazil). Triethylenetetramine hydrate (98%), ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) and lactose was obtained from Sigma-Aldrich. Glucose determination kit was purchased from Reacur (Reactivos del Uruguay, Uruguay). Cellulose acetate (Aldrich 39.8 %wt of acetylation content) and acetone (Merck, 99.8 %) were used to prepare the cellulose films. Glutaraldehyde 25% is from Nuclear (Brazil). The 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane sulfonyl)imide (BMI.(NTf)₂) ionic liquid was synthesized in our laboratory as previously described in the literature [8]. All other chemicals were purchased from commercial sources and used without further purification.

2.2. Preparation of the amino modified-cellulose films containing BMI.N(Tf)₂

Cellulose films with ionic liquid were prepared according to the procedure described in a previous work (Gelesky et al., 2009). Cellulose acetate (10.0 g) was added to a reaction flask containing 90 mL of acetone and the mixture was allowed to sit for 24 h at room

temperature under a dry nitrogen atmosphere. After viscous syrup was formed, the ionic liquid (1 g) was added to the syrup (5 g, cellulose acetate). To this mixture, 0.2 mg of the triethylenetetramine hydrate dissolved in 2 mL acetic acid was added and magnetically stirred until a homogeneous phase was obtained. Films were prepared by spreading the homogeneous phase over a glass plate. The thickness was controlled to 20 μm by using a spacer. The solvent was evaporated in an open atmosphere.

2.3. Activation of the modified cellulose films and β -galactosidase immobilization

Cellulose films were removed from the glass plate and cut to the size of 1 x 1 cm. Films (50 cm^2) were activated in 25 mL of 2.5% glutaraldehyde solution prepared with 0.1 M phosphate-potassium buffer (pH 7.0), and stirred for 1 h at room temperature. The activated films were extensively washed with the same buffer and immediately incubated in 20 mL of a β -galactosidase solution (1 mg/mL) in 0.1 M phosphate-potassium buffer, pH 7.0, containing 1.5 mM of MgCl_2 (activity buffer) for 15 h at 8°C under slow rotation. After immobilization, excess of enzyme was removed by successive washings with buffer, until no more activity was detected in the washing fractions. Between these washes, immobilized enzyme was washed under conditions to eliminate any protein molecule noncovalently attached to the support (1 M NaCl and 30% ethylene glycol).

2.4. Measurement of free and immobilized enzyme activity

Free and immobilized β -galactosidase activities were measured using the chromogen ONPG as substrate. The measurements were performed in activity buffer at 14 mM ONPG concentration and 35°C. The reaction was stopped by addition of borate buffer pH 9.8. The released *o*-nitrophenol (ONP) was determined spectrophotometrically at 415 nm. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme which catalyses the conversion of 1 μmol of ONPG to *o*-nitrophenol per minute under the conditions stated above. An extinction coefficient for ONPG of $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used.

Protein content of the enzyme solutions were determined by the Lowry assay (Lowry et al., 1951) at 750 nm using BSA as the standard. The immobilized protein was estimated as the difference between the amount of protein applied to the support and the amount recovered in the pooled supernatant and washing fractions.

2.5. Characterization of films

The infrared spectra of the cellulose films were obtained using a Shimadzu FTIR, model 8300. The spectra were obtained at room temperature with a resolution of 4 cm^{-1} and 100 cumulative scans.

2.6. Kinetic parameters (K_m and V_m)

The kinetic parameters, K_m and V_m , for free and immobilized β -galactosidase, were determined using varying concentrations of ONPG in the activity buffer. These values were calculated by the Lineweaver-Burk plots.

2.7. Optimal temperature and pH for native and immobilized enzyme activity

A central composite design (CCD), with $k = 2$, and analysis of response surface was used in order to determine the optimal pH and temperature for free and immobilized β -galactosidase. A total of 11 sets of experiments were employed in this study to determine the significant factors affecting the β -galactosidase activity (table1). The significance of the regression coefficients was determined by Student's t -test; the second-order model equation was determined by Fisher's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R^2 . Statistica 7.0 software (Statsoft, USA) was used for regression and graphical analysis.

Table 1) Experimental design and results for free and immobilized β -galactosidase according to the 2^2 full factorial central composite design.

Treatment	Coded setting levels ($x_1 = T$; $x_2 = \text{pH}$)		Actual levels ($X_1 = T$; $X_2 = \text{pH}$)		Free β -galactosidase activity (U mg^{-1} protein)	Immobilized β -galactosidase activity (U mg^{-1} protein)
	x_1	x_2	X_1	X_2		
1	-1	-1	13	5,6	8,88	56,61
2	1	-1	57	5,6	0,54	20,25
3	-1	1	13	8,4	10,9	20,37
4	1	1	57	8,4	8	61,79
5	0	0	35	7	404	115,12
6	0	0	35	7	408,75	127,38
7	0	0	35	7	403,75	107,88
8	-1,41	0	4	7	39,25	60,64
9	0	-1,41	35	5	0,08	28,31
10	1,41	0	66	7	12,07	15,30
11	0	1,41	35	9	29,04	57,42

$X_1 = \text{temperature } (^{\circ}\text{C})$; $X_2 = \text{pH}$.

2.8. Storage stability of the immobilized enzyme in the fridge

Immobilized enzyme was stored in the fridge at 4°C for 30 days, the remaining enzyme activity were measured with ONPG buffer solution as described above.

2.9. Lactose hydrolysis in batch process

The hydrolysis was carried out in erlenmeyers flasks in the presence of 15 mL of lactose solutions 5 % (w/v) in activity buffer and β -galactosidase immobilized on cellulose films (73U). Samples were withdrawn periodically and analyzed enzymatically for glucose.

The hydrolysis was tested at two different temperatures, at 35°C, the optimum temperature for enzyme activity and at 7°C, to assay industrial conditions. After its first use, the immobilized enzyme was incubated repeatedly in the same conditions described above in order to evaluate their reusability.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of films

The spectra of cellulose acetate films containing ionic liquid (unmodified film) is shown in figure 1. The spectra of the film modified with triethylenetetramine shows, in comparison to the unmodified film, absorptions displayed at 1563 cm^{-1} and 1638 cm^{-1} attributable to amine bands (figure 2). These spectra showed the incorporation of the polyamine in the cellulose films for further attach of β -galactosidase. To extend the molecular spacer and facilitate the attachment of the enzyme, the amino groups on the surface of the films were transformed into aldehyde groups by using glutaraldehyde, a formal methodology to prepare surfaces for immobilization of enzymes. The spectra of “activated film” is shown in figure 3. In this spectra, the 1563 cm^{-1} band did not appear, probably due to the formation of Schiff’s base (C=N).

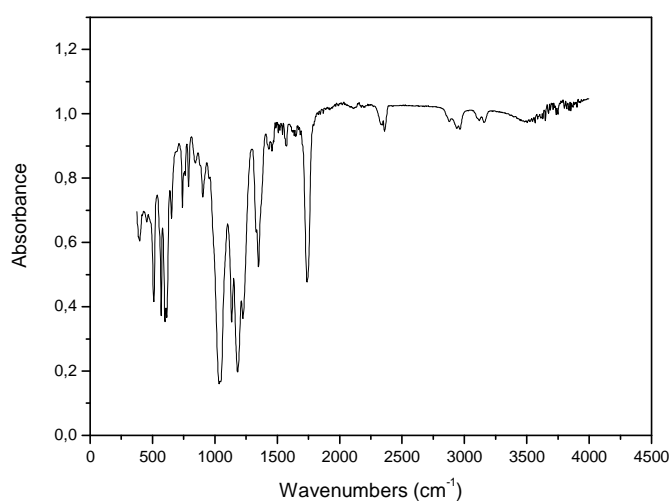


Figure 1: IR spectra of cellulose acetate film containing ionic liquid (unmodified film).

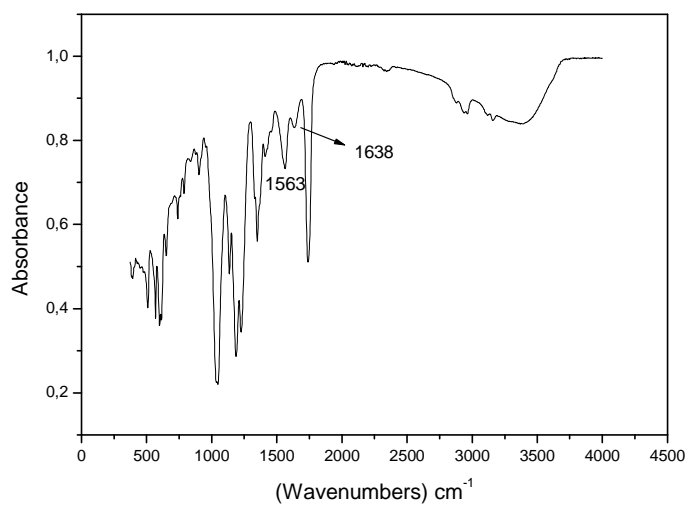


Figure 2: IR spectra of cellulose acetate film containing ionic liquid modified with triethylenetetramine.

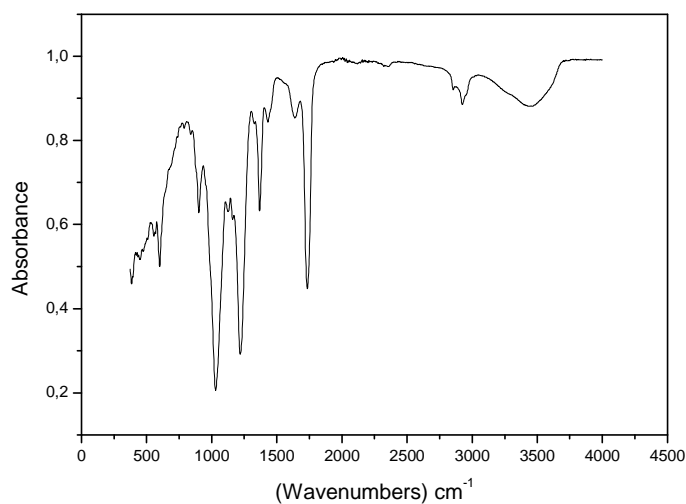


Figure 3: IR spectra of cellulose acetate film containing ionic liquid modified with triethylenetetramine and activated with glutaraldehyde.

3.2 Enzyme immobilization

Activities for free and immobilized β -galactosidase are shown in table 2. The amount of bound protein was 5.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of film, with 40% of lost on the expressed activity.

Table 2: Enzyme activity for free and immobilized β -galactosidase.

Samples	Bound protein ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Specific activity (U/mg enzyme)	Activity retention (%)
Free β -galactosidase		479.16	100
Immobilized β -galactosidase	5.8	287	60

Covalent binding of enzymes has the mainly advantage that enzyme does not detach from the carrier. On the other hand, the major disadvantage is low activity yield owing to exposure of the biocatalyst to severe reactions conditions (Grosová, Rosenberg & Rebroš, 2008), which could explain the fall in activity observed in this work when free and immobilized β -galactosidase were compared. The immobilization method we used, activation of amino-cellulose with glutaraldehyde is based on the idea that one aldehyde group reacts with the amino group on the matrix forming a Schiff's base and the other remains available for further reaction with the amino group from the protein. Proteins are bound irreversibly to the glutaraldehyde-treated carrier by a reaction presumably analogous to that occurring during intramolecular cross-linking with this reagent, which is reported that could be responsible of changes in the protein conformation with a resultant loss of activity (Giacomini et al., 1998).

3.3. Properties of the immobilized β -galactosidase

3.3.1. Kinetics parameters

The activities of free and immobilized enzymes for various substrate concentrations are plotted in Lineweaver-Burk graph of $1/v$ vs. $1/s$ (v = velocity of reaction and s = substrate concentration), from which maximal activities and Michaelis-Menten constants (K_m) values are calculated. As shown in table 3, K_m was affected after immobilization. Diffusion limitation for the reaction caused by the presence of the support and by the mutual interaction between the immobilized proteins may be mainly responsible for the increase in K_m value. When saturated with substrate, the immobilized enzyme showed a little decrease in V_m .

possible due to conformational changes in the enzyme structure after immobilization (Rejikumar & Devi, 2001)

Table 3: Determination of kinetic parameters for free and immobilized β -galactosidase.

Kinetic parameters	Free Enzyme	Immobilized Enzyme
K_m^a	1.25	11.22
V_m^b	531.9	460.83

^amM of ONPG

^b $\mu\text{mol de ONP min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{enzyme}$

3.3.2. pH and temperature optimal

Treatments 5, 6 and 7, which correspond to the central points in the experimental design, showed the highest β -galactosidase activities for free and for immobilized enzymes (table 1). These results suggest that the enzyme has an optimal activity at broad temperature (30-40°C) and pH (6.7-7.3) range (figure 4). Therefore, the combination of pH and temperature of the central point (35°C e pH 7) was considered optimum for the performance of the enzyme, which were within the range reported for others authors for β -galactosidase from *K. lactis* (Gekas & López-Leiva, 1985; Cavaille & Combes, 1995). Immobilization process did not change the pH and temperature optimum for the immobilized enzyme (35°C e pH 7), as we can see in the figure 5.

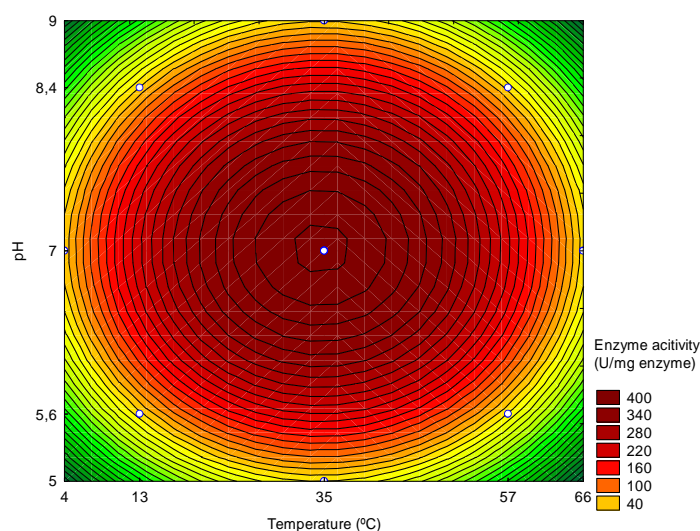


Figure 4) Contour plot for the effects of temperature and pH on free β -galactosidase activity.

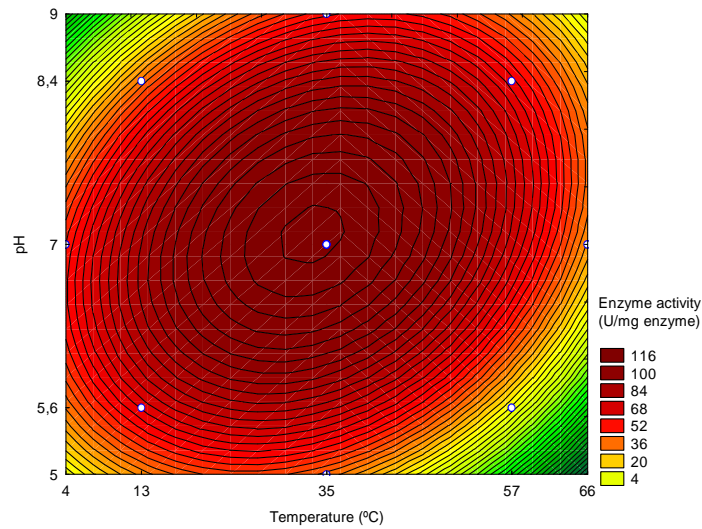


Figure 5) Contour plot for the effects of temperature and pH on immobilized β -galactosidase activity.

The analysis of variance (ANOVA) was used for the determination of significant parameters and to estimate the specific β -galactosidase activity, for free and immobilized enzyme, as a function of pH and temperature. The computed F-value for free (715.64) and immobilized (15.77) enzyme activity was higher than the F-value in statistic tables (5.05), indicating that the model was significant at high confidence level (95%). The coefficient of determination R^2 of the model for the activity of the free enzyme was calculated to be 0.9986 indicating that the model is able to explain a 99.86% of the variability in the response. And, for the activity of the immobilized enzyme the R^2 was calculated to be 0.9404 indicating that the model is able to explain a 94.04% of the variability in the response. So, the variation considered by the models is significantly superior to the possible random variations. In this work, for the free enzyme, T , pH and second-order T and pH were significant at confidence level of 95% ($p < 0.05$), but the interaction between them have no significant effect on β -galactosidase activity. We proposed then that the second order polynomial model for pH and temperature interactions representing the enzyme activity for free β -galactosidase (Y) should be reduced to:

$$Y = 405.54 - 6.21 x_1 - 193.77 x_1^2 + 6.31 x_2 - 199.36 x_2^2 \quad (1)$$

where, Y represents the response variable and x_1 and x_2 represent the studied variables, respectively, temperature and pH in coded values.

For the immobilized enzyme, just second-order T and pH were significant at confidence level of 95% ($p < 0.05$), which indicates that they can act as limiting factors and even small variations in their values will alter β -galactosidase activity to a considerable extent. However, the terms x_1 ($p < 0.168$), x_2 ($p < 0.237$) and $x_1 x_2$ ($p < 0.058$) were maintained in the model because of its magnitude. So, we proposed the second order polynomial model for pH and temperature interactions representing the enzyme activity for immobilized β -galactosidase (Y) is:

$$Y_i = 116.79 - 7.37 x_1 - 39.69 x_1^2 + 5.81 x_1 - 37.23 x_2^2 + 19.44 x_1 x_2 \quad (2)$$

where, Y represents the response variable and x_1 and x_2 represent the studied variables, respectively, temperature and pH in coded values.

To confirm the applicability of the model, β -galactosidase activity in their free and immobilized forms was determined at 35°C and pH 7, which are the optimum values suggested by it. In this case, the coded settings of the tested variables were $x_1 = 0$ and $x_2 = 0$, respectively, with the model predicting enzymatic activity of 405.54 U/mg enzyme and 116.79 U/mg enzyme for free and immobilized enzyme, respectively. Experimentally, 403.5 U/mg enzyme and 112.5 U/mg enzyme was obtained for free and immobilized enzyme, respectively, confirming the closeness of the model to the experimental results.

3.3.3 Storage stability of the immobilized enzyme in the fridge

The storage stability was investigated by measuring the enzyme activities at certain time intervals and the results are given in figure 6. After 17 days, there are almost no changes in enzyme activity. Over this period, the immobilized enzyme began to lose their stability and after 30 days in the fridge the reminiscent activity was 76.22%. It is noteworthy that no additive or preservative was added to buffer where the films with the immobilized enzyme were submerged. It is known the addition of salts or stabilizants may contribute to maintaining the enzyme stability (Fields 2001; Thompson & Eisenberg 1999).

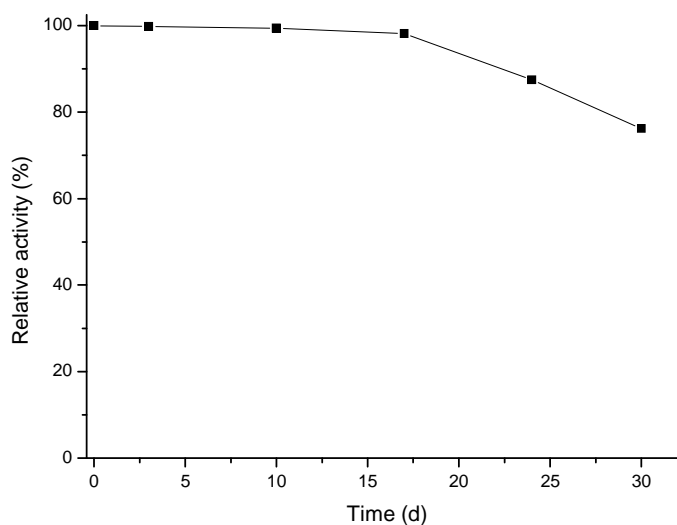


Figure 6) Storage stability of the immobilized enzyme in the fridge.

3.4 Lactose hydrolysis

Lactose hydrolysis performed with immobilized β -galactosidase (73 U) in 15 mL of buffered lactose solutions (5% w/v) at 7°C resulted in 71.5% of lactose conversion in 11 h for its first use. Lactose hydrolysis was carried out at 7°C to assay the conditions used in industrial scale to avoid microbial contamination of milk or milk whey. The reusability of the immobilized enzyme has been shown in figure 7. Repeated batch hydrolysis of buffered lactose solutions by the immobilized enzyme, at 7°C, allowed 16 repeated 11 h cycles without any drastic decrease in the rate of lactose hydrolysis.

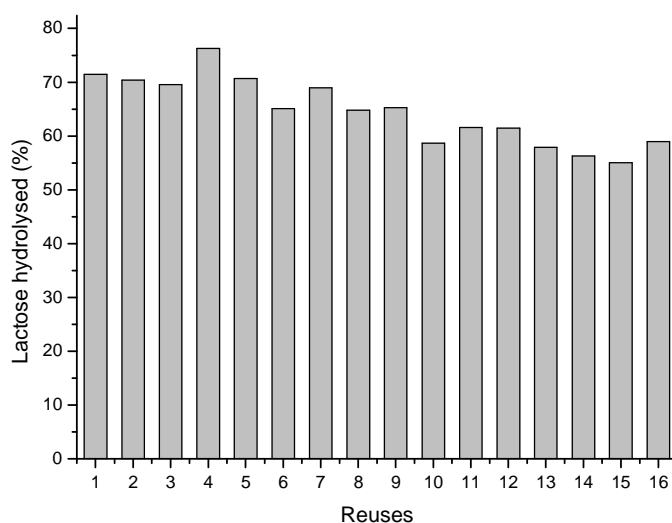


Figure 7) Repeated batch hydrolysis of buffered lactose solution (5% w/v) at 7°C using β -galactosidase immobilized on cellulose films. Hydrolysis was performed in erlenmeyers flasks in 11 h cycles.

At 35°C, the optimal temperature for immobilized enzyme activity, lactose hydrolysis performed with immobilized β -galactosidase (73 U) in 15 mL of buffered lactose solutions (5% w/v) resulted in 96.7% of lactose conversion in 4 h for its first use. Repeated batch hydrolysis of buffered lactose solutions by the immobilized enzyme was carried out in time-varied cycles since the immobilized enzyme required longer reaction time to reach the same rate of hydrolysis compared to the previous cycle (figure 8). So, the 1st, 2nd and 3rd cycle were of 5 h, the cycles 4, 5, 6 and 7th were of 9 h, cycles 8, 9 and 10th were of 10 h and the remaining were of 11 h. In the last cycle (18th), the immobilized enzyme was able to convert 74.4% of lactose.

These results show that immobilized enzyme is more active at 35°C, hydrolyzing more substrate in less time (96.7% of hydrolysis in 4 h) than at 7°C (79% of hydrolysis in 11 h), for its first use. However, the immobilized enzyme is more stable at 7°C than at 35°C, since the rate of hydrolysis remained approximately constant during 16 cycles at 7°C and decreased in each cycle at 35°C.

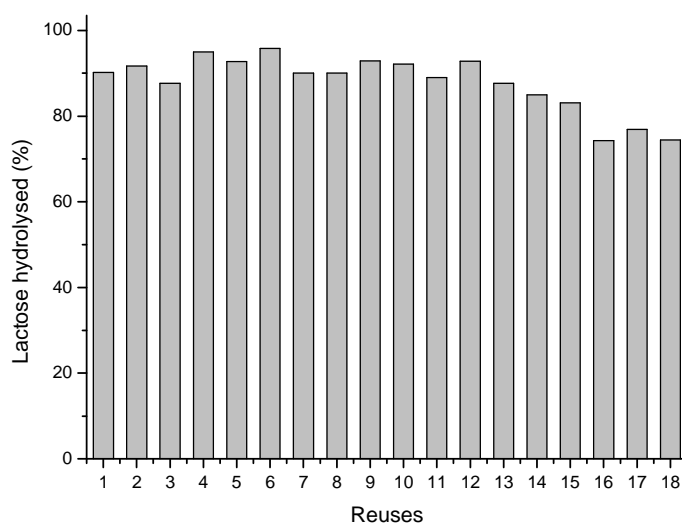


Figure 8) Repeated batch hydrolysis of buffered lactose solution (5% w/v) at 35°C using β -galactosidase immobilized on cellulose films. Hydrolysis was performed in erlenmeyers flasks in time-varied cycles.

4. Conclusion

We have demonstrated here the immobilization of β -galactosidase onto a cellulose film prepared with ionic liquid. The introduction of amino groups was confirmed by FTIR analysis. The support obtained was treated with glutaraldehyde to generate aldehyde groups in the surface for further enzyme immobilization. The immobilized β -galactosidase could be applied in 16 repeated batches of lactose hydrolysis at 7°C without significant loss in its activity.

Although there is much room for improvement of the performance of the material presented in this work, the results are encouraging. Due to this better formability, given by the presence of the ionic liquid, it is possible to use these cellulose films with immobilized enzyme as a coating for glass beads, plates and reactors for enzymatic reactions.

Acknowledgment

The authors thank Dr^a. Simone Hickmann Flôres for her valued contribution in the statistical analysis.

References

- Bagheri, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R.P.; Spear, S.K.; Daly, D.T. & Rogers, R.D. (2008) Ionic Liquid-Based Preparation of Cellulose-Dendrimer Films as Solid Supports for Enzyme Immobilization. *Biomacromolecules*, 9, 381-387.
- Cassol, C.C; Ebeling, G; Ferrera, B. & Dupont, J. (2006) A simple and practical method for the preparation and purity determination of halide-free imidazolium ionic liquids. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348, 243-248.
- Cavaille, D. & Combes, D. (1995). Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 22, n.1, 55-64.
- Fields, P. A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 129, 417-431.
- Gekas, V. & López-Leiva, M. (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, 20, 2-12.
- Gelesky, M.; Scheeren, C.W.; Foppa, L.; Pavan, F.A.; Dias, S.L.P. & Dupont, J. (2009) Metal Nanoparticle/Ionic Liquid/Cellulose: New Catalytically Active Membrane Materials for Hydrogenation Reactions. *Biomacromolecules*, 10, 1888-1893.
- Gemeiner, P., Stefuca, V. & Bales, V. (1993) *Biochemical engineering of biocatalysts immobilised on cellulosic materials*. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 551-566.
- Giacomini, C.; Villarino, A.; Franco-Fraguas, L. & Batista-Viera, F. (1998) Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 313-327.
- Grosová, Z.; Rosenberg, M. & Rebroš, M. (2008) Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. *Czech Journal of Food Science*, 26, 1-14.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275.

Pfruender, H.; Jones, R. & Weuster-Botz, D. (2006) Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 124, 182–190.

REJIKUMAR, S.; SUREKHA, DEVI. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 36, p.91-98, 2001.

Thompson, M. J. & Eisenberg, D. (1999) Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability. *Journal of Molecular Biology*, 290, 595-604.

Turner, M.B; Spear, S.K.; Holbrey, J.D.; Daly, D.T. & Rogers, R.D. (2005) Ionic liquid-Reconstituted Cellulose Composites as Solid Support Matrices for Biocatalyst Immobilization. *Biomacromolecules*, 6, 2497-2502.

Vigo, T.L. (1998) Interaction of cellulose with other polymers: retrospective and prospective. *Polymers for Advanced Technologies*, 9, 539-548.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar diferentes suportes para avaliar a imobilização da enzima β -galactosidase com vistas a sua utilização posterior na obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. Assim, inicialmente, foram testadas algumas metodologias de imobilização: inclusão em esferas de alginato de cálcio, imobilização covalente em polietileno tereftalato pelo método da acil-azida, adsorção em um material híbrido à base de sílica e imobilização covalente em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina e ativado com glutaraldeído.

As duas primeiras metodologias não foram utilizadas para testes posteriores (determinação dos parâmetros cinéticos, pH e temperatura ótimos, avaliação da hidrólise da lactose e estabilidade) com a enzima imobilizada e não geraram resultados para este trabalho. A inclusão em alginato de cálcio apresentou bons resultados de rendimento e eficiência, porém esta metodologia já foi amplamente utilizada em vários trabalhos de imobilização de β -galactosidase e, além disso, apresenta como desvantagem a diminuição da resistência mecânica das esferas com o tempo de uso (BRUKE, 1984), impossibilitando sua utilização por períodos prolongados. A imobilização em polietileno tereftalato apresentou a grande desvantagem de que parte do material após a ativação era reduzido a pó, o qual continuava sendo liberado mesmo após a imobilização da enzima, impossibilitando sua aplicação em alimentos. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al., (1989) que utilizou polietileno tereftalato para imobilização de amiloglicosidase, e após ativação do material com hidrazina, este era parcialmente convertido à pó. Além disso, resultados de eficiência e rendimento de imobilização obtidos pela utilização deste suporte foram sempre muito baixos, descartando a possibilidade do seu uso.

O material híbrido à base de sílica, desenvolvido no Laboratório de Sólidos e Superfícies (LSS) do Instituto de Química da UFRGS, foi utilizado para avaliar a imobilização de β -galactosidase via adsorção, conforme pode ser observado no artigo *Application of a silica based hybrid material as a support for β -galactosidase immobilization* (artigo 1). Este suporte possui grupos orgânicos positivamente carregados em sua matriz e, uma vez que a enzima possui um ponto isoelétrico de 5.1, as interações eletrostáticas contribuem com sua adsorção, já que as moléculas de enzima estão negativamente carregadas no pH 7.0 do tampão de imobilização utilizado.

Para avaliar a capacidade do suporte em relação à quantidade de proteína que pode ser imobilizada e suas possíveis conseqüências para o desempenho da enzima imobilizada, foram utilizadas duas concentrações diferentes de proteína: 0.3 e 1.2 mg/mL de proteína, correspondentes a 238 U e 1173 U de enzima. Estas quantidades foram estabelecidas em ensaios prévios de imobilização e escolhidas com o intuito de observar o efeito de uma baixa e alta concentração de proteína sobre o rendimento e eficiência de imobilização e também o possível efeito protetor da alta carga de proteína sobre a estabilidade térmica da enzima imobilizada.

Os resultados obtidos mostraram que o rendimento da imobilização, que indica a quantidade de proteína que foi imobilizada em relação à quantidade aplicada, foi de 18% para a solução de concentração mais baixa (0,3 mg/mL) e foi de 28% quando uma concentração mais alta de proteína (1,2 mg/mL) foi aplicada, no tempo de imobilização de 2 h, conforme mostrado no artigo 1. Isto indica que aumentando a quantidade de proteína aplicada, aumenta também a quantidade de proteína que fica retida no suporte. Porém, foi observado um efeito negativo da alta concentração de proteína aplicada na eficiência da imobilização (parâmetro que avalia a atividade da enzima depois de imobilizada em relação à atividade da enzima que ficou teoricamente retida) que diminuiu de 74 para 53 % com o aumento da carga protéica aplicada. Isto significa que o substrato pode estar sofrendo dificuldade de acesso aos sítios ativos das moléculas de enzima causada pelo excesso de enzima que ficou retida no suporte (KIERSTAN; COUGHLAN, 1991). Observações semelhantes foram feitas por Carpio et al., (2000) que relatam que a eficiência da imobilização de β -galactosidase por adsorção em pó de osso teve um decréscimo de 83 para 51% quando a concentração de enzima aplicada passou de 76 para 313 U/g de suporte, pelos mesmos motivos acima citados.

Em relação à estabilidade térmica da enzima imobilizada, observou-se que para as duas concentrações de proteína avaliadas na imobilização, a inativação da enzima imobilizada foi mais rápida do que a inativação da enzima livre, supondo que o processo de imobilização pode induzir a uma menor estabilidade térmica da enzima. Uma vez que a enzima comercial é protegida em glicerol, e que provavelmente todo glicerol seja perdido no processo de imobilização, este também pode ser um dos motivos pelo qual a enzima imobilizada tenha se mostrado mais instável do que a enzima livre. Entretanto, em comparação com a enzima imobilizada de mais baixa concentração de proteína, a enzima imobilizada que possuía maior concentração de proteína mostrou-se mais estável, sendo este resultado provavelmente devido ao efeito protetor que a maior carga de proteína gera ao sistema (BRENA, 1996). Em relação à estabilidade ao armazenamento refrigerado não houve grandes diferenças entre as

concentrações aplicadas de proteína, sendo que ao final de 28 dias, a inativação da enzima imobilizada foi de 25 e 30% para a enzima imobilizada de alta e baixa carga protéica, respectivamente. Mesmo tendo uma eficiência de imobilização mais baixa, a enzima imobilizada com maior carga protéica, devido à sua maior estabilidade térmica, foi a escolhida para os testes seguintes de determinação de parâmetros cinéticos, pH e temperatura ótimos e hidrólise da lactose.

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e V_m , tiveram seus valores determinados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk. Este método tem a desvantagem de utilizar dados obtidos em baixas concentrações de substrato, sendo esta uma região onde principalmente para enzimas imobilizadas, os efeitos difusionais são muito importantes. Assim, este método dá como resultado um considerável aumento no valor de K_m e um decréscimo em V_m (OVSEJEVI, 1998). Porém, este método é o mais comumente utilizado em trabalhos de imobilização de enzimas e para fins de comparação foi também escolhido para este trabalho. Como mostrado no artigo 1, os valores de K_m e V_m para a enzima livre foram 1,25 mM e 25000 U/mL, respectivamente e para a enzima imobilizada foram de 9,17 mM e 344 U/g sílica, sendo estes determinados utilizando a enzima imobilizada de mais alta concentração protéica. Efeitos difusionais causados pela presença do suporte e pelas moléculas de enzimas vizinhas podem dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo (GIACOMINI et al., 1998), levando a aparente diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, como indicado pelo acréscimo no valor de K_m .

A determinação do pH e temperatura ótimos tanto para enzima livre como para enzima imobilizada foi realizada utilizando o planejamento experimental fatorial descrito no artigo 1. A combinação de pH e temperatura do ponto central (35°C e pH 7) foi considerada ótima para atuação da enzima livre, sendo que sua imobilização não mudou a posição destes parâmetros. Neste caso, é importante não haver mudanças significativas no pH ótimo de atuação da enzima imobilizada, uma vez que o leite e o soro doce possuem valores de pH mais próximos a neutralidade.

Por fim, a enzima imobilizada foi utilizada para avaliar a hidrólise da lactose em batelada. Apenas quatro sucessivas reutilizações da enzima imobilizada foram possíveis, sendo que o grau de conversão da lactose no primeiro uso da enzima imobilizada foi de 90,9% em 2,5 h e decresceu a cada reutilização, sendo que ao final do mesmo período o grau de hidrólise atingiu 64,1, 28,3 e 13% para as sucessivas reutilizações. Este resultado já era esperado, uma vez que o método de imobilização por adsorção é baseada em interações fracas entre a enzima e o suporte e, por isso, torna-se bastante susceptível às variações de pH,

temperatura e concentrações de íons do meio, o que pode acarretar na desorção da enzima do suporte (TANAKA; KAWAMOTO, 1999 citado por GROSOVÁ et al., 2008). Além disso, a baixa estabilidade térmica da enzima imobilizada pode ter sido responsável pelo decréscimo da atividade enzimática observada nas sucessivas hidrólises. Novamente, tais resultados se assemelham àqueles obtidos por Carpio et al., (2000), onde a utilização de β -galactosidase imobilizada por adsorção em pó de osso para a hidrólise da lactose em batelada possibilitou apenas quatro reutilizações da enzima imobilizada, apresentando um decréscimo no grau de hidrólise a cada ciclo, sendo que no último ciclo o grau de hidrólise foi de 20%.

Uma vez que este suporte apresenta poros de dimensões de 1,43 nm, e sendo a β -galactosidase de *K. lactis* de grandes dimensões moleculares (200 KDa), esta fica adsorvida apenas na área superficial externa de tais poros, estando mais sujeita às variações do meio. Entretanto é possível aumentar o tamanho dos poros do suporte para que estes correspondam ao tamanho da enzima, fazendo com que a adsorção ocorra na superfície interna dos poros, atrasando, possivelmente, a desorção da enzima do suporte.

Para obter uma maior estabilidade da enzima em relação à sua retenção ao suporte e assim possibilitar um número maior de reutilizações do biocatalisador obtido, a enzima foi imobilizada por ligações covalentes, que são ligações mais fortes do que as interações envolvidas na adsorção, em um filme de celulose/líquido iônico como pode ser observado no artigo *Immobilization of β -galactosidase in an Ionic Liquid/Cellulose Film* (artigo 2).

O filme de celulose/líquido iônico utilizado neste estudo foi desenvolvido no Laboratório de Catálise Molecular do Instituto de Química da UFRGS. A caracterização deste filme é descrita por Gelesky et al., (2009). Durante o preparo dos filmes, foi adicionada uma poliamina (trietilenotetramina), a fim de introduzir grupos NH_2 aos filmes para posterior ativação com glutaraldeído e imobilização da enzima.

Análises de infravermelho comprovaram a introdução da poliamina, uma vez que, conforme apresentado no artigo 2, no espectro da celulose modificada houve o aparecimento de bandas a 1563 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} que são típicas de funções amina, as quais estavam ausentes no espectro da celulose não modificada. Após ativação com glutaraldeído, a banda em 1563 cm^{-1} não apareceu, provavelmente devido à formação da base de Schiff (ligação $\text{C}=\text{N}$).

Para avaliar a imobilização da β -galactosidase neste suporte, os filmes de celulose foram cortados no tamanho de 1 cm x 1 cm. Assim, a atividade da enzima imobilizada foi avaliada em função da área de filme utilizada, sendo a atividade específica obtida dividindo-se pela quantidade de proteína que ficou imobilizada na área de filme considerada. Do total de

proteína aplicada, 20 mg em 50 cm² de filme, ficaram imobilizadas 0,29 mg (5,8 µg/cm²), sugerindo que a concentração da solução de imobilização pode ser mais baixa e assim uma quantidade menor de enzima poderia ser utilizada. A avaliação da capacidade de carga protéica deste suporte é uma sugestão para otimizar o rendimento da imobilização. Após a enzima ser imobilizada ao suporte, esta apresentou uma queda de 40% na sua atividade específica, o que não é um resultado incomum quando enzimas são imobilizadas por ligações covalentes, onde mudanças conformacionais podem ocasionar a diminuição de sua atividade. Neste caso, conforme citado por Giacomini et al., (1998), a reação que ocorre entre o glutaraldeído e a proteína depois do suporte ter sido ativado é análoga à reação de *cross-linking* intramolecular de proteínas utilizando o mesmo reagente e cuja natureza não é completamente entendida, sendo relatada como responsável por induzir mudanças conformacionais na enzima.

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e V_m , obtidos pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, para a enzima imobilizada, foram determinados ser 11,22 mM de ONPG e 460,83 µmol de ONP min⁻¹ mg⁻¹ enzima, respectivamente. Em comparação com K_m e V_m obtidos para a enzima livre, houve um aumento de K_m , que, da mesma forma citada anteriormente no artigo 1, pode ser devido à presença do suporte e a mútua interação entre as moléculas de proteína imobilizadas. O decréscimo no valor da velocidade máxima de reação quando a enzima está saturada pelo substrato (V_m) é, possivelmente devido às mudanças conformacionais sofridas pela enzima após sua imobilização (REJIKUMAR; DEVI, 2001).

Da mesma forma apresentada no artigo 1, pH e temperatura ótimos da enzima imobilizada em filme de celulose foram determinados utilizando planejamento experimental fatorial. A combinação de pH e temperatura do ponto central (35°C e pH 7) foi considerada ótima para atuação da enzima imobilizada. Observando a superfície de contorno apresentada no artigo 2, percebe-se uma inclinação não observada para a superfície de contorno da enzima livre, sugerindo que a interação pH x temperatura foi significativa para a atividade da enzima imobilizada.

A estabilidade ao armazenamento em geladeira da enzima imobilizada foi avaliada durante 30 dias e permaneceu praticamente inalterada por aproximadamente 17 dias. No final do período a atividade remanescente foi de 76,22%. Cabe ressaltar que nenhum aditivo ou conservante foi adicionado ao tampão onde os filmes de celulose com enzima imobilizada estavam imersos. Sabe-se que a adição de sais ou outros “estabilizantes” também podem contribuir para a manutenção da estabilidade da enzima (FIELDS, 2001; THOMPSON; EISENBERG, 1999). Assim, é provável que a adição de estabilizantes, como o glicerol, ao

tampão de armazenamento poderá aumentar o tempo que a enzima imobilizada permanecerá viável para uso.

A hidrólise da lactose pela enzima imobilizada nos filmes de celulose foi avaliada em duas temperaturas diferentes, a 35°C, temperatura cuja atividade enzimática é considerada ótima para esta β -galactosidase, e a 7°C, para “ensaiar” condições industriais, evitando assim o desenvolvimento de microrganismos que possam estar presentes no leite ou no soro do queijo.

A 7°C, a enzima imobilizada pôde ser reutilizada em 16 ciclos de hidrólise de 11 h, sem decréscimo notável de sua atividade enzimática. A 35°C, a enzima imobilizada foi aos poucos perdendo atividade, necessitando um maior tempo de reação para alcançar o mesmo grau de hidrólise do ciclo anterior. Apesar de a enzima imobilizada ser mais ativa a 35°C, ela é mais estável a baixa temperatura e, por isso, pode ser reutilizada por mais tempo, como mostram os resultados. Além disso, os filmes de celulose estavam visualmente mais conservados ao final do experimento de hidrólise a 7°C do que ao final do mesmo experimento a 35°C, aparentando uma durabilidade física também maior a baixa temperatura.

Ainda que outros estudos possam ser realizados para aperfeiçoar esta metodologia de imobilização, as características de maior flexibilidade e maleabilidade dada pela presença do líquido iônico ao filme de celulose (GELESKY et al., 2009) e os resultados obtidos no presente trabalho, permitem afirmar que este é um material adequado para ser testado como revestimento de superfícies (esferas, cones, tubos, placas) a serem usadas em reatores de hidrólise enzimática.

4 CONCLUSÕES

A imobilização da β -galactosidase ao material híbrido à base de sílica apresentou uma eficiência de imobilização que variou de 53 a 74% de acordo com a quantidade de enzima aplicada. Apesar da alta eficiência, a imobilização diminuiu a estabilidade térmica da enzima quando comparada à sua forma livre, sendo este um dos possíveis motivos que levaram à perda de atividade observada durante as quatro sucessivas bateladas de hidrólise. O suporte utilizado mostrou uma boa capacidade de adsorção desta enzima, porém talvez não seja totalmente adequado devido ao fato de apresentar tamanho de poros muito pequenos se comparados ao tamanho da enzima. Isto faz com que a enzima fique adsorvida somente à superfície externa do suporte, e, por isso, fique mais susceptível às variações do meio onde se encontra. Este trabalho teve a importância de demonstrar a utilização deste material híbrido à base de sílica como adsorvente para a enzima, porém, para ser reutilizado para hidrólise da lactose talvez sejam necessários ajustes que aumentem a retenção da enzima ao suporte e também melhore sua estabilidade térmica.

A imobilização covalente da enzima aos filmes de celulose contendo líquido iônico se mostrou como uma metodologia bastante adequada para imobilização de β -galactosidase, uma vez que permitiu sua reutilização por sucessivos ciclos de hidrólise sem grandes perdas de atividade enzimática.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar a adição de surfactantes durante as reações de gelificação no preparo do material híbrido à base de sílica a fim de modelar e aumentar o tamanho dos seus poros;
- Utilizar o material híbrido à base de sílica como revestimento de superfícies que apresentem uma porosidade adequada, como exemplo vidro de porosidade controlada, para posterior imobilização da β -galactosidase, avaliando sua estabilidade térmica e capacidade de reutilização.

- Avaliar o efeito da presença de sais e outros estabilizantes durante o armazenamento da enzima imobilizada;
- Otimizar a quantidade de enzima utilizada para imobilização nos filmes de celulose;
- Utilizar os filmes de celulose como revestimento para superfícies como esferas, placas, cones e tubos a serem utilizados em colunas de leito fixo a fim de fornecer dados para sua aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

ARTYOMOVA, A.A.; VOROSHILOVA, O.I.; NIKITIN, Y.U.S.; KHOKHLOVA, T.D. Macroporous silica in chromatography and immobilization of biopolymers. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.25, p.235-248, 1986.

BACIU, I.E.; JÖRDENING, H.J.; SEIBEL, J.; BUCHHOLZ, K.; Investigations of the transfructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogues galactosyl-fructoside; **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.116; n.4; p.347-357, 2005.

BETANCOR L.; HIDALGO A.; FERNANDEZ-LORENTE G.; MATEO C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GUI SAN J.M. Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and post immobilization techniques. **Biotechnology Progress**, New York, v.19, n.3, p.763-767, 2003.

BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J.M. Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.110, n.2, p.201-207, 2004.

BICKERSTAFF, G.; F. **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology 1**, Human Press, New Jersey, 1997. 367p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov. 2006.

BRENA, B.; OVSEJEVI, K.; LUNA, B.; BATISTA-VIERA, F. Thiolation and reversible immobilization of sweet potato β -amylase on thiosulfonate-agarose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.84, p.381-390,1993.

BRUKE, C.; **Methods of Immobilizing Cells**, In: WEBB, C.; BLACK, G. M.; ATKINSON, B. Process Engineering Aspects of Immobilized Cells Systems; Institution of Chemical Engineers-Northwestern Branch, England, p.20-34, 1984.

CABRAL, J. M. S.; BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J.; **Applied Biocatalysis**. Harwood Academic Publishers, Holland, 1993. 467p.

CABRAL, J.M.S; KENNEDY, J.F. “Covalent and coordination immobilization of proteins” in **Protein immobilization**. R. Taylor Ed; New York, 13, 1991. p.73-104.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**. 1.ed. The Netherlands: Wiley-VHC, 531p. 2005a.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current opinion in Chemical Biology**, London, n.2, v.9, p. 217-226, 2005b.

CARPIO C.; GONZALES P.; RUALES J.; BATISTA-VIERA F. Bone-bound enzymes for food industry application. **Food Chemistry**, London, v. 68, p. 403–409, 2000.

CAVILLE, D; COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.22, n.1, p.55-64, 1995.

CHEETHAM, P. S. J. Physical studies on the mechanical stability of columns of calcium alginate gel pellets containing entrapped microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**; New York, v.1, p.183-188, 1979.

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

COTÉ, A; BROWN, W. A; CAMERON, D; VAN WALSUM, G. P; Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.1608-1620, 2004.

DSM FOOD SPECIALITIES. **Maxilact® A lactase de levedura láctea – aplicações em leite e soro**. The Netherlands, 2009. 6p. Boletim Técnico.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRÍGUEZ, V.; GUISÁN, J.M. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, n.6, p.517-523, 1995.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.129, p.417-431, 2001.

FODA, M.I.; LOPEZ-LEIVA, M. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 581–587, 2000.

GASPARI, J. W.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus L.*; **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p.1135-1140,1999.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, London, v.20, p.2-12, 1985.

GELESKY, M.; SCHEEREN, C.W.; FOPPA, L.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P; DUPONT, J. Metal Nanoparticle/Ionic Liquid/Cellulose: New Catalytically Active Membrane Materials for Hydrogenation Reactions. **Biomacromolecules**, Washington, v.10, n.7, p.1888-1893, 2009.

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

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, Praha, vol.26, n.1, p.1–14, 2008.

GUIMARÃES W.V.; DUDEY G.L.; INGRAM L.O. Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v.40, p.41–45, 1992.

HULST, A. C.; TRAMPER, J; Immobilized plant cells: a literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.11, p.66-73, 1989.

HULTIN, H.O. Current and Potential Uses of Immobilized Enzymes. **Food Technology**, Chicago, v.37, n.10, p.66-82, 1983.

KATZBAUER, B.; NARODOSLAWSKY, M.; MOSER, A. Classification system for immobilization techniques. **Bioprocess Engineering**, New York, v.12, p.173–179, 1995.

KIERSTAN, M. P. J.; COUGHLAN, M. P. **Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications**. In R. F. Taylor, Protein immobilization, fundamentals and applications. New York: Marcel Dekke, 1991. p.13-71.

KRAJEWSKA B Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p.126–139, 2004.

LALONDE, J.; MARGOLIN, A. **Immobilization of enzymes**. In: Drauz K, Waldmann H (eds) Enzyme catalysis in organic chemistry, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2002. p. 163–184

LASKIN, A. I. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**; Biotechnology Series; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc; California; 312p.1985.

MAHONEY, R.R; Galactosyl-oligosaccharide formation during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, London, v.63, n.2, p.147-154, 1998.

MAMMARELLA, E.J.; RUBIOLO, A.C. Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.34, p.7–13, 2005.

MANOLOV, R. J.; KAMBOUROVA, M. S.; EMANUILOVA, E. I. Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pullulanase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.18; p. 409-415, 1993.

MARTINEK, K.; KLIBANOVAM, GOLDMACHER, V.S.; BEREZIN I.V. The principles of enzyme stabilisation. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multi-point fashion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.485, n.1, p.1–12, 1997.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; MONTES, T.; PALOMO, J.M.; TORRES, R.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Advances in the

design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society Transactions**, Dublin, v.35, p.1593–1601, 2007c.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p.1451–1463, 2007b.

MATTHEWS, S.B.; WAUD, J.P.; ROBERTS, A.G.; CAMPBELL, A.K. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgraduate Medical Journal**, Basingstoke, v.81, p.167–73, 2005.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.45, n.2, p. 47-54, 2006.

MOSBACH K. Immobilised Enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.5, n.1, p.1-3, 1980.

MOZHAEV, V.V.; MELIK-NUBAROV, N.S.; SERGEEVA, M.V.; SIKRINIS, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.3, n.3, p.179–187, 1990.

NOVALIN, S.; NEUHAUS, W.; KULBE, K.D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.119, p.212–218, 2005.

OLIVEIRA, E.A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** 2007. 85p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, E. A; SILVA, M.P.C; FIGUEIREDO, Z.M.B; CARVALHO, L.B. Immobilization of Proteins on Plates of Dacron. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.22, p.109-114, 1989.

OVSEJEVI, K.G. **Obtención de β -galactosidasas inmovilizadas y sus aplicaciones en el procesamiento de sub-productos de la industria láctea.** 1998. 139f. Tesis (Doctor en Química) – Catedra de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad de La Republica, Uruguay, 1998.

PAPAYANNAKOS N., MARKAS, G. Studies on modeling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v.52, n.1, p.1–12, 1993.

PARK, S.W.; LEE, J.W.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Enhancement of stability of GL-7-ACA acylase immobilised on sílica gel modified by epoxide silanization. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p.359-366, 2003.

PENNISIN, E. In industry, extremophiles begin to make their mark. **Science**, Washington, v.27, p.705-706, 1997.

PIVARNIK, L.F.; SENACAL, A.G.; RAND, A.G. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v.38, p.1–102, 1995.

REETZ, M.T.; JAEGER, K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.93, p.3–14, 1998.

REJIKUMAR, S.; SUREKHA, DEVI. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, p.91-98, 2001.

ROSEVEAR, A. Immobilized Biocatalysts – a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology B-Biotechnology**, Oxford, v.34, n.3, p.127-150, 1984.

ROSSI, E.; LENTZE, M. J. Clinical significance of enzymatic deficiencies in the gastrointestinal tract with particular reference to lactose deficiency. **Annals of Allergy**, Pallatine, v.53, n.6, p. 649-655, 1984.

RUSTOM, I.Y.S.; FODA, M.I.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Formation of oligosacharides from whey UF-permeate by enzymatic hydolysis-analysis of factors. **Food Chemistry**, London, v.62, n.2, p.41-147, 1998.

SANTIAGO, P.A.; MARQUES, L.B.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J.; **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*** – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2004.

SHUKLA, T.P. Beta-galactosidase Technology: a Solution to the lactose problem. CRC, **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v.5, p.325-356, 1975.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**; Prentice Hall; New Jersey; 479 p. 1992.

SIEBER, R.; STRANSKY, M.; DEVRESE, M. Lactose intolerance and consumption of milk and milk products. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v.36, p.375–393, 1997.

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

THOMPSON, M. J.; EISENBERG, D.; Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability. **Journal of Molecular Biology**, London, n.290, p.595-604,1999.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 8, p.692–700, 2003.

TURNER, M.B.; SPEAR, S.K.; HOLBREY, J.D.; DALY, D.T.; ROGERS, R.D. Ionic liquid-Reconstituted Cellulose Composites as Solid Support Matrices for Biocatalyst Immobilization. **Biomacromolecules**, Washington, v.6, p. 2497-2502, 2005.

VIGO, T.L. Interaction of cellulose with other polymers: retrospective and prospective. **Polymers for Advanced Technologies**, New York, v.9, n.9, p.539-548, 1998.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**; 2^a Ed. Ellis Horwood, New York; 457p. 1985.

YANG Z, PAN WUBIN. Ionic Liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p.19-28, 2009.

ZADOW, J.G. Economic considerations related to the production of lactose and lactose by-products. **IDF Bulletin**, London, v.289, n.10, 1993.

ZHANG, Y.; WU, H.; LI, L.; LI, J.; JIANG, Z.; JIANG, Y.; CHEN, Y. Enzymatic conversion of Baicalin into Baicalein by β -glucuronidase encapsulated in biomimetic core-shell structured hybrid capsules. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic B**, Amsterdam, v.57, p.130–135, 2009.

ZHANG, Y.F.; WU, H.; LI, J.; LI, L.; JIANG, Y.J.; JIANG, Y.; JIANG, Z.Y. Protamine-templated biomimetic hybrid capsules: efficient and stable carrier for enzyme encapsulation. **Chemistry of Materials**, Washington, v.20, p.1041–1048, 2008.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase livre (U/mL).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	774067386,9	5	154813477,4	715,64	5,05
Resíduo	1081635,021	5	216327,0043		
Falta de ajuste	1045059	3	348353,0071	19,04	
Erro puro	36576	2	18288		
Total	775149022	10			

APÊNDICE B – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade específica da β -galactosidase livre (U/mg).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	335966,7478	5	67193,34955	715,64	5,05
Resíduo	469,4596447	5	93,89192894		
Falta de ajuste	453,6	3	151,1948816	19,04	
Erro puro	15,9	2	7,9375		
Total	336436,2	10			

APÊNDICE C – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase imobilizada em sílica.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	24080,03559	5	4816,007119	78,12	5,05
Resíduo	308,2174222	5	61,64348444		
Falta de ajuste	279,00	3	93,00074139	6,36	
erro puro	29,22	2	14,60759903		
Total	24388,25	10			

APÊNDICE D – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase imobilizada em celulose.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	15078,45	5	3015,69	15,777	5,05
Resíduo	955,70	5	191,14		
Falta de ajuste	761,33	3	253,78	2,611	
erro puro	194,37	2	97,187		
Total	16034,16	10			

APÊNDICE E – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase livre (U/mL).

	Coeficientes de Regressão	Erro	t^2	valor p
Intercepto	19466,04	78,07596	249,322	0,000016
T	-298,23	47,88341	-6,228	0,024822
T ²	-9301,23	57,13737	-162,787	0,000038
pH	302,83	47,88341	6,324	0,024101
pH ²	-9569,23	57,13737	-167,478	0,000036

APÊNDICE F – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade específica da β -galactosidase livre (U/mg).

	Coeficientes de Regressão	Erro	t^2	valor p
Intercepto	405,543	1,626582	249,322	0,000016
T	-6,213	0,997571	-6,228	0,024822
T ²	-193,776	1,190362	-162,787	0,000038
pH	6,309	0,997571	6,324	0,024101
pH ²	-199,359	1,190362	-167,478	0,000036

APÊNDICE G – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase imobilizada em sílica.

	Coeficientes de Regressão	Erro	t^2	valor p
Intercepto	122,6339	2,206600	55,5760	0,000324
T ²	-51,4557	1,614829	-31,8645	0,000983
pH ²	-53,5186	1,614829	-33,1420	0,000909
T*pH	6,3732	1,910994	3,3350	0,079354

APÊNDICE H – Coeficientes de regressão do modelo para determinação do pH e temperatura ótimos para atividade da β -galactosidase imobilizada em celulose.

	Coeficientes de Regressão	Erro	t^2	valor p
Intercepto	116,7935	5,691663	20,52010	0,002366
T	-7,3796	3,490655	-2,11410	0,168824
T²	-39,6981	4,165260	-9,53075	0,010830
pH	5,8099	3,490655	1,66441	0,237940
pH²	-37,2383	4,165260	-8,94020	0,012281
T*pH	19,4463	4,929183	3,94513	0,058655

ANEXOS

ANEXO A
BOLETIM TÉCNICO DA ENZIMA LACTASE,
MAXILACT LX 5000 ®

Maxilact[®]

A lactase de levedura láctea – aplicações em leite e soro.

Introdução

Maxilact[®] é um preparado à base de lactase purificada, isolada de uma cepa especial da levedura láctea *Saccharomyces (Kluyveromyces) marxianus* var. *lactis*. Esta levedura, descrita pela primeira vez por Beijerinck em 1889, é um microrganismo de origem láctea bem conhecido, sendo usado na fabricação de certos tipos de iogurte (kefir).

O Número Internacional de Identificação da Enzima é EC 3.2.1.23. Maxilact[®] é disponível em várias formas de apresentação comercial para as principais áreas de aplicação:

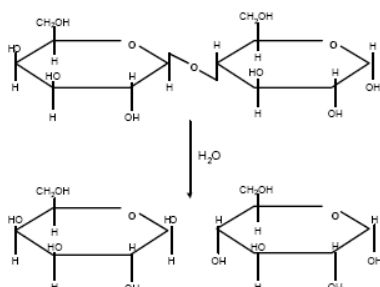
- Hidrólise de leite
- Hidrólise de soro
- Aplicações em rações animais

A. Características Técnicas

Maxilact[®] hidroliza o açúcar do leite - a lactose - dando origem a dois monossacarídeos, glicose e galactose. Esta reação é mostrada na Figura 1.

Durante a reação, uma molécula de água se liga à molécula de açúcar. As condições da reação, isto é, temperatura, acidez, tempo, concentração de lactose e enzima, determinam a velocidade da reação. Em soluções contendo elevadas concentrações de lactose, uma outra reação chamada de transgalactosidação ocorrerá podendo dar origem a um número de dissacarídeos e trissacarídeos a partir dos produtos finais da hidrólise (glicose e galactose). Em soluções contendo 25-30% de lactose, até 8% de dissacarídeos e 5% de trissacarídeos podem ser formados, embora uma reação de hidrólise prolongada irá quebrar estes compostos em outros ainda menores.

Figura 1. Hidrólise de lactose



1. Inibidores e ativadores

As condições mais importantes para uma atividade enzimática continuada são o pH e a temperatura. Metais pesados tais como zinco ($>5 \times 10^{-4}M$) e cobre ($>5 \times 10^{-4}M$) exercem um forte efeito inibidor sobre a enzima. Concentrações relativamente altas ($>10^{-4}M$) de cálcio livre ou ionogênico também inibem a enzima. Em contraste, a atividade e/ou estabilidade da lactase é melhorada por magnésio ($10^{-4}M$), manganês ($10^{-4}M$) e potássio ($10^{-4}M$). Concentrações de fosfatos de até $10^{-2}M$ terão um efeito positivo na estabilidade pois promovem a formação de ligações de cálcio. Na prática, tanto os minerais ativadores quanto os inibidores estão presentes e a influência real de íons metálicos teria que ser determinada separadamente para cada substrato. No entanto, em leite ou soro doce normais não há quaisquer exigências especiais se a hidrólise ocorrer em equipamentos de aço inoxidável. Se houver necessidade de se efetuar uma correção do pH (normalmente um aumento do pH), recomenda-se usar hidróxido de potássio, uma vez que o potássio aumenta significativamente a atividade da enzima.

2. Efeito da temperatura e pH

Sendo Maxilact[®] um composto extraído de uma levedura láctea, as condições ótimas para sua atividade são semelhantes ao pH e temperatura naturais do leite, isto é, pH de 6.6-6.8 e temperatura de 35-40°C. O Gráfico 1 mostra a relação entre temperatura e atividade enzimática.

GRAPH 1: Temperature-Activity relation

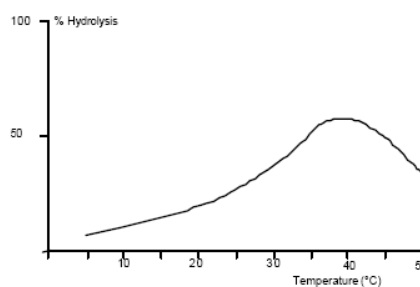


GRÁFICO 1: Relação Temperatura - Atividade % hidrólise Temperatura (°C)

Condições da reação:

pH : 6.6

Tempo : 4 horas

Quantidade de enzima : 1000 NLU/l

A solução foi mantida sob agitação constante durante a hidrólise.

O Gráfico 2 mostra a relação entre pH e atividade da enzima. Essa figura mostra claramente que o pH ótimo coincide com o pH normal do leite (pH 6.5-6.8).

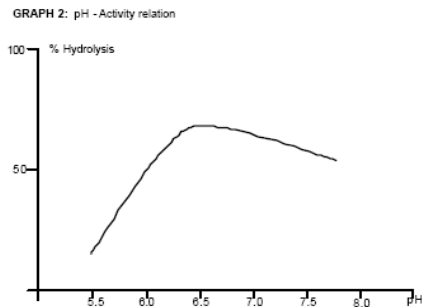


GRÁFICO 2: Relação pH - Atividade
% hidrólise pH (°C)

Condições da reação:

Temperatura : 37°C (98°F)
Tempo : 4 horas
Quantidade de enzima : 1000 NLU/l
Correção de pH efetuada com KOH 4N ou H₂SO₄ 4N.
A solução foi mantida sob agitação constante durante a hidrólise.

Como mostra o gráfico 1, Maxilact[®] também é ativa a temperaturas mais baixas, mesmo a uma temperatura tão baixa quanto 5°C. Esta propriedade é especialmente importante visto que a estas baixas temperaturas o crescimento de bactérias causadoras de deterioração é muito moderado. Atividade suficiente é mantida para tratar o leite (ou soro) durante estocagem o durante a noite.

3. Efeito da concentração de Maxilact[®]

A dosagem necessária de Maxilact[®] depende da temperatura, pH, do tempo disponível e do grau de hidrólise desejado. Gráficos 3 e 4 mostram os resultados da hidrólise a 37°C, ao passo que o gráfico 5 mostra o resultado a 6°C. Estes gráficos ajudam o usuário a determinar as condições mais apropriadas para qualquer aplicação específica.

GRAPH 3: Enzyme concentration - Activity relation

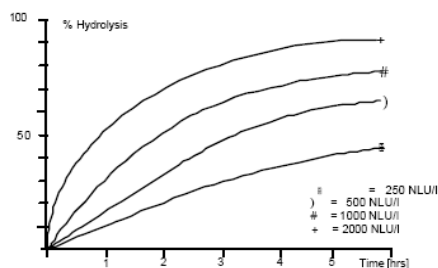


GRÁFICO 3: Relação Concentração da enzima - Atividade
% hidrólise tempo (horas)

Condições da Reação:

pH : 6.6
Temperatura : 37°C (98°F)
A solução foi mantida sob agitação constante durante a hidrólise.

GRAPH 4: Enzyme amount v.s. time necessary for hydrolysis

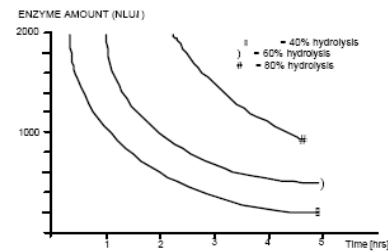


GRÁFICO 4: Quantidade de enzima vs. tempo necessário para hidrólise
QUANTIDADE DE ENZIMA (NLU/L) Tempo (horas)

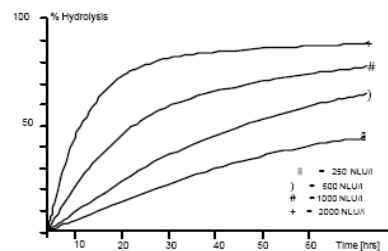
= 40% hidrólise
= 60% hidrólise
= 80% hidrólise

Condições da reação:

pH : 6.6
Temperatura : 37°C (98°F)
A solução foi mantida sob agitação constante durante a hidrólise.

GRÁFICO 5: Relação Concentração da enzima - ATIVIDADE
% hidrólise tempo (horas)

GRAPH 5: Enzyme concentration - Activity relation



% Hidrólise Tempo (horas)

Condições da reação:

pH : 6.6
Temperatura : 6°C
A solução foi mantida sob agitação constante durante a hidrólise.

Observação: Os resultados relatados nestes gráficos são válidos para leite normal. Outros substratos podem produzir resultados diferentes. Menor grau de intensidade de hidrólise e curvas mais pronunciadas de pH e temperaturas ótimos serão obtidos quando forem usados leite ou soro com elevado teor de cálcio livre. O pH mais baixo de soro doce causará uma redução na % de hidrólise.

B. Aplicações de Maxilact[®] em produtos lácteos

1. Hidrólise de leite e intolerância à lactose

É um fato conhecido que, devido à baixa atividade da lactase intestinal, nem todos os humanos são capazes de digerir com a mesma facilidade a lactose contida no leite. A incidência (%) de malabsorção de lactose em pessoas da raça caucasiana varia de 2% (dinamarqueses) a aproximadamente 19% (norte-americanos brancos). Por outro lado, os povos nativos da Europa oriental, do Mediterrâneo, África, Ásia, América Latina e Austrália apresentam incidência bem maior, variando desde 60% (por. ex. indianos, israelenses, índios norte e sul - americanos) até alcançar quase 100% (por ex. chineses, japoneses, nigerianos, aborígenes australianos).

A intolerância à lactose também ocorre nos seguintes casos:

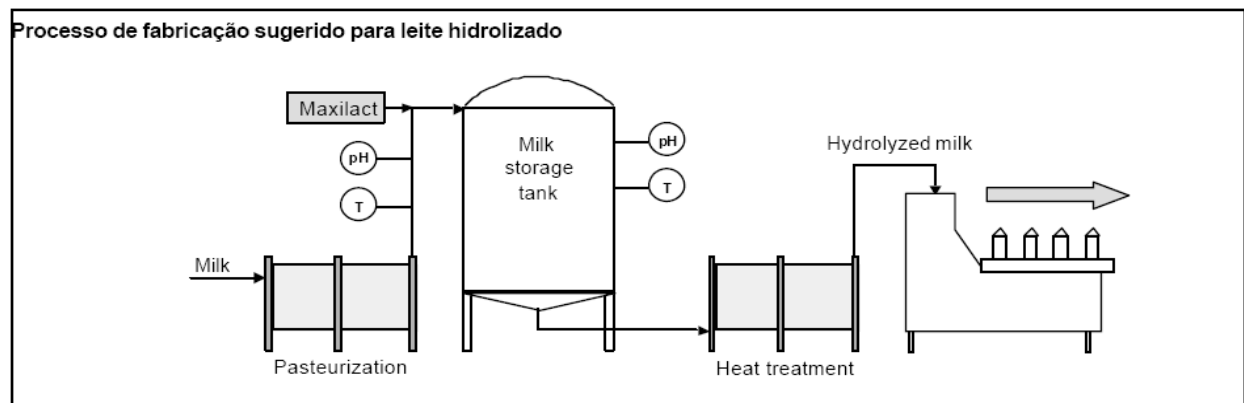
- Devido a uma doença congênita muito rara, algumas pessoas sofrem de deficiência de lactase desde o nascimento. Isto resulta em sérias desordens gastrointestinais que podem ser fatais.
- O nascimento prematuro pode causar atividade de lactase anormalmente baixa. No entanto, a produção de lactase pelo organismo é quase totalmente restabelecida dentro de um ou dois meses.
- Crianças em avançado estado de subnutrição e que sofrem de malabsorção de calorias de proteína. Nestes casos, a atividade de lactase pode estar totalmente ausente temporariamente.

Determinadas operações cirúrgicas podem levar o organismo a perder temporariamente a capacidade de produzir lactase.

Pré-tratamento do leite com Maxilact® evitará estas complicações intestinais. Dependendo do grau de hidrólise, o leite tratado apresentará sabor levemente mais adocicado. Isto é causado pelo maior poder adoçante da glicose e galactose em comparação à lactose.

Com exceção de casos extremos de malabsorção de lactose, não costuma ser necessário hidrolizar 100% do teor de lactose original do leite uma vez que a ocorrência ou não de sintomas da doença será determinada pela relação de equilíbrio entre a quantidade de leite ingerida, o grau de intensidade da malabsorção de lactose e a percentagem da hidrólise. Na prática, deve-se encontrar um ponto de equilíbrio entre um grau de hidrólise que seria suficiente para a maioria dos casos e considerações de custo. Este ponto de equilíbrio costuma se situar no grau de hidrólise entre 70 e 80%.

2. Produção de leite hidrolizado



Milk = Leite **Pasteurization** = Pasteurização **T** = T
pH = pH **Maxilact** = Maxilact
Milk Storage Tank = Tanque de estocagem do leite
Heat treatment = Tratamento térmico
Hydrolyzed milk = Leite hidrolizado

Pasteurizar o leite cru e ajustar a temperatura à relação escolhida de tempo-temperatura-concentração de enzima (Ver "Efeito da concentração de Maxilact®"). Para prevenir crescimento microbiano indesejado, recomenda-se tratar o leite abaixo de 10°C (50°F) ou a 37-40°C (98.6-104°F) por um período de tempo mais curto.

B. Agitar o leite para garantir distribuição uniforme da enzima e manter a solução homogênea.

C. Tirar duas amostras do leite para elaborar a curva padrão de hidrólise (Ver "Métodos de análise").

D. Adicionar a quantidade requerida de Maxilact® ao leite de acordo com o tempo e a temperatura de incubação escolhidos.

E. Durante a hidrólise, a determinação do pH ou da acidez titulável a intervalos regulares são métodos eficientes para detectar o crescimento de bactérias.

F. No momento calculado para o fim da hidrólise deve-se determinar novamente o grau de hidrólise. Quando o grau desejado de hidrólise tiver sido atingido (normalmente 70-80%), o leite estará pronto para as próximas etapas de processamento normal.

G. Neste ponto, o leite pode ser pasteurizado. Para evitar o escurecimento do produto recomenda-se aplicar pasteurização HTST (pasteurização rápida) ou técnicas de esterilização. Estes dois métodos produzem melhores resultados do que a pasteurização lenta ou procedimentos de esterilização realizados dentro do tanque de estocagem intermediária..

3. Hidrólise do leite e a prevenção da cristalização da lactose

Devido à maior solubilidade dos açúcares resultantes da hidrólise da lactose, produtos lácteos altamente concentrados ou congelados podem ser obtidos sem a ocorrência de "arenosidade". Esta última característica constitui uma vantagem na produção de produtos como sorvetes e doce de leite. O grau de hidrólise necessário para evitar a cristalização da lactose em doce de leite é de aproximadamente 30%, embora níveis mais elevados possam ser usados caso se deseje também um produto mais doce.

4. Hidrólise do leite e seu uso em produtos lácteos fermentados (iogurte, queijo quark)

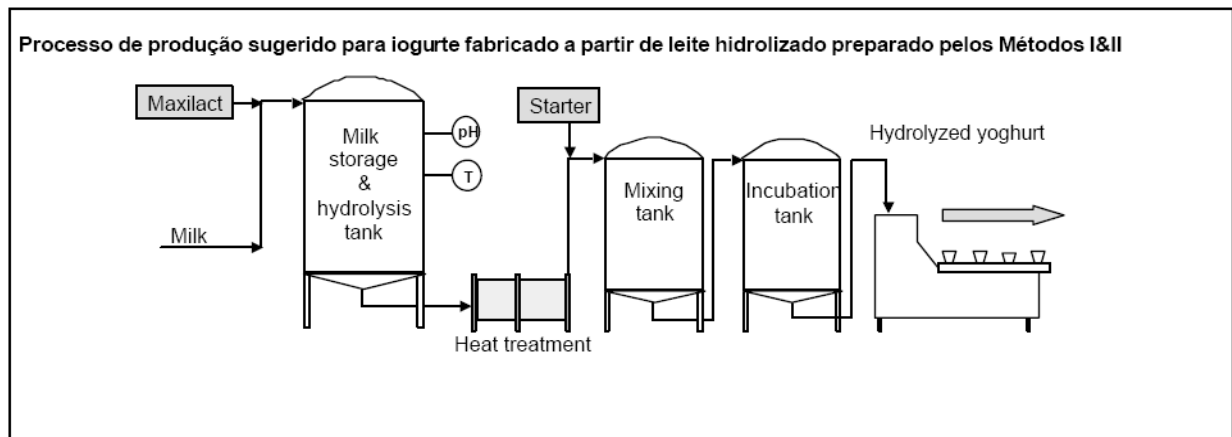
Embora a maioria das cepas de culturas utilizadas para a fabricação de iogurte, isto é, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, tenham sido escolhida por sua capacidade de fermentar a lactose, a capacidade real de quebrar a molécula da lactose parece ser o fator limitante da taxa de fermentação. Por essa razão, a hidrólise da lactose muitas vezes

estimula o crescimento continuado destas culturas. Nos iogurtes tradicionais com frutas ou outras sobremesas à base de iogurte a lactose não contribui para a doçura do produto final. Por outro lado, a lactose hidrolizada, sendo 3 vezes mais doce, contribui significativamente para a doçura, reduzindo desta forma a necessidade de acrescentar açúcar.

Exemplo: fabricação de iogurte. Existem 3 métodos possíveis:

- I. Pré-hidrólise a baixas temperaturas de leite pasteurizado destinado à produção de iogurte.
- II. Pré-hidrólise a temperaturas mais altas de leite destinado à produção de iogurte.
- III. Hidrólise e acidificação simultâneas do leite destinado à fabricação de iogurte.

Esses três métodos podem ser usados tanto para fabricação de iogurte natural quanto para iogurte batido. O grau de hidrólise ideal é de 85%.



Milk = Leite = I = T

pH = pH Maxilact = Maxilact

Milk Storage & Hydrolysis Tank = Tanque de estocagem & hidrólise do leite

Heat treatment = Tratamento térmico

Starter: cultura láctica

Mixing tank: Tanque de mistura

Incubation tank: Tanque de incubação

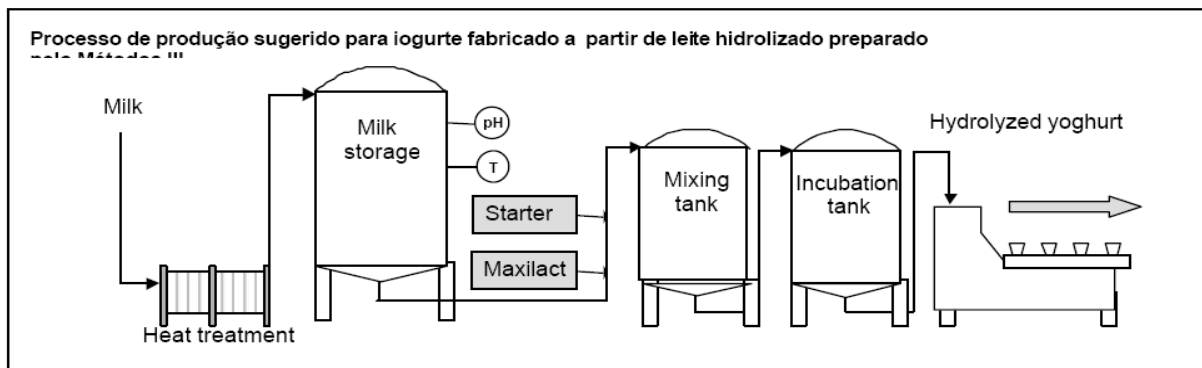
Hydrolyzed yoghurt = iogurte hidrolizado

Método I:

- A. O leite pasteurizado é resfriado a uma temperatura de 6-10 °C (42-50°F), o pH do leite é de aproximadamente pH 6.6.
- B. Adicionar 1700-2000 de Unidades de Lactase Neutra (ULN) por litro de leite (4,6% de lactose). Misturar bem.
- C. Manter o leite a esta temperatura por 15 horas sob leve agitação.
- D. Submeter o leite ao tratamento térmico normal e adicionar o fermento láctico.

Método II:

- A. Pasteurizar e resfriar o leite a 37°C (98.6°F), o pH do leite deve ser de aproximadamente pH 6.6.
- B. Adicionar cerca de 1700 Unidades de Lactase Neutra por litro de leite (4,6% de lactose). Misturar bem.
- C. Manter o leite a esta temperatura por 4 horas sob leve agitação.
- D. Submeter o leite ao tratamento térmico normal e adicionar o fermento láctico.



Milk = Leite **Heat treatment**: Tratamento térmico
Milk storage: Tanque de estocagem **pH** = pH **T** = T
Maxilact = Maxilact **Starter**: fermento láctico
Mixing tank: Tanque de mistura **Incubation tank**: Tanque de incubação **Hydrolyzed yoghurt** = Iogurte hidrolizado

Método III:

Como pré-condição para este terceiro método a temperatura de incubação não pode ultrapassar os 40 °C (104 °F). A diminuição do pH deve ser determinada durante um processo de acidificação normal para calcular quanto tempo é necessário para que seja atingido um valor de pH abaixo de 5.7. Neste valor de pH a lactase será inativada, no entanto, o tempo necessário para que pH 5.7 seja atingido pode ser usado para a hidrólise. A quantidade de Maxilact® a ser usada deve ser suficiente para produzir 85% de hidrólise neste espaço de tempo (Ver "Efeito da concentração de Maxilact®"). A dosagem de lactase pode ser reduzida por meio de uma pré-hidrólise de curta duração, por exemplo, adicionar Maxilact® 1-2 horas antes de fermento láctico.

Redução do teor de sacarose em iogurte de frutas ou queijo quark contendo lactose hidrolizada

É um fato bem conhecido que a lactose hidrolizada (glicose + galactose) é mais doce do que a lactose. A doçura relativa, comparada à doçura da sacarose, é de aproximadamente 0.20 para lactose e 0.75 para lactose que sofreu 85% de hidrólise.

Tomando por base a doçura relativa de um litro de leite hidrolizado pode-se calcular que:

- 1 litro de leite contém 46 g de lactose
- 85 % de hidrólise resulta em 41 g de glicose + galactose, além de uma quantidade remanescente de 7 g de lactose.

Agora o aumento do poder adoçante pode ser calculado como se segue:

41 x 0.75	=	30.8g	de eq. sac.
(g de gli+gal)			
7 x 0.20	=	1.4g	de eq. sac.
(g de lactose)			
TOTAL	=	32.2g	de eq. sac.

ORIGINALMENTE

46 x 0.20	=	9.2 g	de eq. sac.
(g de lactose)			
Após hidrólise	=	32.2 g	de eq. sac.
Aumento poder =		23.0 g	de-eq. sac.
Adoçante			

C. Aplicações de Maxilact® em soro

1. Soro, concentrados de proteína de soro e proteína de soro para consumo humano.

A hidrólise parcial da lactose aumenta o poder adoçante do produto final, bem como a solubilidade dos açúcares. A mistura de glicose/galactose tem, dependendo da concentração, poder de doçura equivalente a 65-80% do poder adoçante da sacarose. Xaropes com boa estabilidade microbiológica contendo até 75% de sólidos totais podem ser preparados e usados em diversos tipos de aplicação.

1.1 Produtos de Panificação: Pães, Biscoitos e Bolos

Visto que xarope de soro consiste basicamente de uma mistura de proteínas não-desnaturadas e açúcares, tanto clara de ovo quanto sacarose podem ser substituídos por este ingrediente. Estudos indicaram que até 30% da clara de ovo pode ser substituída, ao passo que os açúcares individuais no xarope contribuem para o escurecimento e desenvolvimento de cor desejados no produto acabado após o fornecimento.

1.2 Doces e Produtos de Confeitaria

Xaropes de soro hidrolizado podem substituir altas porcentagens do leite condensado adoçado usado na fabricação de *toffees*, *fudge*, balas e doce de leite. Além de melhorar a caramelização, o uso deste ingrediente evita que a textura do produto final seja prejudicada pela arenosidade causada por cristais de lactose.

1.3 Sorvete, Frozen Yoghurt e Sobremesas

Soro hidrolizado pode substituir tanto sacarose quanto leite. Seu uso melhora as características de derretimento do sorvete e do *frozen yoghurt* (ponto de congelamento mais baixo). Não haverá desenvolvimento de arenosidade, mesmo durante estocagem prolongada.

2. Soro e permeado de soro para rações animais

Soro e permeado de soro hidrolizados podem ser usados em rações animais ou como aditivos em silagem. Em rações animais, a lactose hidrolizada é melhor absorvida do que a lactose normal por várias espécies de animais, resultando em melhores taxas de conversão alimentar.

Quando silagem é preparada a partir de capim com baixo nível de carboidratos solúveis, as bactérias do ácido lático não conseguem produzir quantidade adequada de ácido lático, reduzindo sensivelmente a durabilidade da silagem. A hidrólise de soro ou permeado de soro permite obter um xarope concentrado, de boa estabilidade e com extrato seco de até 75%, tornando possível a estocagem em estado líquido. O uso deste xarope em silagem aumenta sua vida útil e sua qualidade (menor probabilidade de formação de ácido butírico). O xarope também incorpora nutrientes valiosos à silagem.

O método mais comum para hidrolizar concentrado de soro doce é descrito abaixo:

Concentração do soro: 28-50%
 pH : 5.8-6.3
 Temperatura : 38-40°C
 Tempo de hidrólise : 12-30 horas
 Grau de hidrólise: 70-90%
 Dosagens necessárias (g/kg concentrado de soro doce):

ES %	pH	Temp.(°C)	L2000
50	6	38	3.1
40	6	38	2.5
37	6	38	2.3
28	6	38	1.75

É possível continuar o processo de concentração até obter um material com extrato seco de 70-80 %. Recomenda-se resfriamento rápido a 15-20°C (59-68°F) para evitar o desenvolvimento da reação de escurecimento não-enzimático de Maillard.

Para maiores informações, favor entre em contato com:

DSM Food Specialties
Dairy Ingredients
 P.O. Box 1 2600 MA Delft
 The Netherlands
 Tel.: +31-15-2792355
 Fax: +31-15-2793200

ou com nosso representante local:

As informações contidas neste folheto são precisas e completas segundo nossos melhores conhecimentos. No entanto, nenhuma das informações fornecidas deve ser considerada como garantia ou especificação de qualidade".

ANEXO B
FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES DA ENZIMA LACTASE,
MAXILACT LX 5000 ®

*Folha de Especificações***MAXILACT® LX5000****Propriedades físicas**

Descrição	Maxilact® é uma preparação líquida purificada de lactase derivada da levedura láctea <i>Kluyveromyces lactis</i> . O produto tem o certificado Kosher.
Cor	Castanho pálido a castanho escuro.
Transparência	Transparente a opalescente.

Propriedades químicas

Actividade	≥ 5000 NLU/g
pH	6.9 - 7.6
Glicerol	≥ 47% (w/w)
Metais pesados	≤ 30 ppm (como Pb)
Chumbo	≤ 5.0 ppm
Arsênico	≤ 3.0 ppm
Mercúrio	≤ 0.5 ppm
Cádmio	≤ 0.5 ppm

Propriedades microbiológicas

Contagem em placas standard	≤ 100 em 1 ml
Leveduras	≤ 10 em 1 ml
Mofos	≤ 10 em 1 ml
Bactérias anaeróbias sulfito redutoras	≤ 30 em 1 ml
Coliformes	≤ 1 em 1 ml
Salmonella	ausentes em 25 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausentes em 1 ml
<i>Escherichia coli</i>	ausentes em 25 ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausentes em 25 ml
Actividade antibiótica	Ausente por teste.
Mycotoxinas	ausente por teste

O produto cumpre com as especificações de pureza da FAO/WHO's Comitê Conjunto de Especialistas de Aditivos Alimentares (JECFA), com o Código Químico Alimentar (FCC) e com as diretrizes para Enzimas Alimentares do Comitê Científico para Alimentação (SCF) da UE.

Estocagem e estabilidade

O produto deve ser armazenado nos recipientes originais selados. A temperatura de armazenagem recomendada é 4 - 8°C. Se mantido nestas condições o prazo de validade é 24 meses e a perda de actividade é inferior a 5% ao ano.

Esta especificação pode ser modificada sem aviso prévio.

Recomenda-se entrar em contato com a DSM Food Specialties para a versão mais recente desta folha de especificações.