

PAULA CHIEPPE PARIZZI

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM CRIOGEL
SUPERMACROPOROSO PARA HIDRÓLISE DA LACTOSE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P234i
2015
Parizzi, Paula Chieppe, 1988-
Imobilização de Beta-galactosidase em criogel
supermacroporoso para hidrólise de lactose / Paula Chieppe
Parizzi. – Viçosa, MG, 2015.
xiv, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Antonio Minim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.52-56.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Beta-galactosidase.
3. Lactose - Hidrólise. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

PAULA CHIEPPE PARIZZI

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM CRIOGEL
SUPERMACROPOROSO PARA HIDRÓLISE DA LACTOSE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de Setembro de 2015

Valéria Paula Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Monique Renon Eller
(Coorientadora)

Luana Cristina Andrade da Silva

Luis Antonio Minim
(Orientador)

Dedico

Aos meus amados pais Paulo e Fátima pelo
eterno incentivo e apoio.

“O tempo é...
lento demais para aqueles
que esperam
rápido demais para aqueles
que tem medo
longo demais para aqueles
que sofrem
curto demais para os que
estão alegres mas,
para os que amam o tempo é
eternidade”

WILLIAM SHAKESPEARE

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pelo incentivo e oportunidade.

Ao CNPq e CAPES, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Ao professor Luís Antonio Minim, por toda a orientação, amizade, paciência, ensinamentos e confiança.

À professora Valéria Paula Rodrigues Minim pela amizade, carinho e sugestões sempre válidas.

À professora Monique Eller pelo apoio, atenção dispensada, disponibilidade e sugestões criativas.

À Doutora Luana Cristina Andrade que cordialmente aceitou o convite de participar como membro da banca que avaliou este trabalho.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, carinho, paciência e torcida para que tudo desse certo. Aos meus avós, padrinhos, tios e primos pelas palavras de carinho e confiança.

À minha irmã, amiga e sócia Fernandinha pela amizade incondicional, paciência e momentos de descontração. À minha querida amiga Lu pelas inspirações e ensinamentos de como virar adulta.

À Priscila que me ensinou a como ser uma mestranda em todos os sentidos. Aos amigos do laboratório, Janaína, Lizzy, Isabelle, Paula, Marcela, Luana, Douglas e Vivi pelos aprendizados compartilhados.

Às meninas da análise sensorial Marcinha, Kika, Ritinha e Andrea pelo cafezinho da tarde e companheirismo.

Ao George pelas contribuições estatísticas e ensinamentos para a vida.

Ao Paracetamal e ao Clube da Luluzinha pelos necessários momentos de diversão em BH. À todos meus amigos, que mesmo de longe sempre estiveram do meu lado, motivando e apoiando.

Aos meus tios Eduardo, Cláudia, Beto, Titita pela companhia e carinho em viçosa. À tia Sandra e ao tio Tito pelas correções e toques especiais.

Ao Leo pelas “psicoaulas” de personal e ao Guilherme pela paciência e carinho.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos serviços prestados.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, o meu sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

Paula Chieppe Parizzi, filha de Paulo Parizzi e Fátima Chieppe Parizzi, nasceu em 02 de julho de 1988 em Belo Horizonte-MG.

Em 2012, graduou-se no curso de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais.

No mesmo ano, ingressou no programa de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Defendeu a dissertação em Setembro de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIações.....	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 LACTOSE E SEUS MONÔMEROS.....	3
2.1.1 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	5
2.1.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	5
2.1.3 TRANSGALACTOSILAÇÃO ENZIMÁTICA	5
2.2 INTOLERÂNCIA À LACTOSE	6
2.2.1 IMPORTÂNCIA DA HIDRÓLISE E DA TRANSGALACTOSILAÇÃO DA LACTOSE EM PRODUTOS LÁCTEOS	7
2.3 ENZIMAS.....	10
2.3.1 β - GALACTOSIDASE	10
2.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	12
2.5 SUPORTES MONOLÍTICOS	15
2.6 CRIOGÉIS.....	17
2.6.1 CRIOGÉIS ATIVADOS E IMOBILIZADOS POR LIGAÇÕES COVALENTES	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 MATERIAIS	23
3.2 EQUIPAMENTOS.....	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	23
3.3.1 PROTEÍNA TOTAL.....	24
3.3.2 ATIVIDADE LIVRE ESPECÍFICA.....	24

3.3.3	ELETROFORESE EM GEL	25
3.4	PRODUÇÃO DE CRIOGEL IMOBILIZADO COM B-GALACTOSIDASE	26
3.4.1	PRODUÇÃO DO CRIOGEL	26
3.4.2	ATIVAÇÃO DO CRIOGEL COM GLUTARALDEÍDO	27
3.4.3	IMOBILIZAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE	27
3.4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA ENZIMÁTICA LIVRE, RESIDUAL E IMOBILIZADA	28
3.4.5	ATIVIDADE LIVRE E RESIDUAL	28
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIORREATOR	29
3.5.1	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	29
3.5.2	POROSIDADE, FRAÇÃO TOTAL DE ÁGUA E CAPACIDADE DE INCHAMENTO ...	29
3.5.3	DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) E COEFICIENTE DE DISPERSÃO AXIAL	30
3.6	HIDRÓLISE DA LACTOSE EM CRIOGEL ATIVADO COM B-GALACTOSIDASE	31
3.7	RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO E DA ATIVIDADE RECUPERADA	32
3.7.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	34
4.2	PRODUÇÃO DE CRIOGEL E IMOBILIZAÇÃO COM B-GALACTOSIDASE	37
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HIDRODINÂMICA DOS CRIOGÉS IMOBILIZADOS COM B-GALACTOSIDASE	41
4.4	HIDRÓLISE DA LACTOSE EM CRIOGEL ATIVADO COM B-GALACTOSIDASE ...	47
4.5	RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO E ATIVIDADE RECUPERADA	49
	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lactose e seus monômeros, galactose e glicose.	3
Figura 2 - Mecanismo esquemático da atuação da β -gal.....	11
Figura 3 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a - 20 °C e (B) gel de dextrana convencional preparado em temperatura ambiente.....	18
Figura 4 - Técnica de imobilização enzimática, método epóxi.	20
Figura 5 - Técnica de imobilização enzimática, método da base de Schiff.	21
Figura 6 - Técnica de imobilização enzimática, método do glutaraldeído.	22
Figura 7 - Atividade livre total, U (\blacktriangle) e atividade livre específica, Ae (\bullet) da β -galactosidase para diferentes concentrações da enzima.	36
Figura 8 – Fotografia do gel de eletroforese em que a banda da amostra A corresponde à proteína de soroalbumina bovina (66 kDa) e as bandas da amostra B correspondem ao EE.....	37
Figura 9 – Esquema demonstrativo da química de síntese do criogel pela reação de crio-copolimerização dos monômeros acrilamida, AGE e MBAAM.	38
Figura 10 – (a) Criogel sintetizado seco em BOD à 60 °C, (b) Criogel sintetizado saturado de água, (c) Criogel imobilizado com β -galactosidase e seco em BOD e (d) Criogel imobilizado com β -galactosidase.	39
Figura 11 – Quantidade de proteína imobilizada (mg) para cada condição de pH analisada.....	41
Figura 12 - Imagens da estrutura do criogel ativado com glutaraldeído e imobilizado com β -galactosidase obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV).....	42
Figura 13 - Porosidade do criogel puro e contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.	43
Figura 14 – Fração total de água no criogel puro contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.	44
Figura 15 – Capacidade de inchamento do criogel puro e contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.	45

Figura 16 - Curvas da distribuição do tempo de residência para imobilização enzimática em pH 4,0, 7,0 E 9,0.....	46
Figura 17 - Curvas de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de fluxo na coluna de criogel. Pontos em negrito representam imobilização pH = 4, pontos vermelho representam pH = 7 e pontos em verde pH = 9. A curva ajustada é apresentada em azul.	47
Figura 18 – Atividade específica imobilizada para cada condição de pH analisada.	48
Figura 19 – Rendimento da imobilização () e atividade recuperada () para cada condição de pH de imobilização.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da lactose relevantes na indústria de alimentos.....	4
Tabela 2 - Mercado de alimentos destinados a consumidores com algum tipo de intolerância alimentar em milhões de dólares.....	8
Tabela 3 - Mercado de alimentos funcionais/fortificado em milhões de dólares.	8
Tabela 4 - Projeção do mercado de alimentos destinados a consumidores com algum tipo de intolerância alimentar em porcentagem.	9
Tabela 5 – Projeção do mercado de alimentos funcionais/fortificado em porcentagem.....	9
Tabela 6 – Propriedades da β -galactosidases microbianas obtidas de diferentes fontes.	12
Tabela 7 - Delineamento experimental composto por três diferentes pH's de imobilização.....	33
Tabela 8 – Concentrações EE utilizadas para determinação da atividade livre específica.....	34
Tabela 9 – Atividade livre e da atividade livre específica da β -galactosidase para diferentes concentrações da enzima.	35
Tabela 10 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH no processo de imobilização da β -galactosidase.....	40
Tabela 11 – Resumo de ANOVA da porosidade para as diferentes condições de pH de imobilização.	44
Tabela 12 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH de imobilização na atividade específica do criogel.	48
Tabela 13 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH de imobilização no rendimento da imobilização e na atividade recuperada do biorreator.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Área da seção transversal (m ²)
AAM	Acrilamida
AGE	Alil-glicidil-éter
APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina de soro bovina
C	Concentração da proteína na fase móvel (mg.mL ⁻¹)
C _i	Capacidade de inchamento (g H ₂ O.g ⁻¹ criogel)
D _{ax}	Coefficiente de dispersão (cm ² min ⁻¹)
DTR	Distribuição do tempo de residência
kDa	Unidade de massa molecular: 10 ³ Dalton
L	Comprimento da coluna (m)
MBAAM	N,N-metilenobisacrilamida
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PTN	Proteína
Q _a	Vazão de água pela coluna (mL min ⁻¹)
R ²	coeficiente de determinação
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
t _R	Tempo de residência (s)
u	Velocidade intersticial do fluido na coluna (m s ⁻¹)
U _L	Velocidade superficial do líquido (m s ⁻¹)
UV	Ultravioleta
VC	Volumes de coluna
W _{1/2}	Largura do pico medida à meia altura (s)
φ	Porosidade do criogel
ΔP _a	Queda de pressão na coluna (MPa)
\bar{t}	Tempo de residência médio da curva de DTR (s)
μ _a	Viscosidade da água (Ns m ⁻²)
σ _t ²	Variância da curva de DTR (s ²)
μm	Unidade de medida: 10 ⁻⁶ m

RESUMO

PARIZZI, Paula Chieppe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2015. **Imobilização de β -galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise da lactose.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Monique Renon Eller.

Criogéis são considerados como uma das fases estacionárias mais promissoras para uso comercial, como sendo uma alternativa para colunas de leite empacotado, devido à sua excelente estabilidade física e química e desejáveis características hidrodinâmicas. São de fácil preparação *in situ* e os monômeros usualmente utilizados são solúveis em água permitindo a biocompatibilidade do leite. Devido à presença de grandes poros, a clarificação de soluções particuladas ou viscosas não é considerada um problema, além de que o processo de transferência de massa é puramente convectivo, eliminando problemas difusionais encontrados em leitos fixos convencionais. Considerando estas importantes características, o objetivo deste trabalho foi produzir um criogel supermacroporoso combinado com a imobilização da enzima β -galactosidase para desenvolver um biorreator para hidrólise de lactose do leite, uma vez que há um grande interesse na produção de produtos delactosados destinados aos consumidores intolerantes à lactose. Os criogéis foram produzidos pela técnica de criopolimerização de acrilamida e bisacrilamida, seguida de ativação covalente com glutaraldeído para imobilização da enzima β -galactosidase. Por meio da caracterização morfológica e hidrodinâmica dos criogéis foi possível observar um gel esponjoso com uma estrutura de poros interconectados, com diâmetros variando entre 10 e 100 μm e com baixa dispersão axial. Foi estudado o efeito do pH de imobilização na capacidade de ligação proteica ao suporte e na sua capacidade de hidrólise. Observou-se que o fator pH de imobilização não influenciou na quantidade da proteína total imobilizada no criogel, mas influenciou diretamente no rendimento da imobilização. Verificou-se um maior rendimento de imobilização em pH 4,0, comparado ao pH 7,0, embora a atividade recuperada não tenha sofrido influência do pH.

ABSTRACT

PARIZZI, Paula Chieppe, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, September, 2015. **Immobilization of β -galactosidase in cryogel supermacroporous for lactose hidrolisis**. Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Monique Eller

Cryogels are one of the most promising stationary phases for commercial use, as an alternative to packed bed columns, due to their excellent physical and chemical stability and desirable hydrodynamic characteristics. These supports exhibit easy *in situ* preparation and the common use of water soluble monomers provides high levels of biocompatibility. Due to the presence of large pores, clarification of particulate or viscous solutions would not be considered a problem. In addition, the mass transfer process is purely convective eliminating diffusion problems found in conventional fixed beds. Considering these important features, the objective of this work was to synthesize a supermacroporous cryogel combined with the immobilization of β -galactosidase enzyme to develop a bioreactor for milk lactose hydrolysis, since there is great interest in the production of lactose free products for a class of lactose intolerant consumers. The cryogels were produced by the cryopolymerization of acrylamide and bisacrylamide, followed by covalent activation with glutaraldehyde aiming the β -galactosidase immobilization. The morphological and hydrodynamic characterization of cryogels showed a spongy gel structure with interconnected pores of diameters ranging between 10 and 100 μm and low axial dispersion. The effect of the pH of immobilization on protein binding and hydrolysis capacity of the support was studied. It was observed that the pH of immobilization did not influence the amount of total protein immobilized in the cryogel but directly influenced the yield of immobilization. There was a greater yield of immobilization at pH 4, compared to pH 7, although the recovered activity has not been influenced by the pH.

1. INTRODUÇÃO

Em processos biotecnológicos muito se têm estudado a respeito de enzimas imobilizadas e suas vantagens comerciais. A obtenção de enzimas, mesmo que a partir de microrganismos, pode ser muito trabalhosa e onerosa. A imobilização enzimática, quando bem sucedida, permite que a enzima seja reutilizada sucessivas vezes, podendo, em alguns casos, aumentar a estabilidade e a atividade catalítica da enzima.

Uma enzima pode ser imobilizada em diferentes tipos de suportes, como sílicas, membranas, quitosanas, polímeros entre outros. Estudos vem sendo realizados para determinar o melhor suporte e a melhor técnica de imobilização para as diferentes enzimas e os seus respectivos usos.

A lactose é um dissacarídeo presente em leites e derivados, alimentos considerados fontes de cálcio e de muita importância na alimentação humana. A β -galactosidase é uma hidrolase responsável pela quebra da lactose em seus monômeros galactose e glicose. Esta enzima está presente no sistema digestivo humano, mas em algumas situações sua funcionalidade é limitada, causando desconfortos gástricos. Daí a importância da produção de alimentos ausentes de lactose. A β -galactosidase imobilizada em um suporte adequado pode facilitar o processamento desses alimentos.

Monólitos poliméricos, como os criogéis que são géis poliméricos formados em condições de temperatura de congelamento, podem ser utilizados como suportes para a β -galactosidase. O criogel é uma variação de leite monolítico que permite o escoamento desobstruído de soluções particuladas, como o leite ou o soro de leite, ricos em lactose. Esta característica do criogel se deve à sua rede de mesoporos interconectados que favorecem o processo convectivo dentro do leite.

Considerando a importância de melhorar o processamento de alimentos ausentes de lactose, neste trabalho estudou-se a imobilização da β -galactosidase em diferentes condições de pH em criogéis supermacroporosos

ativados covalentemente com glutaraldeído. A proposta apresentada visa permitir a reutilização da enzima, além de melhorar sua atividade hidrolítica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LACTOSE E SEUS MONÔMEROS

A lactose, Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc, um dissacarídeo encontrado naturalmente apenas no leite, é formado por monossacarídeos de D-galactose (Gal) e D-glicose (Glc), ligados covalentemente por uma ligação O-glicosídica (Figura 1). A lactose é um açúcar redutor, pois o carbono anomérico da unidade de glicose está disponível para oxidação (NELSON e COX, 2013).

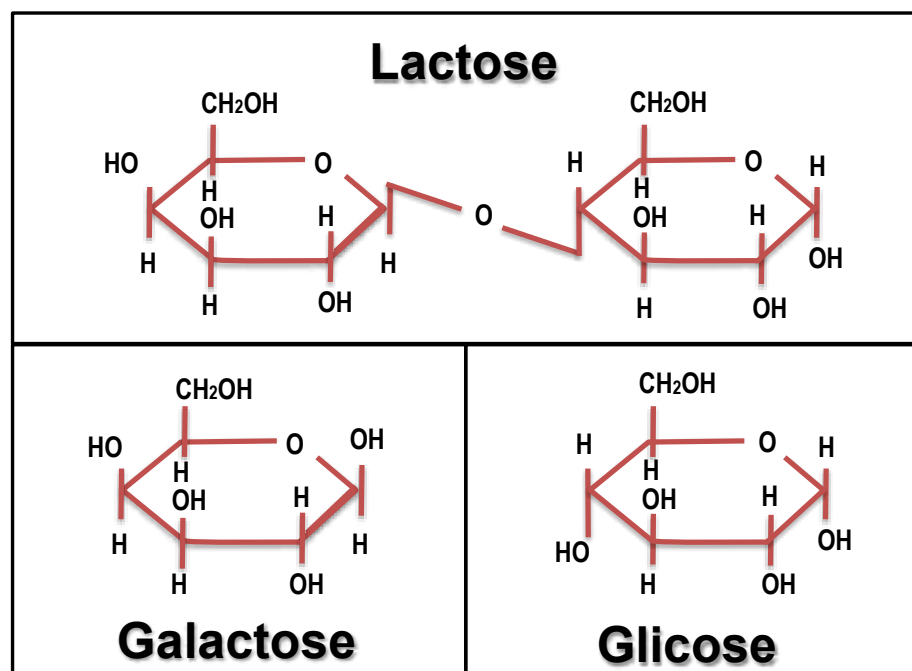


Figura 1 - Lactose e seus monômeros, galactose e glicose.

Fonte: WATTIAUX, 2006.

A lactose é o carboidrato mais abundante no leite e possui um baixo poder adoçante, enquanto que seus monômeros, individualmente, são capazes de propiciar maior doçura aos alimentos. A concentração de lactose no leite varia entre os mamíferos de 2,0 a 8,5%. No leite humano a concentração pode

chegar a 7%, enquanto que em vacas e cabras mantem-se na faixa de 4,5 a 4,8% (FENNEMA, 2009).

Durante o período de amamentação a lactose é responsável pelo fornecimento de até 40% da energia necessária para o crescimento e desenvolvimento do lactente. Esta energia é proveniente da hidrólise completa da lactose e seus monômeros, e para isto a criança conta com lactases, presentes no intestino delgado, capazes de realizar esta reação (FENNEMA, 2009).

A lactose está presente como dissacarídeo no leite e em outros produtos lácteos não fermentados. Iogurtes e queijos, alimentos lácteos que sofrem algum tipo de fermentação, apresentam um menor teor deste açúcar, pois parte é convertido em ácido láctico ou outros compostos.

Este açúcar apresenta propriedades físicas e químicas que podem ser desejáveis e indesejáveis para a indústria de alimentos, conforme descrito na Tabela 1. O realce do sabor em alguns produtos e a baixa higroscopicidade são consideradas propriedades vantajosas. Por outro lado, a sua baixa solubilidade pode acarretar problemas sensoriais em alguns alimentos.

Tabela 1 - Propriedades da lactose relevantes na indústria de alimentos.

Desejáveis	Indesejáveis
Promove sabor suave	Possui baixo poder adoçante, 60% menos doce que a sacarose
Acentua sabores naturais	Apresenta baixa solubilidade, causando cristalização
Molécula não higroscópico	Apresenta baixa digestibilidade, principalmente em adultos
Participa em reação de Maillard, desejável para produtos de panificação	Necessidade de hidrólise para absorção
Auxilia na absorção de cálcio pelo intestino	
Aumenta a produção benéfica de ácido láctico no intestino	

Fonte: Adaptado de YANG e SILVA (1995).

Quando a lactose sofre uma reação de hidrólise, ela se quebra em seus dois monômeros, galactose e glicose . Estes apresentam maior poder adoçante e maior solubilidade que o dissacarídeo, além de não necessitarem de lactases para serem digeridos e absorvidos pelo intestino humano. A hidrólise da lactose pode ocorrer de duas maneiras principais: via ácida ou enzimática.

2.1.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

A hidrólise ácida requer elevadas concentrações de ácidos (pH 1,0 – 2,0) e altas temperaturas (até 150 °C). Não é utilizada na indústria de alimentos, pois subprodutos indesejados são formados ao final da reação. Seu uso está mais relacionado à formação de um hidrolisado que atua como substrato, fonte de carbono, para produção de etanol por microrganismos (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005; PEREZ *et al.*, 2007).

2.1.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática da lactose, por emprego da β -gal, é mais utilizada e estudada pela indústria de alimentos e a enzima responsável por esta reação é a β -galactosidase. Esta reação pode ser realizada em condições mais brandas de temperatura e pH, dependendo da origem da enzima, além de não haver formação de subprodutos indesejados. Muitos sistemas enzimáticos para hidrólise da lactose podem ser utilizados para as enzimas tanto em sua forma livre ou imobilizada (FREITAS, 2007). O importante é que haja uma relação favorável entre o custo da enzima e o rendimento da hidrólise.

2.1.3 TRANSGALACTOSILAÇÃO ENZIMÁTICA

A mesma β -galactosidase responsável pela hidrólise da lactose, também é fundamental para a transgalactosilação da mesma. Nesta reação, a enzima é capaz de transferir uma unidade de galactose da lactose para alguns

ceptores, dentre eles a própria lactose. Os produtos deste reação são os galactooligossacarídeos (GOS), considerados fatores bifidogênicos para o intestino humano. Os GOS possuem maior poder adoçante, são de fácil digestão e aumentam a absorção de cálcio pelo organismo (JURADO *et al.*, 2002).

2.2 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

A intolerância à lactose é uma deficiência que acontece em aproximadamente 70% da população mundial e envolve a ausência ou a má absorção intestinal da lactose, podendo ser dividida em dois tipos, a congênita e a hipolactasia. A primeira acontece quando a criança já nasce com uma deficiência genética e não produz a lactase, enzima responsável pela hidrólise da lactose e, conseqüentemente, pela absorção deste carboidrato no trato digestivo.

A hipolactasia pode ser primária ou secundária, sendo que em ambas a produção da lactase é reduzida, de modo que a digestão da lactose fica comprometida. A hipolactasia primária decorre do envelhecimento, quando há a tendência de que o corpo reduza a produção desta enzima. Diferentemente da primária, a hipolactasia secundária é uma deficiência reversível, ocasionada por doenças intestinais como a doença celíaca, doença de Crohn e gastroenterite (MATTAR e MAZO, 2010).

Em todas as situações, os sintomas da intolerância são os mesmos, que incluem inchaço do trato gastrointestinal ocasionando náusea e vômitos, gases, cólicas e diarreia. A intensidade dos sintomas irá variar de acordo com a quantidade de lactose ingerida pelo indivíduo e a capacidade do mesmo em digerí-la (BRASIL, 2013).

2.2.1 IMPORTÂNCIA DA HIDRÓLISE E DA TRANSGALACTOSILAÇÃO DA LACTOSE EM PRODUTOS LÁCTEOS

Os alimentos funcionais e fortificados são definidos pela Euromonitor (2014) como aqueles compostos por ingredientes considerados benéficos para a saúde humana. Tal ingrediente deve possuir um valor nutricional além daquele já proporcionado naturalmente pelo alimento. Outro critério para o reconhecimento de um alimento como funcional ou fortificado é o de que a adição desses ingredientes deve ser realizada durante o processamento do produto.

Dados da Euromonitor (2014) indicam que no Brasil o mercado de alimentos e bebidas ligados à saúde e bem-estar movimentou US\$ 750 bilhões em 2013. Neste universo, a significativa parcela de US\$ 264 bilhões corresponde somente aos produtos funcionais ou fortificados, como é o caso dos alimentos adicionados de GOS, um segmento que desde 2008 cresceu 37,5%, representando o maior crescimento dentro da categoria, que cresceu 27,9% no mesmo período.

Produtos lácteos que submetidos ao processo de hidrólise da lactose não podem ser classificados como alimentos funcionais. Entretanto, são considerados alimentos funcionais quando a transgalactosilação foi predominante e o alimento passa a ser fonte de GOS.

Ambos produtos, tanto o delactosado quanto o considerado fonte de GOS, apresentam uma grande importância para a saúde humana. O número de brasileiros que apresentam esta deficiência ainda é incerto, mas a Agência Brasil (2013) reportou que em 2013 cerca de 40% dos brasileiros apresentavam intolerância à lactose. Levando em consideração que o leite é uma importante fonte de cálcio, principalmente para os indivíduos de idade mais avançada, produtos que atendam a essa demanda são cada vez mais requeridos pela população.

Conforme histórico demonstrado nas Tabelas 1 e 2 e projeções incluídas nas Tabelas 3 e 4, ao se comparar o Brasil com países como os Estados

Unidos, Japão, Chile e Argentina constata-se que esses mercados vêm aumentando desde 2009, indicando-se uma projeção de crescimento até 2019.

Tabela 2 - Mercado de alimentos destinados a consumidores com algum tipo de intolerância alimentar em milhões de dólares.

País	Ano					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Estados Unidos	2.939,8	2.989,4	3.143,8	3.379,3	3.672,8	3.802,3
Japão	44,4	44,1	44,0	43,7	43,1	43,2
Brasil	44,3	56,8	11,7	127,2	142,3	156,7
Chile	12,0	15,6	17,3	21,8	24,9	28,9
Argentina	23,0	29,5	38,1	50,2	66,8	88,7

Fonte: EUROMONITOR (2014).

Tabela 3 - Mercado de alimentos funcionais/fortificado em milhões de dólares.

País	Ano					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Estados Unidos	51.036,3	52.422,5	55.539,5	57.592,0	58.289,5	60.121,6
Japão	17.621,0	18.073,0	17.764,9	18.036,6	18.433,3	18.888,5
Brasil	6.881,4	8.063,5	9.681,1	11.075,8	12.451,9	14.564,0
Chile	626,9	713,1	811,3	955,8	1.096,6	1.302,9
Argentina	404,1	517,7	655,3	843,8	1.103,1	1.398,5

Fonte: EUROMONITOR (2014).

Tabela 4 - Projeção do mercado de alimentos destinados a consumidores com algum tipo de intolerância alimentar em porcentagem.

País	Ano					
	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Estados Unidos	100,0	102,1	103,9	105,7	107,4	109,2
Japão	100,0	100,2	100,5	99,7	98,9	98,0
Brasil	100,0	108,8	116,9	124,2	131,5	138,9
Chile	100,0	111,4	123,3	135,7	148,3	161,6
Argentina	100,0	101,5	104,9	109,8	116,7	125,5

Fonte: EUROMONITOR (2014)

Tabela 5 – Projeção do mercado de alimentos funcionais/fortificado em porcentagem.

País	Ano					
	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Estados Unidos	100,0	99,1	100,0	100,8	101,8	102,7
Japão	100,0	101,0	101,7	101,8	101,9	102,1
Brasil	100,0	109,1	121,3	131,8	142,0	152,9
Chile	100,0	112,7	127,6	145,5	167,2	194,6
Argentina	100,0	105,3	111,5	117,5	124,5	131,7

Fonte: EUROMONITOR (2014).

A hidrólise da lactose também é importante para a obtenção de outras melhorias tecnológicas em derivados lácteos dentro da indústria de alimentos, como a melhor solubilidade e redução de incidência de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado além de melhorar características sensoriais, tal como o incremento no poder adoçante, implicando em menor adição de sacarose e conseqüente redução no conteúdo calórico (JURADO *et al.*, 2002).

2.3 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos que promovem a catálise de biomoléculas, sendo consideradas componentes chave para muitas atividades do organismo, principalmente o processamento de alimentos (GUISAN, 2006)

São compostos com alto grau de especificidade por um substrato, ocasionando a geração de pouco ou nenhum tipo de subproduto, devido à sua estrutura tridimensional determinada pela sequência de aminoácidos e pelas interações intermoleculares entre grupamentos dos átomos de aminoácidos e as moléculas do solvente e dos reagentes (CLARK e BLANCH, 1997). A especificidade de cada enzima é estabelecida pelo sítio ativo, que é formado por um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que se ligam ao substrato por ligações covalentes ou outros tipos de interações.

2.3.1 β - GALACTOSIDASE

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é da classe das hidrolases, ou seja, uma enzima responsável por reações de hidrólises. Promove a clivagem da lactose em seus dois monômeros, galactose e glicose, podendo realizar ainda neste mesmo substrato a transgalactosilação via atividade galactosil transferase. A β -galactosidase (β -gal) possui afinidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO *et al.*, 2002).

A lactose é hidrolisada a galactose e glicose quando a água atua como aceptor. Contudo, outros açúcares presentes na solução podem servir como aceptores, levando à formação dos galactooligossacarídeos. A ligação entre unidades de galactose, ou seja, a eficiência da transgalactosilação, e os tipos de componentes gerados no produto final dependerão da enzima e das condições de reação. A cinética da conversão da lactose é considerada um modelo de inibição competitiva, pois a partir do início de formação, a galactose

irá competir com a lactose pelos sítios ativos da enzima (MARTINS e BURKERT, 2009). Portanto, em relação à transgalactosilação, a água pode ser considerada como um fator desfavorável para a síntese de GOS quando presente em grande quantidade no sistema reacional.

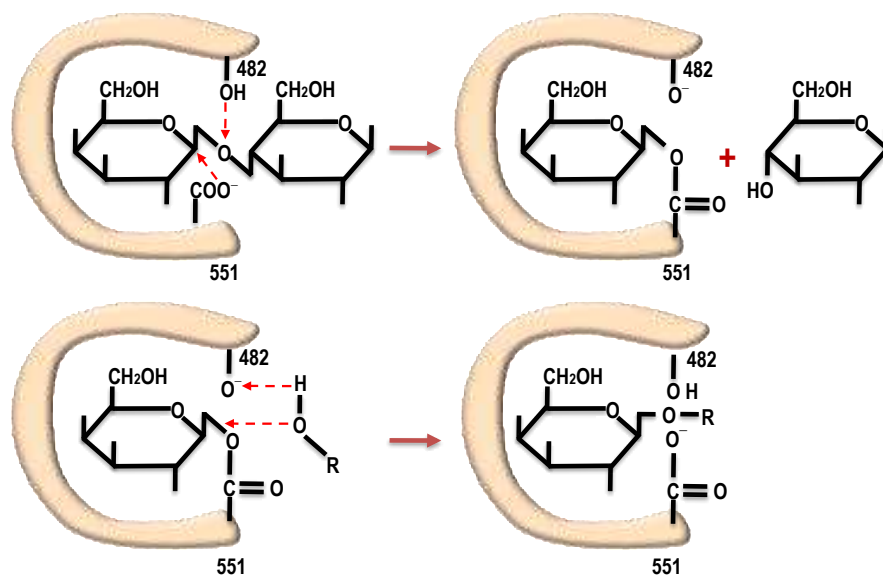


Figura 2 - Mecanismo esquemático da atuação da β -gal.

Fonte: Adaptado de ZHOU e CHEN (2001a)).

A β -gal pode ser obtida a partir de uma grande variedade de fontes, como de microrganismos, de plantas ou de células animais. Contudo, de acordo com a fonte utilizada suas características cinéticas em função da temperatura e pH podem variar. Aquelas originadas de microrganismos são as mais interessantes do ponto de vista tecnológico, apresentando amplas vantagens como fácil manuseio e elevada produção. A β -gal pode ser obtida a partir de diferentes microrganismos, tais como bactérias, fungos e leveduras. Alguns recebem destaque em função da capacidade e do valor de produção, como é o caso do fungo *Aspergillus oryzae* e das leveduras *Bullera singularis*, *Kluyveromyces fragilis* e *K. lactis*, sendo que as duas últimas apresentam maior capacidade de hidrolisar a lactose. As duas primeiras estão sendo amplamente estudadas com a função de transgalactosilação e estão apresentando resultados

satisfatórios. β -galactosidase proveniente do microrganismo *Bullera singularis* ainda não é encontrada comercialmente, enquanto que a originada a partir do *Aspergillus oryzae* pode ser facilmente adquirida em forma de pó. As propriedades destas enzimas obtidas de diferentes fontes biológicas, descritas na Tabela 5, irão variar com relação a alguns parâmetros como o pH ótimo, concentração e temperatura do meio de reação (PANESAR *et al.*, 2010). Contudo, é importante salientar que em sistemas envolvendo o setor alimentício é indispensável o emprego de enzimas reconhecidas como seguras para estes fins (GRAS). Neste caso, as quatro enzimas supracitadas são consideradas GRAS.

Tabela 6 – Propriedades da β -galactosidases microbianas obtidas de diferentes fontes.

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Massa Molar (KDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3 - 4	2,5 – 8	Nenhum	55 - 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	3,5 - 8	Nenhum	50 - 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5 – 7,5	Mn ²⁺ , K ⁺	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	6 - 8	Mn ²⁺ , Na ⁺	35	135

Fonte: MAHONEY, 1981 e LÓPEZ-LEIVA, 1985.

2.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Um dos fatores limitantes para o uso em larga escala de processos enzimáticos é o alto custo das enzimas, e para contornar este problema, tem-se como alternativas tecnológicas, o uso de enzimas imobilizadas, as quais podem ser recuperadas após uma batelada, ou usadas em processamento contínuo. Certamente, o uso desta tecnologia é um fator determinante na viabilização comercial destes processos.

Além do uso contínuo das enzimas imobilizadas, que gera uma economia devido ao alto custo de algumas enzimas, este tipo de técnica

apresenta outras vantagens. Estudos indicam que, quando confinadas de maneira eficiente, as enzimas podem manter a estabilidade e boa atividade catalítica equivalente ou melhor que enzimas em solução (MARIOTTI *et al.*, 2008). É importante salientar que o custo para imobilização deve ser favorável para utilização da enzima imobilizada, caso contrário esta seria uma desvantagem do processo. Outras desvantagens envolvem a perda de atividade devido à imobilização, e as limitações da transferência de massa em determinados suportes (BAYRAMOGLU *et al.*, 2007).

Para a imobilização ocorrer de forma satisfatória algumas propriedades dos suportes devem ser consideradas, como elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano e alta densidade de grupos reativos presentes na superfície dos mesmos (MATEO *et al.*, 2007; MENDES, A. A. *et al.*, 2011a; TALBERT; GODDARD, 2012).

Nos últimos 20 anos, a imobilização da β -gal em diferentes superfícies ganhou atenção da indústria alimentícia. Materiais como sílica, polímero de álcool polivinílico (PVA), micelas reversas, "Sephadex", alginato, quitosana, carragena, agarose, "nylon", vidro poroso e superfície de grafite foram utilizados como matrizes para o confinamento dessa enzima. Diferentes técnicas de imobilização foram analisadas, incluindo ligação cruzada, ligação covalente, adsorção e aprisionamento.(OBÓN *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; ZHOU e CHEN, 2001b; CALLERI *et al.*, 2004; JOVANOVIC-MALINOVSKA *et al.*, 2012). O Quadro 2 mostra as principais características das técnicas de imobilização. A escolha do suporte é tão importante quanto a técnica de imobilização, ambos podem influenciar na capacidade de ligação da enzima, na sua estabilidade e atividade catalítica (GÜRDAŞ *et al.*, 2012)

Técnica de imobilização	Princípio	Vantagens	Desvantagem
Adsorção física	Adsorção das moléculas de enzimas sobre a superfície de matrizes sólidas sob condições físicas e químicas apropriadas	Fácil preparação Reuso do suporte Manutenção da conformação enzimática e do seu sítio ativo	Grande dependência de fatores como pH, temperatura e concentração enzimática, causando desprendimento
Ligação covalente	Ligação entre a enzima e um grupamento químico ativado sobre o suporte	Ligação muito forte, não havendo perda de enzima durante bioprocessos Grande variedade de grupamentos químicos para ativação e de suportes a serem utilizados Reações de acoplamento enzima-suporte em condições brandas	Importante saber a estrutura da enzima, e na maioria dos casos isso não acontece Perda da atividade enzimática, por afetar o sítio ativo em alguns casos Reações para ativação do suporte em condições pouco brandas Não reutilização do suporte
Ligação cruzada	Ligações covalentes entre as moléculas de enzimas por ação de reagentes multifuncionais, conduzindo a agregados enzimáticos tridimensionais insolúveis em meio aquoso, sem utilizar suportes insolúveis	Enzimas imobilizadas em diferentes formas: géis enzimáticos, membranas enzimáticas e derivados adsorvidos em monocamadas Utilizada associada a outros métodos, como na adsorção física	Frequente e inevitável inativação da enzima Condições de reação são severas Grande dependência de fatores como pH, temperatura e concentração enzimática, tempo de reação e força iônica
Aprisionamento	Retenção física da enzima	Pode ser aplicado a qualquer tipo de enzima Processo simples Enzimas não sofrem modificações químicas	Limitado a substratos e produtos de baixo peso molecular

Quadro 1 – Principais técnicas de imobilização empregadas para imobilização enzimática.

Fonte: (FREITAS, 2007).

Klein *et al.* (2013) realizaram um estudo em que foi utilizado β -gal imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, formando um reator contínuo para síntese de GOS. Através desta pesquisa foi possível demonstrar que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade em diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de lactose (KLEIN *et al.*, 2013).

Contudo, a transferência de massa através da matriz polimérica pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através

da matriz pode ser um fator limitante para a catálise e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de superar esta influência (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

A imobilização de enzimas em suportes monolíticos supermacroporosos como os criogéis é uma alternativa para contornar os problemas de difusão dos substratos através do suporte e de transferência de massa (LOZINSKY *et al.*, 2001; ARVIDSSON *et al.*, 2003; CZERMAK *et al.*, 2004; PLIEVA *et al.*, 2008a). A estrutura macroporosa dos criogéis permite que a interação da fase móvel e da fase estacionária seja mais superficial, predominando o processo convectivo durante a transferência de massa, permitindo o escoamento desobstruído de soluções não clarificadas (BERRUEX *et al.*, 2000).

2.5 SUPORTES MONOLÍTICOS

As colunas monolíticas também conhecidas como leitos contínuos são definidos por Guiochon (2007), como uma peça contínua formada por um material poroso que é hermeticamente aderida à parede de um tubo, de maneira que a fase móvel desloque apenas pelo o leito. Estes leitos são capazes de aumentar a porosidade de colunas cromatográficas, aumentando sua permeabilidade, sem, no entanto diminuir sua eficiência. Logo, este tipo de coluna está sendo amplamente estudado para fins cromatográficos, principalmente na separação de biomoléculas.

Pode-se dizer que os leitos monolíticos porosos são formados por duas fases, uma composta por macroporos e a outra por mesoporos. Os macroporos são de tamanhos relativamente grandes, comparados ao de uma coluna cromatográfica comum, que formam canais interconectados entre si, por onde a fase móvel é facilmente deslocada. Ocupam a maior parte da coluna e são responsáveis pela elevada permeabilidade deste tipo de leito, assim como as suas tortuosidades e capacidade de constrição. É nesta fase também que o processo convectivo dentro do leito é favorecido.

A fase composta pelos mesoporos é aquela formada por poros de tamanhos bem menores, responsáveis pelo processo de difusão que ocorre nestes leitos. As características desta fase e a dos macroporoso é que definem a cinética de transferência de massa e a eficiência de um leito monolítico.

As colunas monolíticas podem ser constituídas por sílica ou polímeros. A primeira é a mais antiga e rendeu muitos estudos, mas sua preparação é complexa, tornando sua produção dentro de um laboratório de pesquisa inviável. Já aquelas constituídas por polímeros são de síntese mais simples, e podem ser facilmente produzidas *in situ*. Entretanto, a reprodutibilidade das mesmas é pouco discutida na literatura (GUIOCHON, 2007).

A formação de monólitos poliméricos envolve a copolimerização de monômeros (acrilamida) e monômeros reticulantes (metilenobisacrilamida), catalisada por persulfato de amônio e TEMED. Quando esta polimerização ocorre em meio aquoso, a água é o solvente responsável pela formação dos poros (agente porogênico). A polimerização feita *in situ* ocorre em um molde que pode ser uma coluna de vidro, seringa de plástico ou qualquer outro material.

Dependendo da atividade a que se destina, grupos funcionais podem ser adicionados nestes suportes monolíticos, seja durante a polimerização ou inseridos posteriormente na superfície externa. A imensa variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície permite que os monólitos poliméricos se adéquem a quase qualquer tipo de separação (GUIOCHON, 2007).

Levando em consideração a principal característica dos leitos monolíticos (sua permeabilidade), estes podem ser utilizados como suportes para imobilização enzimática. Os suportes monolíticos podem vir a ser umas das soluções para contornar problemas como transferência de massa e substratos formados por matrizes complexas e viscosas. Sendo assim, os criogéis apresentam alto potencial para o uso neste estudo.

2.6 CRIOGÉIS

Os criogéis são géis poliméricos formados em condições de temperatura de congelamento do solvente utilizado e foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação no final da década de 90 (LOZINSKY *et al.*, 2001). Hoje apresentam um elevado potencial para serem utilizados como suportes para imobilização enzimática.

Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 100 μm e se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento de fluidos e uma difusão desobstruída de solutos. Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA *et al.*, 2008b).

O criogel é obtido quando a polimerização de uma solução aquosa contendo monômeros e monômeros reticulantes é adicionada de catalisadores adequados e submetida ao resfriamento em condições criogênicas (abaixo de -10 °C). Ao se iniciar o processo de congelamento, os monômeros se concentram em uma microfase que ainda não se congelou. Dessa forma, um maior número de ligações entre os monômeros é realizado, formando-se um gel resistente. Ao descongelar tal material, o solvente cristalizado dá lugar a poros vazios, formando-se assim um criogel com estrutura supermacroporosa (ARVIDSSON *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2006a).

Uma grande variedade de criogéis foi preparada a partir de monômeros, incluindo 2-hidroxietilmetacrilato (PLIEVA *et al.*, 2007), acrilamida (PLIEVA *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2006b; YAO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008), dimetilacrilamida (KUMAR *et al.*, 2003), N-isopropilacrilamida (GALAEV *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 2007), e N-N-vinilcaprolactama (PETROV *et al.*, 2009).

Reticuladores como metilenobisacrilamida e *poli(etileno glicol diacrilato)* são utilizados na mistura de polimerização para reforçar a estrutura macroporosa e prevenir a dissolução do monólito na fase aquosa móvel

durante sua aplicação. A polimerização é normalmente iniciada com um sistema redox solúvel em água, incluindo persulfato de amônio e N,N,N,N tetrametil-etilenodiamina. A mistura de polimerização é preparada dissolvendo todos os componentes em água, seguida dos catalisadores. A mistura é rapidamente vertida em um recipiente apropriado e resfriada para uma temperatura abaixo de zero, sendo a polimerização realizada por até 24h (FIDELIS, 2011).

As etapas que envolvem concentração dos monômeros na mistura, concentração de monômero reticulante e temperatura de polimerização são consideradas críticas para formação da estrutura porosa do criogel

Na Figura 3 observa-se micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de estruturas preparadas a partir de uma mistura idêntica via polimerização em temperaturas de -20 e 20°C. Enquanto que a estrutura do material preparado à temperatura ambiente é compacta e praticamente sem funcionalidade para cromatografia, o criogel apresenta grandes poros interconectados, separados por paredes sólidas poliméricas, que permitem o fluxo por sua estrutura.

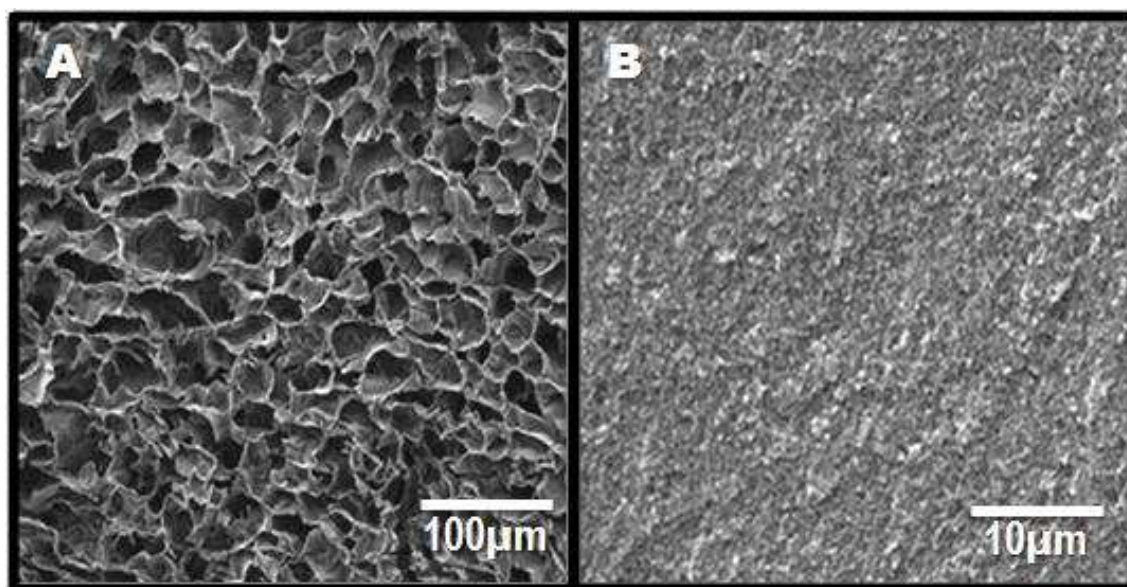


Figura 3 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a - 20 °C e (B) gel de dextrana convencional preparado em temperatura ambiente.

Fonte: PLIEVA *et al.*, 2007.

Este tipo de suporte apresenta algumas vantagens que o destaca para utilização em bioprocessos, que são: fácil preparação *in situ*, os monômeros usualmente utilizados são solúveis em água permitindo a biocompatibilidade do leito, apresentam características de formar leitos mecanicamente estáveis, rápida transferência de massa pelo leito e a permeabilidade não é significativamente afetada pela compressão do leito (GUIOCHON, 2007)

Uma desvantagem ressaltada por YAO (2006a), é que devido aos grandes poros existentes na matriz do criogel, a capacidade de adsorção de enzimas ou outras proteínas é limitada, devido à baixa área superficial, no entanto, modificações na matriz podem melhorar essa capacidade. O processo de imobilização de monômeros funcionais na superfície pode aumentar consideravelmente a densidade dos grupos funcionais de superfície, gerando uma maior capacidade para a coluna. Além disso, ocorre um aumento de área superficial à medida que esses ligantes poliméricos formam estruturas em forma de cerdas ou tentáculos (ARRUA *et al.*, 2009).

Os criogéis supermacroporosos tem sido usados com bastante sucesso no fracionamento de linfócitos de sangue de humanos (KUMAR *et al.*, 2003), cromatografia para purificação de células de *E.coli* (ARVIDSSON *et al.*, 2002) e captura direta de biomoléculas a partir de homogenizados celulares (ARVIDSSON *et al.*, 2003). Nos últimos anos, os criogéis têm sido utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de biomoléculas e ligantes. Para isto, diversos métodos de ativação para posterior imobilização têm sido relatados, como por exemplo, a ativação via ligação covalente, adsorção bioespecífica ou confinamento (MALLIK e HAGE, 2006).

2.6.1 CRIOGÉIS ATIVADOS E IMOBILIZADOS POR LIGAÇÕES COVALENTES

A imobilização via ligação covalente é normalmente realizada pelo escoamento de uma solução contendo as biomoléculas ou ligantes através do criogel ou por imersão do criogel (geralmente aqueles em formato de disco) nesta solução (KIM e HAGE, 2005). Um dos métodos empregados para a imobilização via ligação covalente é o método que envolve o ataque nucleofílico dos grupos epóxi do criogel (Figura 4) sobre os grupos amins das

proteínas ou ligantes, levando à formação de uma ligação amina secundária estável (MALLIK *et al.*, 2004). Este método foi utilizado para imobilizar proteínas, A, G e L (oriundas de cepas recombinantes de *Streptococci*), além de BSA e bradiginina em discos monolíticos e pode ser realizado em uma única etapa, apesar de apresentar uma taxa de reação mais lenta que os outros métodos disponíveis (BERRUEX *et al.*, 2000; GUPALOVA *et al.*, 2002; OSTRYANINA *et al.*, 2002). Dependendo das condições da reação, este método pode ser utilizado para imobilizar biomoléculas ou ligantes que contêm amina, sulfidril, ou grupos hidroxila (KIM e HAGE, 2005).

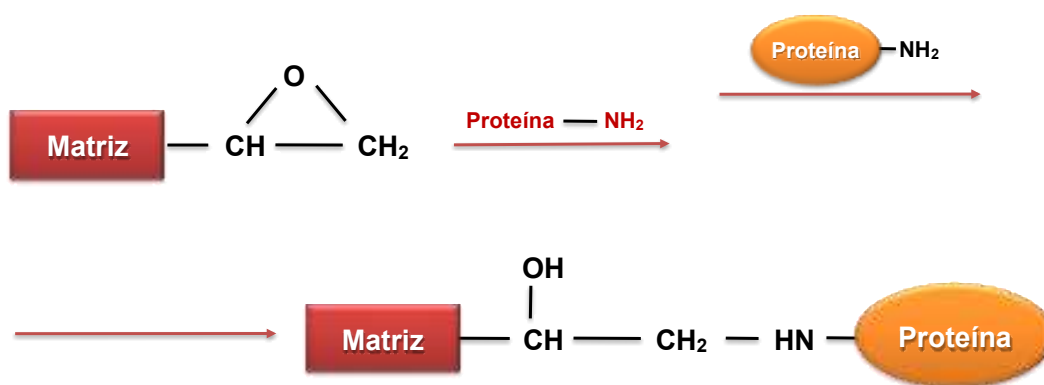


Figura 4 - Técnica de imobilização enzimática, método epóxi.

A segunda técnica que tem sido adaptada para a imobilização de biomoléculas ou ligantes no criogel, via ligação covalente, é o método da base Schiff (LUO *et al.*, 2002; MALLIK *et al.*, 2004). Este método é baseado no acoplamento de um grupo amina ao criogel. Primeiramente, os grupos epóxis são convertidos em dióis e estes são então oxidados com ácido periódico formando grupos aldeídos que podem interagir com aminas primárias de proteínas e outros ligantes, formando uma base de Schiff (Figura 5). Uma vez que esta é uma reação reversível, as bases de Schiff estáveis são obtidas por meio de reações de redução empregando cianoborohidreto de sódio (KIM e HAGE, 2005). O método da base de Schiff tem sido usado para imobilizar proteína A e anticorpos (LUO *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2005). Este método tende a ter uma taxa de reação mais rápida do que o método do epóxi e resulta em maior atividade das biomoléculas do que muitos outros métodos baseados no acoplamento de grupos amina. A principal desvantagem do método da base

Schiff é o uso de agentes redutores que podem afetar a biomolécula imobilizada (MALLIK *et al.*, 2004; KIM e HAGE, 2005).

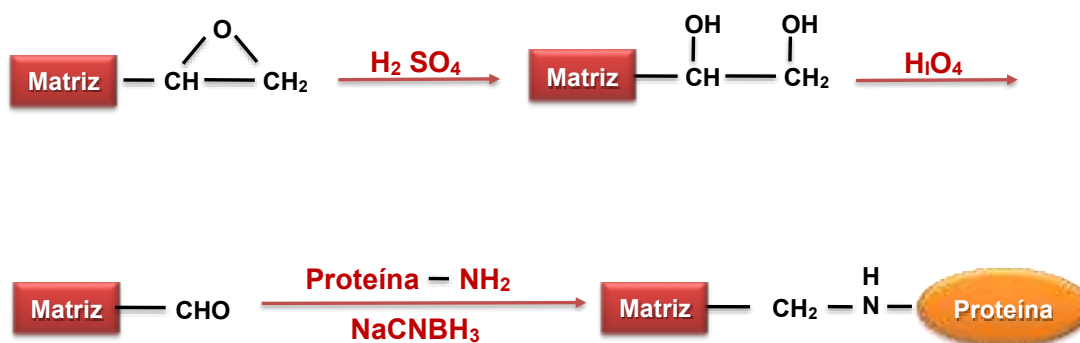


Figura 5 - Técnica de imobilização enzimática, método da base de Schiff.

Uma abordagem relacionada com a técnica da base de Schiff é o método do glutaraldeído (Figura 5). Neste método, um criogel epóxi-ativado é primeiro convertido a uma forma amina-ativado pela reação dos grupos epóxi com reagentes etilenodiamina (PETRO *et al.*, 1996) ou hexametilenodiamina (LUO *et al.*, 2002). O criogel amina-ativado reagirá então com um dialdeído (por exemplo, glutaraldeído) para produzir um criogel aldeído-ativado. Este método tem sido utilizado para a imobilização de proteína A e tripsina, também foi utilizado para imobilização da proteína concavalina A, com posterior adsorção e imobilização de inulinase, para produção de xarope com alto teor de frutose e apresenta as mesmas vantagens do método da base Schiff (ALTUNBAS *et al.*, 2013). Além disso, devido a um maior espaçamento entre o grupo ligante (biomolécula) imobilizado e a superfície do suporte (criogel), este método de imobilização tem sido útil para evitar efeitos de impedimento estérico (PETRO *et al.*, 1996; LUO *et al.*, 2002).

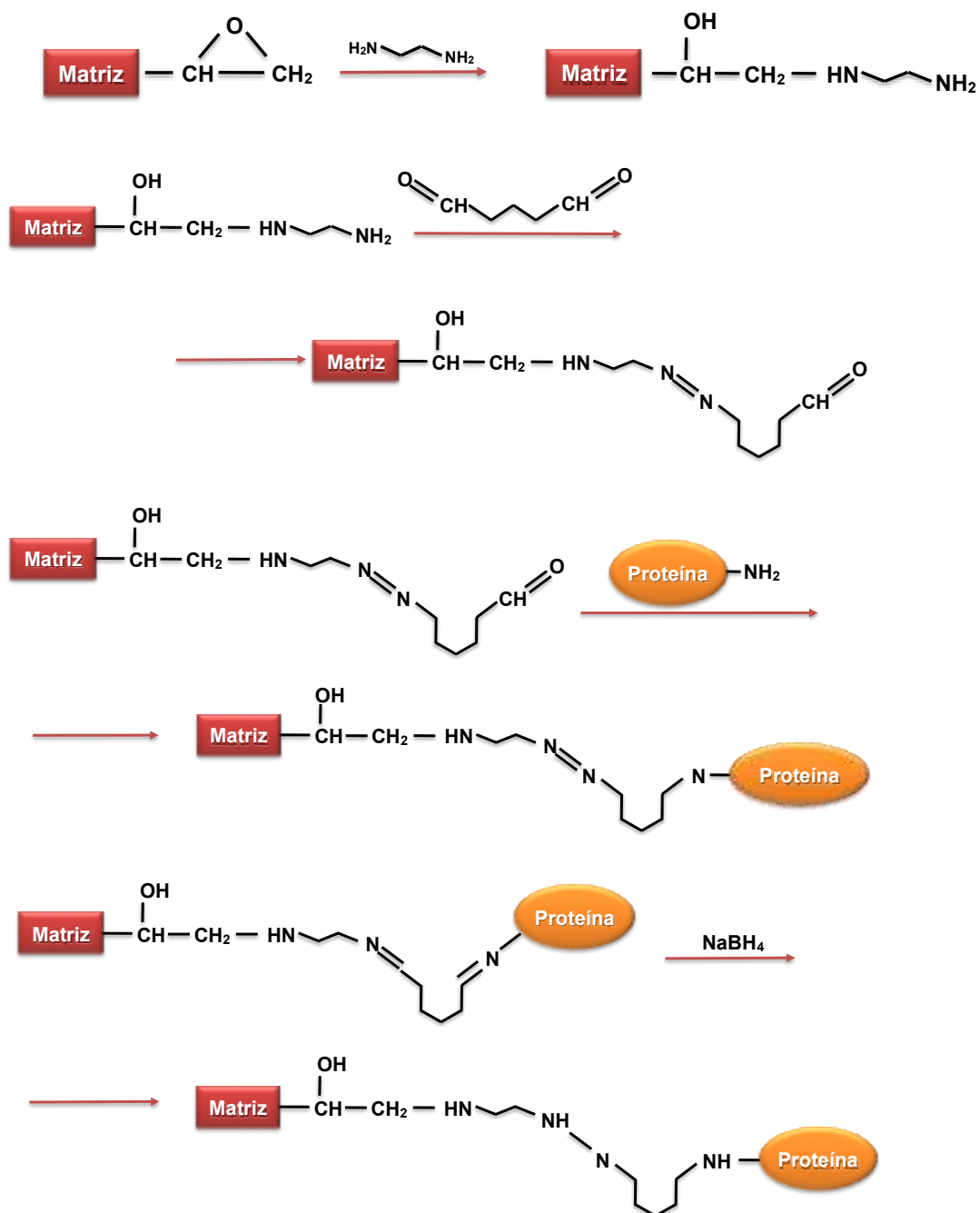


Figura 6 - Técnica de imobilização enzimática, método do glutaraldeído.

Outras técnicas que podem ser empregadas para a imobilização de biomoléculas ou ligantes no criogel, via ligação covalente, são o método do carbonildiimidazole (CDI), método do carbonato de di-succinimidil (DSC), método da hidrazida e método do brometo de cianogênio (CNBR) (GUSTAVSSON e LARSSON, 1999; LUO *et al.*, 2002; CALLERI *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2005; KIM e HAGE, 2005; XUAN e HAGE, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Acrilamida (AAm), alil-glicidil-éter (AGE), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina (TEMED), N,N-metilenobisacrilamida (MBAAm) e persulfato de amônio (APS), todos com 99% de pureza, extrato enzimático de β -galactosidase (EE) de *Aspergillus oryzae*, Glutaraldeído e Etilenodiamina foram obtidos da Sigma Aldrich Inc (EUA). A lactose foi obtida da Merck (EUA). Outros reagentes químicos usados foram de grau analítico.

3.2 EQUIPAMENTOS

Balança analítica (Shimatzu, USA), banho termostático (Quimis, Brasil), espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Scientific, EUA), bomba peristáltica, BOD, cromatógrafo preparativo (AKTA Pure, GE), pHmetro de bancada (Hanna instruments, USA).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

O extrato enzimático (EE) de β -galactosidase utilizado é oriundo do microrganismo *Aspergillus oryzae* e foi caracterizado quanto à atividade livre específica pelo método da glicose monorreagente e proteína total por Bradford.

3.3.1 PROTEÍNA TOTAL

A proteína total presente no EE foi determinada utilizando a metodologia de Kjeldah como descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, que baseia-se na determinação de nitrogênio total na amostra. Para os cálculos foi utilizado o fator de correção de 6,25. O resultado da proteína total no EE foi utilizado para a construção de uma curva analítica padrão para detecção de proteína em solução pelo método de Bradford (1976).

3.3.2 ATIVIDADE LIVRE ESPECÍFICA

A atividade específica enzimática foi realizada utilizando a enzima em sua forma livre, solubilizada em tampão pH 4,5, a 30 °C, como recomendado pelo fabricante. Em um tubo de 3mL foi adicionado 0,75 µL da solução de enzima e 1 mL do substrato, neste caso solução aquosa de lactose 40 mg.mL⁻¹ em pH 4,5. A reação ocorreu em banho termostático (Quimis, Brasil) a 30 °C por 10 minutos. Em seguida, a enzima foi inativada a 90 °C por 10 minutos. Esta etapa foi realizada variando a concentração do EE (5,0 mg.mL⁻¹ a 0,4 mg.mL⁻¹). A atividade foi determinada avaliando o teor de glicose liberado na reação, utilizando o kit Glicose Monoreagente, adquirido da Quibasa (São Paulo, Brasil).

Em um tubo de ensaio contendo 1mL da solução de enzima-substrato, foi adicionado 2 mL do glicose monoreagente. Após ser agitado em vórtex por 5 segundos, o tubo foi colocado em banho termostático a 37 °C por 30 minutos. A reação foi inibida a 90 °C por 10 minutos. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (Spectrophotometer UV-Vis Biomate 3, Thermo Scientific, USA), no comprimento de onda 540 nm. Uma curva analítica de calibração foi previamente preparada, utilizando diferentes concentrações de padrão de glicose, grau analítico (Sigma, USA). A atividade (U) foi expressa em termos de µmol de glicose produzida por minuto (equação 1) e a atividade específica (Ae) foi dada em termos de U por mg de enzima utilizada na reação de hidrólise (equação 2).

$$U = \frac{\mu\text{mol (glicose)}}{\text{min}} \quad (1)$$

$$Ae = \frac{U}{\text{mg (enz)}} \quad (2)$$

A quantificação da concentração de proteína total na solução foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (1976). Em um tubo de ensaio foram acondicionados 300 μL de uma solução contendo proteína e 3 mL da solução reagente de Bradford. O tubo foi agitado por 5 segundos e deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm. Uma curva analítica foi construída utilizando a β -galactosidase, nas concentrações entre 0,028 mg.mL^{-1} a 0,17 mg.mL^{-1} .

3.3.3 ELETROFORESE EM GEL

Eletroforese SDS-PAGE sob condições redutoras foi realizada mediante géis de concentração à base de poliacrilamida com 5% (m/v) em tampão Tris-HCl (0,5 mol L^{-1} ; pH 6,8) e géis de separação com 12% (m/v) de poliacrilamida em tampão Tris-HCl (1,5 mol L^{-1} ; pH 8,8), contendo 0,4% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) (ALFENAS, 2006).

As amostras de proteína (100 μL) e padrão foram dissolvidos em 500 μL de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol e em seguida aquecidos a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Foram aplicados nos géis volumes de 20 μL das amostras desnaturadas. A separação eletroforética foi realizada sob voltagem de 150 V por 2 horas para a completa separação das bandas de proteína.

Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel, coradas com 0,2% de azul de Coomassie, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 12% de ácido acético, durante 6 horas. A descoloração foi realizada durante 12 horas com uma solução a 50% de etanol e 12% de ácido acético.

3.4 PRODUÇÃO DE CRIOGEL IMOBILIZADO COM B-GALACTOSIDASE

3.4.1 PRODUÇÃO DO CRIOGEL

O processo de síntese do criogel foi realizado de acordo com Kumar *et al.*, 2006. A matriz do criogel de poli(acrilamida) foi produzida pela co-polimerização dos monômeros AAm e AGE e do monômero reticulante MBAAm, iniciada por APS e TEMED, dentro de colunas de vidro HR 5/10 e HR 5/5 (GE Healthcare®), ambas de 5 mm de diâmetro, em temperatura de congelamento de -12 °C.

Os monômeros (AAm e MBAAm) foram pesados em balança analítica (Shimatzu, USA) e dissolvidos em 20 mL de água ultrapura (MilliQ, Millipore®), perfazendo uma concentração final de 6% m/v (1,185 g de AAm, 0,3175 g de MBAAm). Em seguida, 0,25 mL de AGE foi adicionado à mistura de monômeros e esta foi desgaseificada em banho de ultrassom (Branson 1510 R-MT) durante 5 minutos, em seguida a solução foi vertida em balão volumétrico de 25 mL e seu volume completado com água ultrapura. Esta mistura foi realizada em banho de gelo, a fim de manter a temperatura do sistema a -12 °C, evitando possíveis polimerizações indesejáveis, durante este procedimento.

A polimerização foi iniciada pela adição de 27,5 mg de APS e 23,8 µL de TEMED, previamente resfriados em banho de gelo. Em seguida, a mistura foi agitada por 1 min, e então as colunas foram rapidamente preenchidas com a mistura reativa. Estas foram seladas em suas extremidades e imersas em um banho de etanol a -12 °C por 18 h, para cristalização da água e polimerização

do gel. Após isto, os criogéis formados foram descongelados sob refrigeração, por 24 horas e em seguida lavados com 200 mL de água ultrapura a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Para finalizar o preparo dos criogéis, os mesmos foram secos em BOD a 60 °C e armazenados em dessecadores.

O procedimento da produção do criogel foi realizado continuamente durante todo o experimento, a fim de obter criogéis suficientes para realização deste trabalho.

3.4.2 ATIVAÇÃO DO CRIOGEL COM GLUTARALDEÍDO

Para iniciar a ativação, um criogel de aproximadamente 3,5 cm foi hidratado com 20 mL de água ultrapura, para então ser equilibrado com 20 mL de solução de carbonato de sódio (0,2 mol.L⁻¹), pH 9,2. Uma solução 0,5 mol.L⁻¹ de etilenodiamina (25 mL) preparada em carbonato de sódio (0,2 mol.L⁻¹; pH 9,2) foi recirculada pela coluna por 90 minutos. Ao fim desta etapa, o criogel foi lavado com água, até que o pH da mesma, na saída da coluna, estivesse próximo a neutralidade.

A coluna foi então equilibrada com 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Em seguida, foi ativada com 25 mL de uma solução de glutaraldeído 2% (v/v) em tampão pH 7,2. Esta solução foi recirculada pela coluna por 2 horas, para completa ativação da mesma. Imediatamente, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão fosfato 20 mM, o mesmo utilizada para a imobilização da enzima.

Todas as etapas acima descritas foram realizadas em temperatura de 25 °C a uma vazão de 1 mL.min⁻¹.

3.4.3 IMOBILIZAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE

Os experimentos foram conduzidos em condições de pH variando de 4,0 a 9,0 para a solução de enzima a ser imobilizada. A solução enzimática de pH 4,0 foi preparada utilizando o tampão fosfato-cítrico, 20 mmol.L⁻¹ de fosfato e

10 mmol.L⁻¹ de ácido cítrico. Já as soluções de pH 7,0 e 9,0 foram preparadas utilizando tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹.

Para o procedimento de imobilização da β -galactosidase, uma solução de enzima (0,8 mg.mL⁻¹ de EE), preparada imediatamente antes desta etapa, foi recirculada pelo criogel por 9 horas. Em seguida, uma solução de borohidreto de sódio 0,1 M em carbonato de sódio, pH 9,2, a 4 °C, foi recirculada pela coluna durante 70 minutos. A coluna foi então lavada e equilibrada com tampão fosfato-cítrico pH 4,5, para posteriormente ser utilizada na reação de hidrólise da lactose.

3.4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA ENZIMÁTICA LIVRE, RESIDUAL E IMOBILIZADA

Para este estudo foi estabelecido que os termos “proteína livre” (P₀) e “proteína residual” se referem, respectivamente, à proteína presente na solução enzimática antes desta ser recirculada pela coluna durante a imobilização e após a recirculação.

A concentração de proteína presente nestas soluções foi determinada pelo método do Bradford. A proteína imobilizada (P_f) é determinada pela diferença entre as proteínas livre e residual. Todos os criogéis imobilizados foram pesados em balança analítica e foi determinada a quantidade de proteína imobilizada por grama de suporte (PI).

3.4.5 ATIVIDADE LIVRE E RESIDUAL

Para este estudo foi estabelecido que os termos “atividade livre” e “atividade residual” se referem, respectivamente, à atividade enzimática das soluções antes de serem recirculadas pela coluna e após a recirculação.

As atividades livre (U₀) e residual de cada solução enzimática foram determinadas seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO BIORREATOR

3.5.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Pequenos discos de um criogel imobilizado foram cortados da parte média da coluna monolítica e secos em estufa a 40 °C por 12 h. As amostras secas foram coladas com fita adesiva em um suporte porta-amostra (stub) e revestidas com uma camada de 20 nm de ouro em um metalizador (modelo 550X, SEM Electron Microscopy Sciences, Kent, Inglaterra). Foram então examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo 1430 VP, LEO, Zeiss, Jena, Alemanha) operado a 10 kV. As análises foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

3.5.2 POROSIDADE, FRAÇÃO TOTAL DE ÁGUA E CAPACIDADE DE INCHAMENTO

A porosidade dos criogéis (φ) foi estimada em função do teor de água livre e de seus respectivos volumes, de acordo com a metodologia de (YAO *et al.*, 2006a). Tal procedimento foi realizado com uma repetição em duplicata.

Os criogéis sintetizados e imobilizados foram saturados com água ultrapura em um recipiente, à temperatura ambiente, por uma hora. Em uma proveta graduada contendo um volume conhecido de água, V_1 , foi adicionada uma amostra de criogel que desloca o volume de água na proveta, este novo volume é conhecido como V_2 . O volume de cada amostra, V_0 , foi calculado pela diferença entre V_2 e V_1 , isto é; $V_0 = V_2 - V_1$. A massa das amostras saturadas com água, m_w , foi medida em uma balança analítica. As amostras foram, então, comprimidas com as mãos para a retirada da água livre no interior dos supermacroporos. Feito isso, as amostras foram novamente pesadas, para a determinação da massa das amostras sem água livre, m_s . A porosidade (φ) foi calculada utilizando-se a equação 3:

$$\varphi = \frac{m_w - m_s}{\rho_w V_0} \quad (3)$$

em que ρ_w é a densidade da água deionizada (kg m^{-3}) e V_0 é volume da amostra (m^3).

Posteriormente, as amostras foram secas a temperatura constante de 30°C , por 48 h para a determinação da massa das amostras secas (m_d), a qual foi utilizada para calcular a fração total de água (φ_w), que representa quanto do criogel é constituído por água (água livre nos poros + água de hidratação do criogel):

$$\varphi_w = \frac{m_w - m_d}{\rho_w V_0} \quad (4)$$

A capacidade de inchamento (S , kg.kg^{-1}) dos criogéis foi avaliada utilizando-se as amostras secas a 30°C durante 48 h. Tais criogéis foram re-hidratados com água ultrapura à temperatura ambiente, mantidos em um béquer por 12 h. A capacidade de inchamento foi calculada a partir da equação 5 (SAVINA *et al.*, 2005).

$$S = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (5)$$

3.5.3 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) E COEFICIENTE DE DISPERSÃO AXIAL

A dispersão axial no criogel (σ^2) e o tempo de retenção médio (t_R) foram avaliados por meio da medida da distribuição do tempo de residência (DTR) usando o método do pulso de um traçador sob diferentes vazões ($0,1$ a $1,6 \text{ mL min}^{-1}$), através de cromatografia preparativa (AKTA Pure, GE). Água ultrapura foi bombeada através da coluna a uma vazão constante, enquanto um pulso de traçador ($100 \mu\text{L}$ de acetona a $1\% \text{ v/v}$) foi injetado na coluna e a resposta correspondente na saída da mesma foi medida por um detector de absorvância na região do UV (280 nm). Os dados da DTR obtidos

para os diferentes valores de vazão do líquido foram usados para a determinação de σ^2 e t_R , segundo as equações 6 e 7:

$$t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad (6)$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (7)$$

em que Abs_i é a absorbância no i -ésimo tempo t_i , respectivamente.

O coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) foi determinado por meio de regressão não linear (equação 8), utilizando os valores de σ^2 e t_R para cada vazão

$$\frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(\frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad (8)$$

onde L é a altura do criogel (m) e u é a velocidade intersticial do fluido através do criogel ($u = U_L/\varphi$), φ é a porosidade do leito e U_L é a velocidade superficial do líquido (m s⁻¹).

3.6 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM CRIOGEL ATIVADO COM B-GALACTOSIDASE

A reação de hidrólise da lactose em criogel imobilizado com β -galactosidase (biorreator), foi realizada a 30 °C. Inicialmente, o biorreator foi equilibrado com tampão fosfato-cítrico, pH 4,5, por 30 minutos, mesmo tampão da solução de substrato, que consiste de uma solução de lactose 40 mg.mL⁻¹.

A solução de lactose foi bombeada pela coluna, por uma bomba peristáltica, a uma vazão de aproximadamente 0,25 mL.min⁻¹. Após 10 minutos, a solução da saída do biorreator passou a ser coletada, durante 7 minutos, perfazendo um volume total de 1,75 mL. O volume coletado (V_i) foi medido em proveta para posterior cálculo de atividade. Uma alíquota de 1 mL da solução coletada foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 2 mL da solução reagente do kit glicose monoreagente. Procedeu-se a determinação da atividade, como descrito no item 4.3.2. A atividade imobilizada foi expressa em termos de massa de glicose formada por minuto.

A atividade hidrolítica aparente (U_{gel}) de cada biorreator foi expressa em termos de atividade (U) por mg de suporte.

3.7 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO E DA ATIVIDADE RECUPERADA

O rendimento de imobilização da enzima (η) e a atividade hidrolítica recuperada (A_R) da enzima imobilizada no biorreator foram determinados utilizando as equações 9 e 10 (MENDES *et al.*, 2011):

$$\eta = \frac{P_f}{P_0} 100 \quad (9)$$

$$A_R = \frac{U_{gel}}{PI \cdot U_0} 100 \quad (10)$$

em que P_f é a quantidade de proteína imobilizada, P_0 a quantidade de proteína recirculada, U_{gel} é a atividade hidrolítica aparente do criogel ativado (U.mg⁻¹ de gel); U_0 é a atividade específica da solução de enzima no início da imobilização (U mg⁻¹ de proteína) e PI é a quantidade de proteína imobilizada por miligrama de gel (mg.mg⁻¹ de gel).

3.7.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi composto por três diferentes pH's para imobilização da enzima β -galactosidase, e está evidenciado na Tabela 7. As imobilizações em pH 4,0 e 9,0 foram realizadas em 3 repetições. Já em pH 7,0 foram realizadas 2 repetições. As análises de determinação de proteína, da atividade enzimática e caracterização hidrodinâmica foram feitas em duplicata para cada repetição.

Tabela 7 - Delineamento experimental composto por três diferentes pH's de imobilização.

Experimento	pH de imobilização
1	4,0
2	4,0
3	4,0
4	7,0
5	7,0
6	9,0
7	9,0
8	9,0

As análises que envolviam atividade enzimática e quantidade de proteína foram estudadas levando em consideração o fator pH de imobilização e para isso foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a fim de verificar se diferentes pH de imobilização influenciam na imobilização e na atividade enzimática. A porosidade, assim como a capacidade de inchamento e a fração total de água, também foram avaliadas por ANOVA, levando em consideração o fator pH de imobilização.

Os coeficientes de dispersão axial (D_{ax}) de cada amostra foram analisados pelo método da regressão com variáveis indicadoras, levando em consideração o fator pH de imobilização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

Com o intuito de determinar o teor de proteína total no EE, foi realizada a análise de Kjeldahl. Este experimento foi feito em duplicata utilizando 0,5 g de amostra em cada replicata. Considerando um fator de correção de 6,25, o teor de proteína obtido foi de $13,92 \pm 0,02\%$.

Durante a realização dos primeiros testes experimentais deste trabalho, se observou que ocorria uma redução da atividade específica enzimática livre com o aumento da concentração do EE em solução. Portanto, foi realizado um delineamento com o objetivo de estabelecer a concentração do EE que apresenta melhor atividade específica e que foi utilizada durante todo este trabalho (tabela 8).

Tabela 8 – Concentrações EE utilizadas para determinação da atividade livre específica.

Amostra	Concentração do EE (mg.mL ⁻¹)
Branco	0
1	5,0
2	3,0
3	1,0
4	0,8
5	0,6
6	0,4

A absorbância das amostras 1 a 6 foram medidas em espectrofotômetro e os valores de concentração foram determinados por meio de uma curva de calibração, previamente preparada utilizando diferentes concentrações de

padrão de glicose grau analítico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9. É possível constatar que as amostras de 3 a 5 apresentaram maior atividade, evidenciando uma maior concentração de glicose formada na solução. A diminuição da atividade livre com o aumento da concentração do EE em solução provavelmente se deve à presença de contaminantes no EE, que interferem de alguma maneira inibitória na atividade enzimática total.

Tabela 9 – Atividade livre e da atividade livre específica da β -galactosidase para diferentes concentrações da enzima.

Amostra	Concentração de proteína (mg.mL ⁻¹)	U (μmol.min ⁻¹)	Ae (U.mg ⁻¹)
1	0,539	0,040	0,995
2	0,332	0,041	1,662
3	0,123	0,0919	10,813
4	0,092	0,105	15,193
5	0,070	0,105	19,982
6	0,045	0,084	25,235

A atividade (U) é expressa em termos de μmol de glicose produzida por minuto e a atividade específica (Ae) é dada pela atividade por miligrama de enzima utilizada na reação de hidrólise. O fabricante garante uma atividade específica maior ou igual a 8 U.mg nas condições determinadas. Portanto, apenas as amostras de 3 a 6 atendem ao especificado, aquelas que apresentam concentração do EE igual ou inferior a 1mg.mL⁻¹. Esse resultado provavelmente se deve à baixa solubilidade da enzima utilizada e a possível formação de agregados proteicos quando solubilizada em concentrações maiores que 1 mg.mL⁻¹, mas nenhum relato sobre essa questão foi encontrado na literatura. A Figura 7 ilustra a queda da atividade enzimática com o aumento da concentração do EE.

Para as próximas etapas deste trabalho, optou-se pela utilização da concentração de EE de acordo com a amostra 4, cuja concentração de EE equivale a 0,8 mg.mL⁻¹ e a atividade específica foi 15,193 U.mL⁻¹. Apesar das

amostras 5 e 6 apresentarem atividade específica superior, a atividade livre total é igual ou superior na amostra 4.

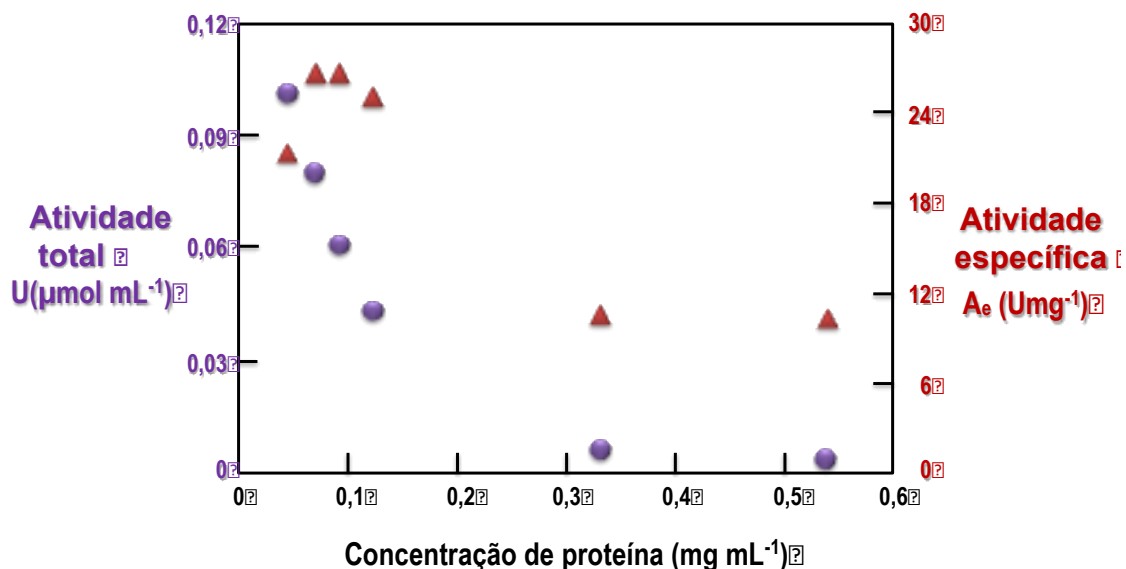


Figura 7 - Atividade livre total, U (\blacktriangle) e atividade livre específica, Ae (\bullet) da β -galactosidase para diferentes concentrações da enzima.

Devido ao baixo teor de proteína encontrado pelo teste de Kjeldahl, a SDS-PAGE foi realizada para avaliar qualitativamente o grau de pureza e a concentração da enzima β -galactosidase adquirida.

Para esta análise foram preparadas soluções de padrão de proteína BSA e do EE de β -galactosidase ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). As proteínas BSA e β -gal possuem peso molecular de 66 e 90 kDa, respectivamente. Para a amostra de enzima foram observados visualmente 3 bandas distintas. Isto indica que o EE contém outros componentes proteicos além da enzima e a soma destes corresponde a apenas 14% do total da massa do EE.

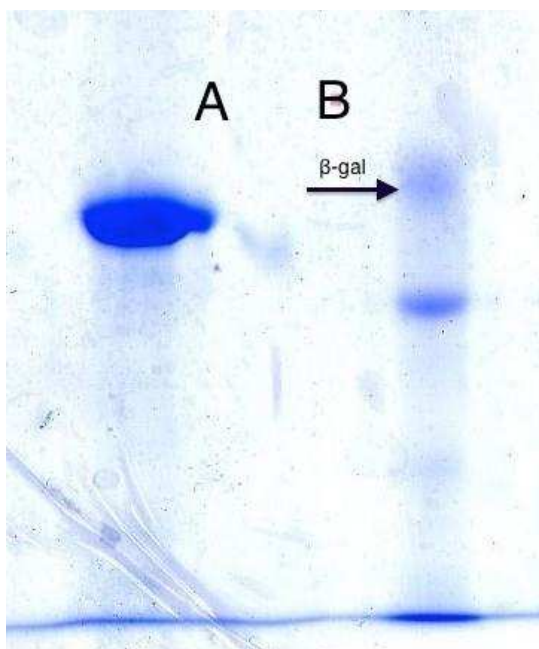


Figura 8 – Fotografia do gel de eletroforese em que a banda da amostra A corresponde à proteína de soroalbumina bovina (66 kDa) e as bandas da amostra B correspondem ao EE.

Gurdas (2012) empregou β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* para posterior imobilização por mecanismo de adsorção em resina duolite. A enzima empregada no estudo de Gurdas (2012) foi produzida pela Enzeco® e apresenta concentração proteica de aproximadamente 23%, maior que aquela encontrada neste trabalho, evidenciando que a obtenção de enzima pelo *Aspergillus oryzae* é de baixo rendimento e comercialmente são apenas encontrados preparados enzimáticos deste produto.

4.2 PRODUÇÃO DE CRIOGEL E IMOBILIZAÇÃO COM B-GALACTOSIDASE

Suportes contínuos supermacroporosos foram sintetizados em colunas de vidro de 5 mm de diâmetro, que consistiu na crio-copolimerização dos monômeros AAm e AGE e do monômero reticulante MBAAm, iniciada por APS e TEMED. A principal propriedade de um criogel, supermacroporosidade contínua, é adquirida através da cristalização do solvente utilizado em sua

fabricação, quando a temperatura é mantida abaixo daquela de congelamento, e neste caso o solvente é a água (ARVIDSSON *et al.*, 2003). Portanto, para o sucesso da síntese, os suportes foram mantidos a -12 °C por 18 horas.

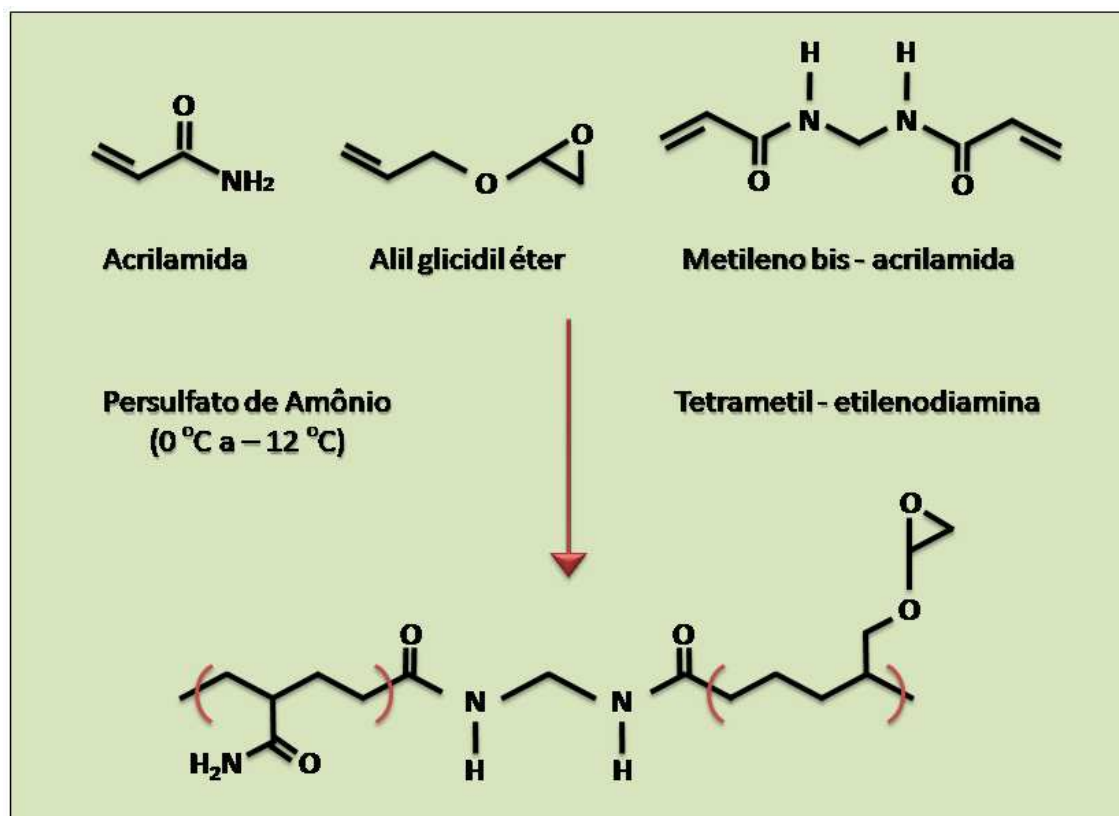


Figura 9 – Esquema demonstrativo da química de síntese do criogel pela reação de crio-copolimerização dos monômeros acrilamida, AGE e MBAAM.

Fonte:(MALLIK e HAGE, 2006).

Durante o congelamento, os monômeros e iniciadores são capazes de formar microzonas não congeladas neste sistema, enquanto que o solvente, ou seja, a água, encontra-se totalmente congelada. A polimerização ocorre exatamente nas microzonas não congeladas. Com o tempo os cristais formados pelo solvente crescem e se juntam a outros cristais, formando uma rede única de cristais interconectados. Ao fim das 18 horas de reação, os suportes sintetizados foram mantidos refrigerados até total descongelamento do solvente. A água descongelada dá lugar a macroporos interconectados, formando um sistema monolítico macroporoso, logo, o solvente é considerado o agente porogênico deste sistema.

Os criogéis foram retirados do interior da coluna e secos em BOD a 60 °C. Quando secos apresentaram fácil manuseio e foram cortados para padronizar a altura do suporte, que foi de 3 cm. A Figura 10a ilustra um criogel seco em BOD, que apresentou uma estrutura rígida, porém sensível de cor esbranquiçada, enquanto que a Figura 10b representa um criogel re-hidratado apresentando característica esponjosa e elástica. Estes criogéis podem ser secos e re-hidratados sem perder, aparentemente, suas características.

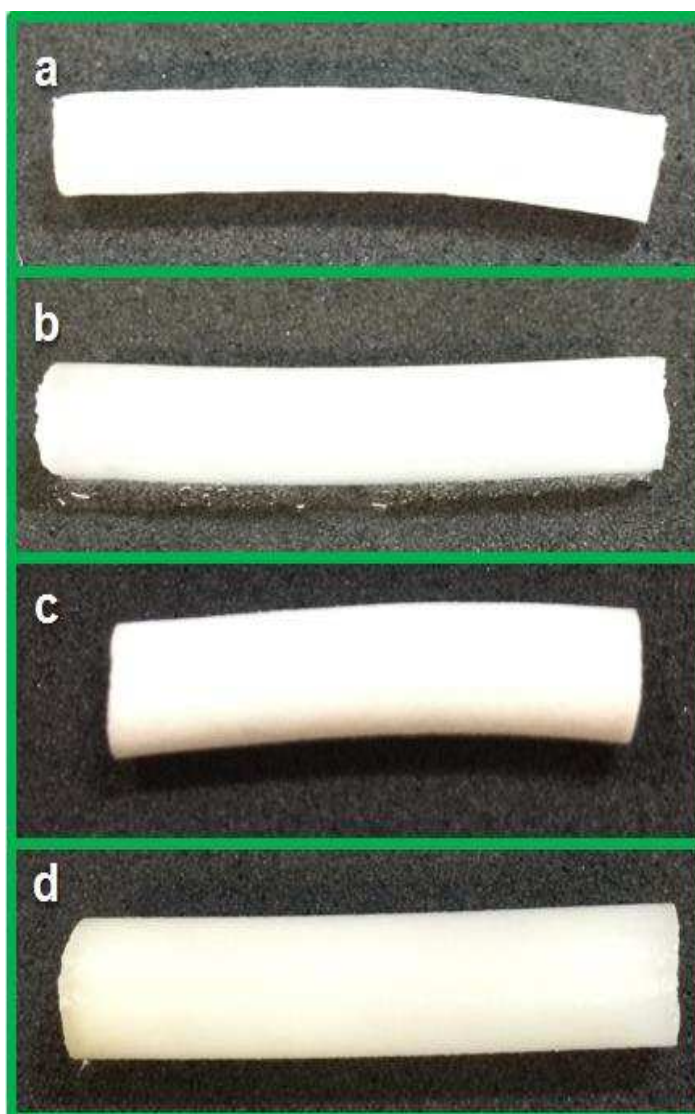


Figura 10 – (a) Criogel sintetizado seco em BOD à 60 °C, (b) Criogel sintetizado saturado de água, (c) Criogel imobilizado com β -galactosidase e seco em BOD e (d) Criogel imobilizado com β -galactosidase.

Os criogéis sintetizados foram utilizados como suportes para ativação com glutaraldeído e posterior imobilização da enzima β -galactosidase. O criogel ativado e imobilizado apresentou uma ligeira coloração amarela, diferentemente do criogel livre (sem ativação e sem enzima), como evidenciado na Figura 10d. Esta coloração se deve ao agente ativador glutaraldeído. As caracterizações morfológica e hidrodinâmica desses suportes foram realizadas após os testes de hidrólise, devido à perda de amostra durante estas análises, e estão representadas no item 5.4 deste trabalho.

No processo de imobilização da enzima no suporte macroporoso variou-se o pH da solução de β -galactosidase a ser imobilizada no criogel. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância a fim de se verificar a influência do pH sobre a quantidade de proteína imobilizada. O resultado da ANOVA realizada pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH no processo de imobilização da β -galactosidase.

FV	GL	QM	Pr>F
pH	2	$5,78 \cdot 10^{-4}$	0,686
Resíduo	5	$1,40 \cdot 10^{-3}$	
Total	7		

Nota-se que o fator pH de imobilização não afetou significativamente ($p > 0,1$) na quantidade total de proteína imobilizada por este processo.

A Figura 11 ilustra o gráfico da quantidade de proteína imobilizada para cada pH, onde é possível observar que a condição de pH 9,0 apresentou um elevado coeficiente de variação, o maior entre as outras duas condições de pH. A deficiência de repetibilidade encontrada pode significar variações inerentes ao processo, uma variabilidade que ainda não se conseguiu controlar durante a realização dos experimentos

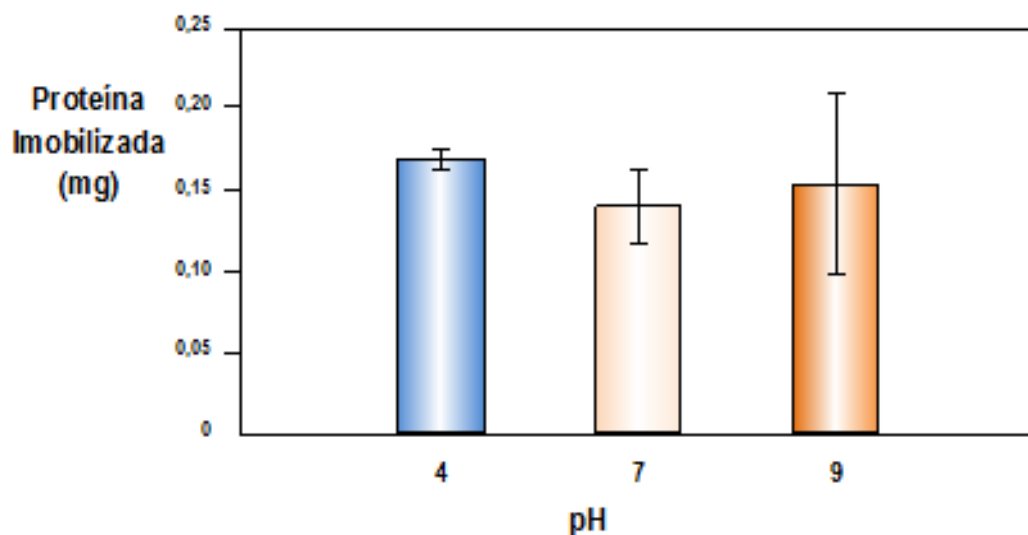


Figura 11 – Quantidade de proteína imobilizada (mg) para cada condição de pH analisada.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HIDRODINÂMICA DOS CRIOGÉS IMOBILIZADOS COM B-GALACTOSIDASE

A avaliação morfológica dos suportes monolíticos supermacroporosos foi realizada através da análise de microscopia de varredura, realizada pelo Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa

Na Figura 12, é possível observar macroporos interconectados entre si e que variam em tamanhos de 10 a 100 μm . Resultados semelhantes a este foi encontrado por Plieva (2004), cujos poros obtidos variavam de 5 a 100 μm .

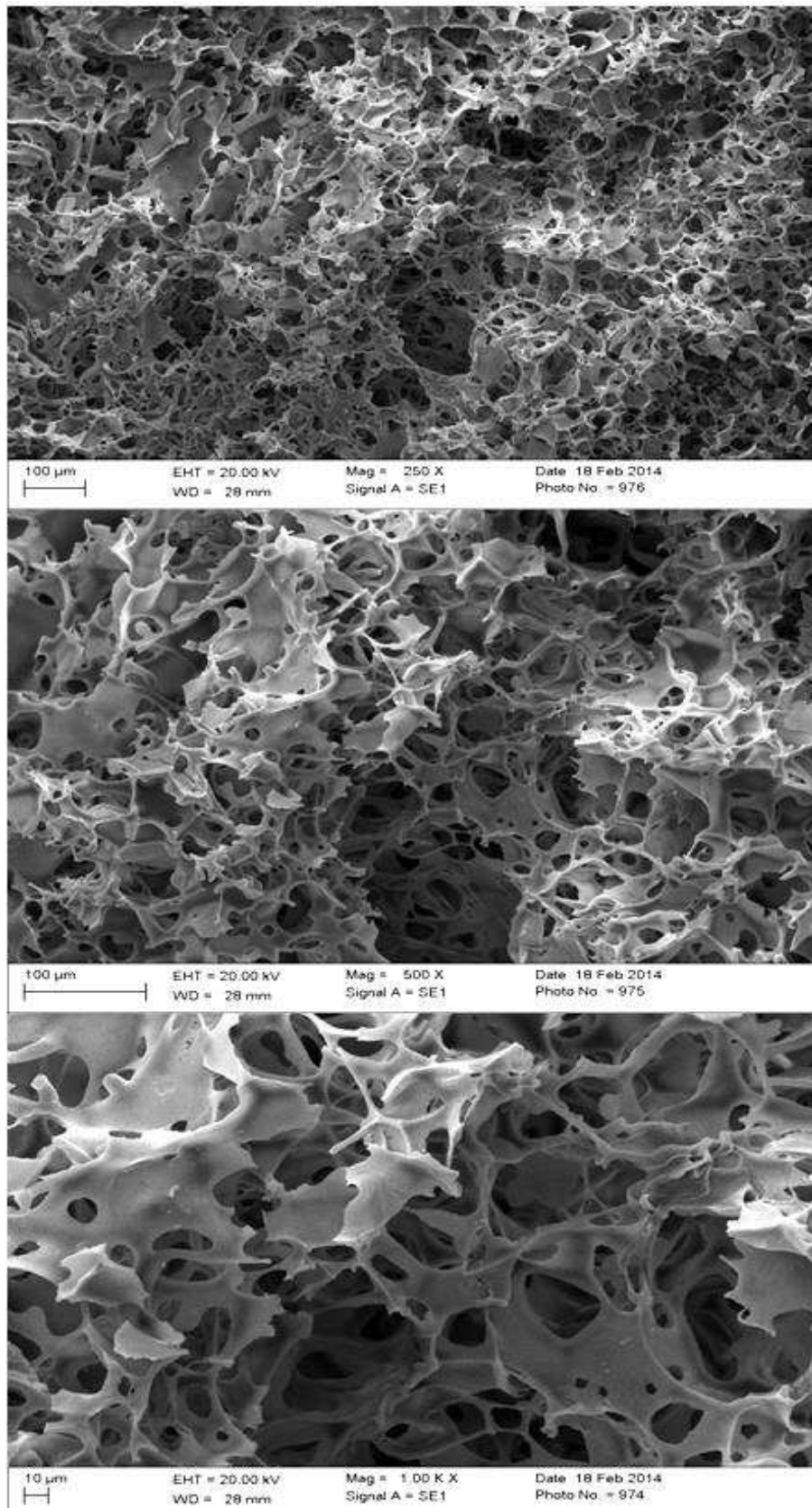


Figura 12 - Imagens da estrutura do criogel ativado com glutaraldeído e imobilizado com β -galactosidase obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV).

A avaliação hidrodinâmica dos criogéis foi realizada para cada pH de imobilização utilizado. Os resultados obtidos para porosidade (φ) estão representados na Figura 13, sendo que o criogel puro corresponde a uma amostra que não sofreu nenhum tipo de ativação e, ou, imobilização.

A amostra de criogel puro apresentou uma maior porosidade, em torno de 79%. Por outro lado, as amostras ativadas e imobilizadas apresentaram porosidades variando de 49% até 64%. Para estes dados foi realizada uma análise de variância (Tabela 11), indicando que as porosidades dos criogéis imobilizados não diferem entre si. A queda da porosidade nos criogéis ativados, comparadas com a do criogel puro, provavelmente se deve ao alto potencial de polimerização do agente ativador glutaraldeído, que foi igualmente recirculado em todos os experimentos. Assim mesmo, a porosidade dos criogéis ativados apresentou-se relativamente alta.

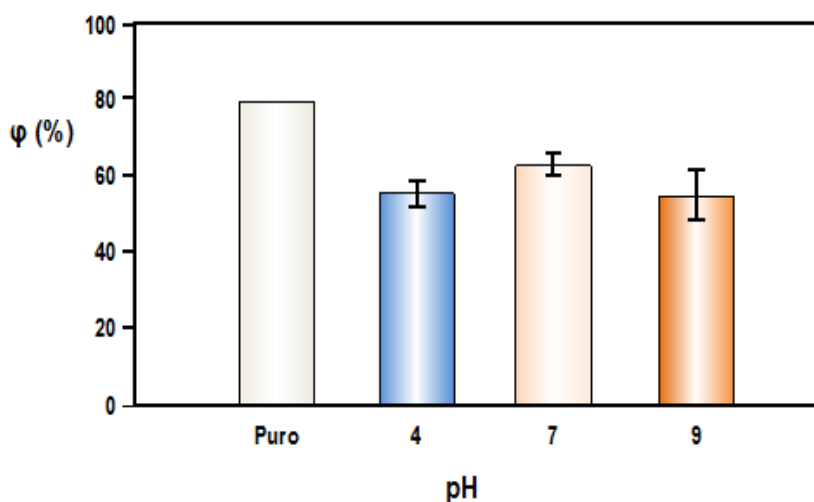


Figura 13 - Porosidade do criogel puro e contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.

Tabela 11 – Resumo de ANOVA da porosidade para as diferentes condições de pH de imobilização.

FV	GL	QM	Pr>F
pH	2	19,67	0,548
Resíduo	5	28,99	
Total	7		

A fração total de água (φ_w), indica o quanto do criogel é constituído por água e os resultados estão demonstrados na Figura 14. Esta característica apresentou o mesmo comportamento da porosidade, como se era esperado. Os experimentos que sofreram ativação e imobilização apresentaram uma redução na fração total de água, que variou de 63% até 75%, enquanto que o criogel puro, mais poroso, é constituído por uma fração de 95% de água.

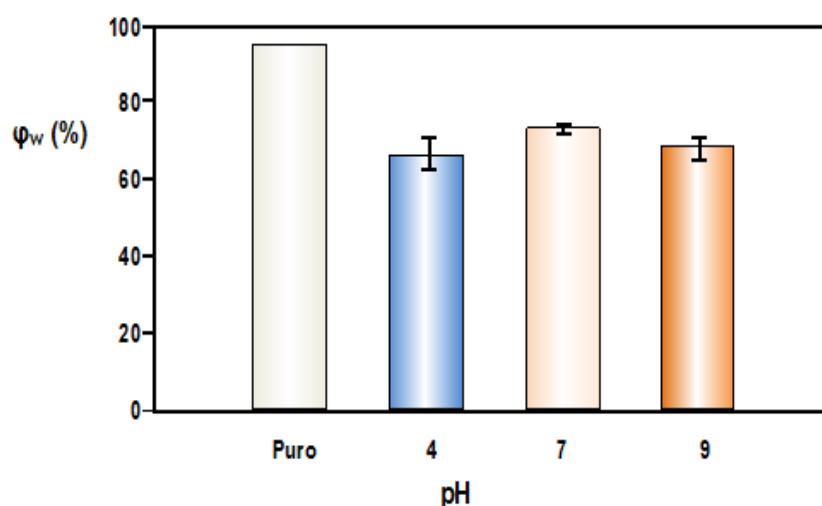


Figura 14 – Fração total de água no criogel puro contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.

Pode-se dizer, então, que a ativação e posterior imobilização do criogel influenciam diretamente na porosidade e na fração total de água do suporte. Mas o mesmo não se pode afirmar sobre a capacidade de inchamento (S). Os resultados desta última característica estão demonstrados na Figura 15.

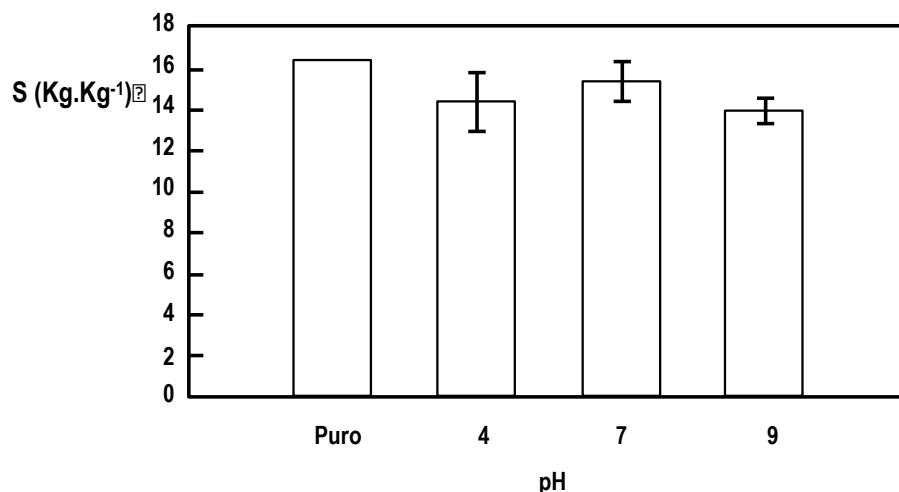


Figura 15 – Capacidade de inchamento do criogel puro e contendo enzima imobilizada em diferentes condições de pH.

A capacidade de inchamento do criogel puro é de 16,4 kg.kg⁻¹ e a dos criogéis ativados varia de 12,7 a 16,0 kg.kg⁻¹, indicando uma ligeira manutenção desta característica apesar da diminuição da porosidade e da fração total de água. A capacidade de inchamento do suporte está relacionada com a quantidade de água ligada aos pequenos poros da matriz polimérica. Portanto, se pode dizer que a ativação com posterior imobilização enzimática do suporte, pouco influenciou na quantidade de água ligada aos pequenos poros.

Em trabalhos como os de Yao (2006a) e Erzenigin (2011) foram avaliados criogéis embebidos em nanopartículas e Cu²⁺, respectivamente. Yao encontrou porosidade de 70,2% e Erzeniginde 67,8%. Estes resultados são superiores ao encontrado, mas evidenciam uma tendência da diminuição dos poros com a adição de agente ativadores aos criogéis. Discutir mais!

A distribuição do tempo de residência (DTRs) nos criogéis estudados foi medida em velocidades superficiais de líquido de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 cm.min⁻¹. A Figura 16, exibem as DTRs em algumas velocidades superficiais de líquido para os criogéis imobilizados em pH 4,0; 7,0 e 9,0, respectivamente. As curvas são similares indicando um comportamento semelhante para as diferentes condições de pH de imobilização enzimática. Pode-se observar que com a diminuição da

velocidade de escoamento do líquido, as curvas apresentam-se mais espalhadas. Isto indica que o aumento da velocidade do líquido, aumenta a dispersão convectiva no interior dos poros no leito do criogel, induzindo o aumento da dispersão axial.

A partir dos dados obtidos para DTRs foram calculados os valores de dispersão axial (D_{ax}) a partir da equação 8. Os coeficientes de dispersão axial nas presentes condições encontraram-se na faixa de grandeza de 10^{-8} a $10^{-5} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, uma faixa mais ampla de variação daquela obtida por YAO (2006a), que foi de 10^{-7} a $10^{-6} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Quanto menor o coeficiente de dispersão axial da solução dentro da coluna, maior o grau de resolução da mesma, resultando em uma maior separação de biomoléculas. Os resultados encontrados indicam que os criogéis sintetizados satisfazem esta condição.

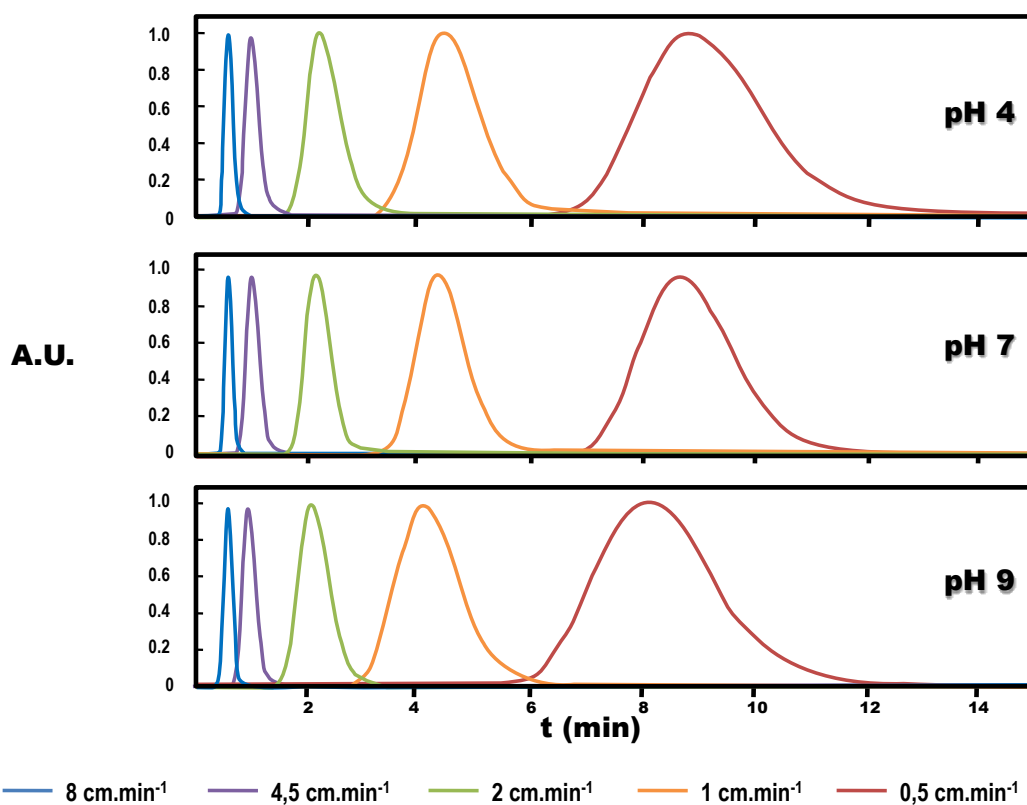


Figura 16 - Curvas da distribuição do tempo de residência para imobilização enzimática em pH 4,0, 7,0 E 9,0.

Para testar a igualdade das curvas de D_{ax} pela velocidade ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$), representadas na Figura 17, foi realizada uma análise de covariância pelo teste de igualdade de parâmetros de regressão. Não houve diferença significativa

entre as diferentes condições de pH de imobilização, logo, elas podem ser representadas pela curva em azul no gráfico da Figura 17. Neste gráfico também pode-se observar que com o aumento da velocidade do líquido dispersivo, maior é o seu D_{ax} .

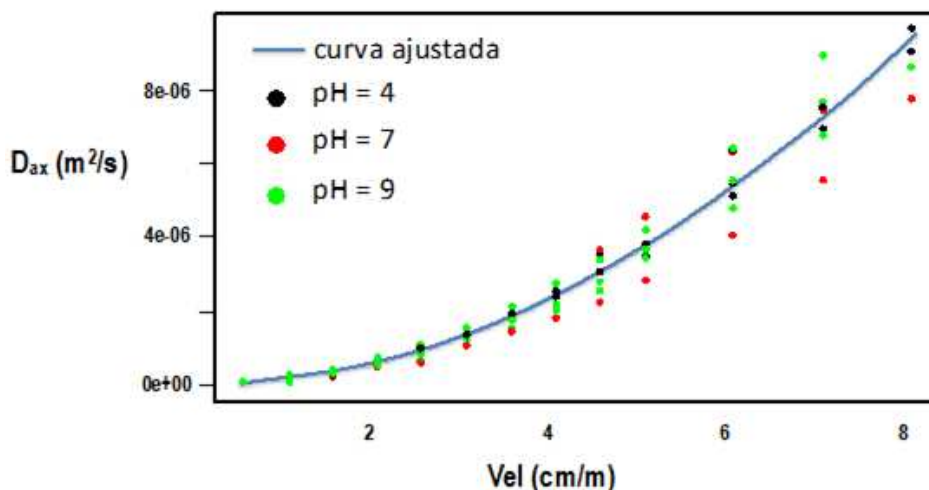


Figura 17 - Curvas de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de fluxo na coluna de criogel. Pontos em negro representam imobilização pH = 4, pontos vermelho representam pH = 7 e pontos em verde pH = 9. A curva ajustada é apresentada em azul.

4.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM CRIOGEL ATIVADO COM B-GALACTOSIDASE

A avaliação da hidrólise da lactose em criogel ativado com β -galactosidase foi realizada por meio das medidas de atividade específica (A_e) em cada condição experimental. A tabela 12 apresenta o quadro resumido da ANOVA realizada para atividade específica da enzima imobilizada. O pH de imobilização não afetou significativamente ($p > 0,1$) a atividade específica do criogel.

Tabela 12 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH de imobilização na atividade específica do criogel.

FV	GL	QM	Pr > F
pH	2	$1,52 \cdot 10^{-2}$	0,792
Resíduo	5	$6,19 \cdot 10^{-2}$	
Total	7		

A Figura 18 apresenta o resultado da atividade específica da enzima imobilizada em cada pH estudado, em que é possível observar que aparentemente para a condição de maior pH, a atividade específica seria maior, mas devido ao elevado coeficiente de variação dos experimentos, eles são significativamente iguais, segundo os resultados da ANOVA.

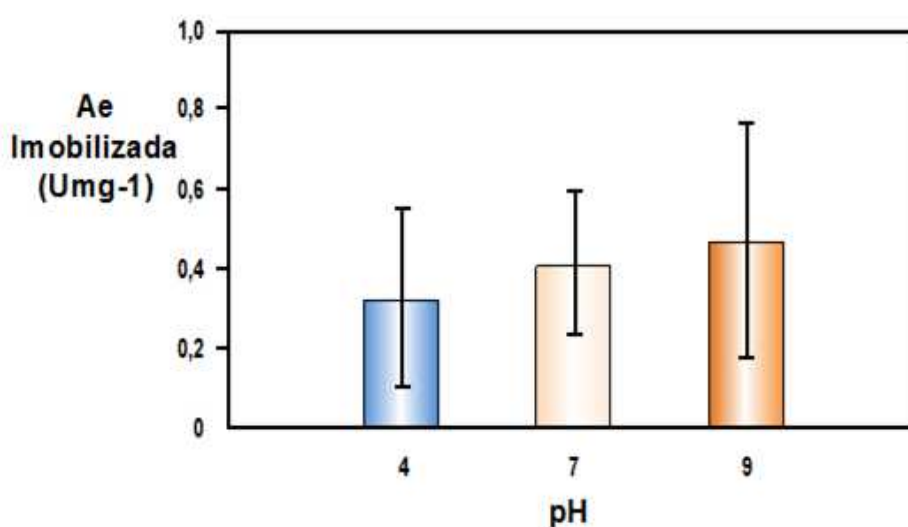


Figura 18 – Atividade específica imobilizada para cada condição de pH analisada.

É importante salientar que atividades específicas levam em consideração a massa de proteína utilizada na reação. Logo, apesar da enzima estar mais ativa na condição de imobilização em pH 9,0, o teor de proteína imobilizada influenciou para que não houvesse diferença significativa entre os tratamentos para atividade específica imobilizada, como será evidenciado no item 4.5.

4.5 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO E ATIVIDADE RECUPERADA

O rendimento da imobilização refletiu o quanto de enzima se ligou ao suporte em comparação com o quanto de enzima recirculou pelo mesmo. A atividade recuperada comparou a atividade específica da enzima se ligada ao suporte com a atividade da enzima livre, levando em consideração a massa do biorreator sintetizado. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância, que estão representadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Resumo da ANOVA para determinação da influência do pH de imobilização no rendimento da imobilização e na atividade recuperada do biorreator.

FV	Rendimento (n%)			Atividade recuperada (Ar%)		
	GL	QM	Pr>F	GL	QM	Pr>F
pH	2	157,09	0,058	2	4,35	0,435
Resíduo	5	29,79		5	4,41	
Total	7			7		

Observa-se que para a análise do rendimento de imobilização houve uma diferença significativa a nível de 10% de probabilidade ($p < 0,1$) entre as diferentes condições de pH. O mesmo não ocorreu para a atividade recuperada. Estes resultados estão ilustrados na Figura 19.

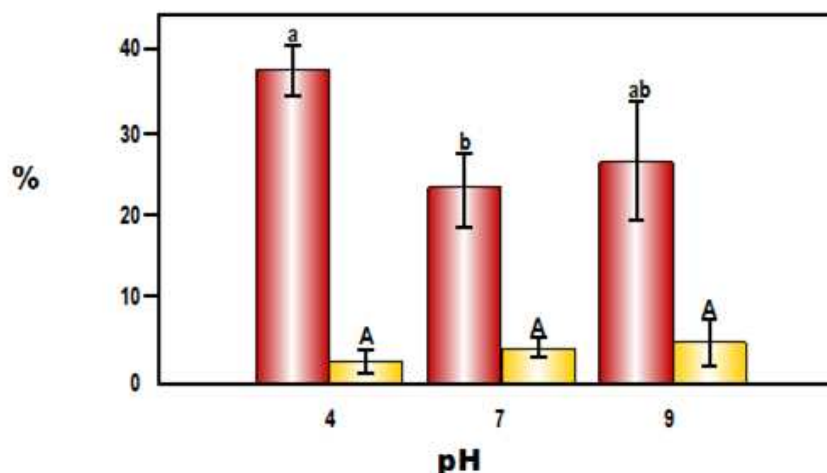


Figura 19 – Rendimento da imobilização (■) e atividade recuperada (■) para cada condição de pH de imobilização.

Nota-se que na condição de pH 4,0 houve um rendimento de imobilização (37,726% ± 2,993) superior ao encontrado no pH 7,0 (23,036% ± 4,637), podendo indicar que o primeiro pH apresenta condições favoráveis para imobilização de proteína. Em contrapartida, não houve diferença significativa para atividade recuperada entre as amostras, indicando que apesar do pH 4,0 ter melhor imobilização proteica, a enzima imobilizada apresenta baixo poder de hidrólise. A atividade recuperada variou de 2,2% ± 1,4 para o pH 4,0 até 4,5% ± 2,8 no pH 9,0. Esse ocorrido pode ser justificado pela baixa estabilidade da enzima β-galactosidase em pH superior a 7,0, que quando em solução o sítio ativo encontra-se protegido e não disponível para reação. Portanto, após a imobilização, este apresenta-se livre e disponível para hidrólise.

Um comportamento semelhante a este foi encontrado por Guleç (2013), que trabalhou com imobilização de β-galactosidase de *K. lactis* via por ligação covalente com glutaraldeído em membranas bioativas com adição de polietilenoimina. Neste trabalho observou-se que com o aumento da concentração de proteína ligada, não houve aumento da atividade relativa.

CONCLUSÃO

Os biorreatores sintetizados apresentaram características morfológicas e hidrodinâmicas compatíveis com os encontrados na literatura. Os poros variaram de 10 a 100 μm de tamanho, com elevada porosidade e baixo coeficiente de dispersão axial, resultando em colunas com elevado potencial para separação de biomoléculas.

O fator pH de imobilização não influenciou na quantidade de proteína total imobilizada no criogel supermacroporoso, mas influenciou diretamente no rendimento da imobilização. Concluiu-se que em pH 4,0 houve um maior rendimento do que quando a imobilização ocorreu em pH 7,0. Apesar do rendimento de imobilização ter sido superior em pH 4,0, a atividade recuperada não sofreu influência do fator pH de imobilização.

A baixa pureza do extrato enzimático foi evidenciada pela análise de atividade livre e eletroforese em gel. Este pode ter sido um fator importante e limitante nos resultados de imobilização e atividade encontrados. Portanto, sugere-se a realização de estudos que envolvam enzimas mais puras nestas condições.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- ALTUNBAS, C., UYGUN, M., UYGUN, D. A., AKGOL, S. e DENIZLI, A. Immobilization of inulinae on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 170, p. 1909-19021, Junho 2013.
- ARRUA, R. D., STRUMIA, M. C. e ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 2429-2466, 2009. ISSN 1996-1944.
- ARVIDSSON, P., PLIEVA, F. M., LOZINSKY, V. I., GALAEV, I. Y. e MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n.2, p. 275-290, 2003.
- ARVIDSSON, P., PLIEVA, F. M., SAVINA, I. N., LOZINSKY, V. I., FEXBY, S., BÜLOW, L., YU. GALAEV, I. e MATTIASSON, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002. ISSN 0021-9673.
- BAYRAMOGLU, G., TUNALI, Y. e ARICA, M. Y. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catalysis Communications**, v. 8, n. 7, p. 1094-1101, 2007. ISSN 1566-7367.
- BERRUX, L. G., FREITAG, R. e TENNIKOVA, T. B. Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 95-104, 2000.
- BRASIL, A. Cerca de 40% da população brasileira têm intolerância à lactose. 2013.
- CALLERI, E., MARRUBINI, G., MASSOLINI, G., LUBDA, D., DE FRAZIO, S. S., FURLANETTO, S., WAINER, I. W., MANZO, L. e CACCIALANZA, G. Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized β -glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 5, p. 1179-1189, 2004.
- CHEN, F., YAO, K., SHEN, S. e YUN, J. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008. ISSN 0009-2509.
- CHEN, S. X., WEI, D. Z. e HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 16, p. 109-114, 2001. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 16, p. 109-114, 2001.
- CLARK, D. S. e BLANCH, H. W. **Biochemical Engineering, Second Edition**. Taylor & Francis, 1997. ISBN 9780824700997.
- CZERMAK, P., EBRAHIMI, M., GRAU, K., NETZ, S., SAWATZKI, G. e PFROMM, P. H. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. **Journal of Membrane Science**, v. 232, n. 1-2, p. 85-91, 2004. ISSN 0376-7388.

ERZENGIN, M., ÜNLÜ, N. e ODABAŞI, M. A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 484-490, 2011. ISSN 0021-9673.

EUROMONITOR. Food Intolerance. 2014.

FENNEMA, S. D. K. L. P. O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2009. ISBN 9788536323343.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite**. 2011. (Mestrado). Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa.

FREITAS, F. F. **Otimização do Processo de Imobilização de B-galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído**. 2007. (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GALAEV, I. Y., DAINIAK, M. B., PLIEVA, F. e MATTIASSON, B. Effect of Matrix Elasticity on Affinity Binding and Release of Bioparticles. Elution of Bound Cells by Temperature-Induced Shrinkage of the Smart Macroporous Hydrogel†. **Langmuir**, v. 23, n. 1, p. 35-40, 2007/01/01 2006. ISSN 0743-7463.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007. ISSN 0021-9673.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, 2006. ISBN 9781597450539.

GÜLEÇ, H. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 83-90, 2013. ISSN 0927-7765.

GUPALOVA, T. V., LOJKINA, O. V., PÁLÁGNUK, V. G., TOTOLIAN, A. A. e TENNIKOVA, T. B. Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 949, n.1-2, p. 185-193, 2002.

GÜRDAŞ, S., GÜLEÇ, H. e MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 904-911, 2012/04/01 2012. ISSN 1935-5130.

GUSTAVSSON, P.-E. e LARSSON, P.-O. Continuous superporous agarose beds for chromatography and electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 832, n. 1-2, p. 29-39, 1999.

HATZINIKOLAOU, D. G., KATSIFAS, E., MAMMA, D., KARAGOUNI, A. D., CHRISTAKOPOULOS, P. e KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 2, p. 161-172, 2005. ISSN 1369-703X.

JIANG, T., MALLIK, R. e HAGE, D. S. Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2362-2372, 2005.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R., WINKELHAUSEN, P. F. e FONSECA, L. Galactooligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by β -Galactosidase Immobilized in PVA. **Appl Biochem Biotechnol** 168, p. p. 1197-1211, 2012.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G. e VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces*

- fragilis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002. ISSN 0141-0229.
- KIM, H. S. e HAGE, D. S. Handbook of Affinity Chromatography. In: (Ed.): Boca Raton: CRC Press, 2005.
- KLEIN, M. P., FALLAVENA, L. P., SCHOFFER, J. D. N. e AYUB, M. A. Z. High stability of immobilized B-D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymer**, p. 465-470, March 2013. ISSN 95.
- KUMAR, A., PLIEVA, F. M., GALAEV, I. Y. e MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1-2, p. 185-194, 2003. ISSN 0022-1759.
- LOZINSKY, V., PLIEVA, F., GALAEV, I. e MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001. ISSN 0923-179X.
- LUO, Q., ZOU, H., ZHANG, Q., XIAO, X. e NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.
- MALLIK, R. e HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.
- MALLIK, R., JIANG, T. e HAGE, D. S. High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.
- MARIOTTI, M. P., YAMANAKA, H., ARAUJO, A. R. e TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1233-1240, 2008. ISSN 1516-8913.
- MARTINS, A. R. e BURKERT, C. A. V. Revisão: Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.
- MATTAR, R. e MAZO, D. F. D. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 230-236, 2010. ISSN 0104-4230.
- MENDES, A. A., GIORDANO, R. C., GIORDANO, R. D. L. C. e DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman, 2013. ISBN 9781464109621.
- OBÓN, J. M., CASTELLAR, M. R., IBORRA, J. L. e MANJÓN, A. B-galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modelling study of batch and continuous reactors. **Biochemical Education** v. 28, p. 164-168, 2000.
- OSTRYANINA, N. D., VLASOV, G. P. e TENNIKOVA, T. B. Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 949, n. 1-2, p. 163-171, 2002.
- PANESAR, P. S., KUMARI, S. e PANESAR, R. Review Article: Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, p. 16 p., 2010.
- PEREZ, P., PLIEVA, F., GALLARDO, A., SAN ROMAN, J., AGUILAR, M. R., MORFIN, I., EHRBURGER-DOLLE, F., BLEY, F., MIKHALOVSKY, S., GALAEV, I. Y. e

- MATTIASSON, B. Bioresorbable and Nonresorbable Macroporous Thermosensitive Hydrogels Prepared by Cryopolymerization. Role of the Cross-Linking Agent. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 66-74, 2008/01/01 2007. ISSN 1525-7797.
- PETRO, M., SVEC, F. e FRÉCHET, J. M. J. Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 355-363, 1996.
- PETROV, P., PETROVA, E. e TSVETANOV, C. B. UV-assisted synthesis of supermacroporous polymer hydrogels. **Polymer**, v. 50, n. 5, p. 1118-1123, 2009. ISSN 0032-3861.
- PLIEVA, F. M., ANDERSSON, J., GALAEV, I. Y. e MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004. ISSN 1615-9314.
- PLIEVA, F. M., GALAEV, I. Y. e MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007. ISSN 1615-9314.
- PLIEVA, F. M., GALAEV, I. Y., NOPPE, W. e MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008a. ISSN 0966-842X.
- PLIEVA, F. M., GALAEV, I. Y., NOPPE, W. e MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008b.
- SAVINA, I. N., GALAEV, I. Y. e MATTIASSON, B. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate. **Journal of Chromatography A**, p. 199-205, 2005.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J. e HAAS, M. J. C. L. F. B. A. S. O. C., PHYSICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES. **JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC**, V. 9, N. 4-6, P. 113-148. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- XUAN, H. e HAGE, D. S. Immobilization of α 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug-protein binding. **Analytical Biochemistry**, v. 346, n. 2, p. 300-310, 2005.
- YANG, S. T. e SILVA, E. M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995. ISSN 0022-0302.
- YAO, K., SHEN, S., YUN, J., WANG, L., HE, X. e YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006a. ISSN 0009-2509.
- YAO, K., YUN, J., SHEN, S. e CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1-2, p. 246-251, 2007. ISSN 0021-9673.
- YAO, K., YUN, J., SHEN, S., WANG, L., HE, X. e YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103-110, 2006b. ISSN 0021-9673.

ZHOU, Q. Z. K. e CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2001a. ISSN 1369-703X.

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