



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

GUILHERMINA SCHULTZ

**ANÁLISE E MODELAGEM DA SÍNTESE ENZIMÁTICA
DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

São Carlos - SP

2016

GUILHERMINA SCHULTZ

**ANÁLISE E MODELAGEM DA SÍNTESE ENZIMÁTICA
DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

São Carlos - SP

2016

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GUILHERMINA SCHULTZ APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Roberto de Campos Giordano
Orientador, UFSCar



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro
Coorientador, UFSCar



Juliano Lemos Bicas
UNICAMP



Ruy de Sousa Junior
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria em todos os momentos.

Aos meus familiares, em especial meus pais Romilda e Reinaldo, minha irmã Raqueana, meus irmãos Wesley e Artur e meus sobrinhos Anna Mel e Bruno Otávio, mesmo distante vocês tornam meus dias mais felizes e alegres.

À Eduarda por não apenas dividir o apartamento comigo, mas por ser uma boa amiga.

Ao Prof. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos que possibilitaram o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao professor Roberto pela confiança e oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À Letícia aluna de iniciação científica pela ajuda com os experimentos de estabilidade enzimática.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química, por todos os ensinamentos, amizade e paciência.

À EDETEC pela doação da enzima β -galactosidase.

À Tangará Alimentos pelo permeado do soro de leite.

Ao CNPq, à Capes e à FAPESP pelo apoio financeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Galacto-oligossacarídeos são oligossacarídeos não digeríveis com reconhecida capacidade prebiótica. Podem ser sintetizados enzimaticamente a partir de substratos ricos em lactose utilizando a enzima β -galactosidase por meio de uma reação controlada cineticamente, no qual são intermediários (síntese) na reação de hidrólise. O predomínio de síntese sobre a hidrólise depende essencialmente da concentração de lactose e origem da β -galactosidase, mas também depende de outros fatores como temperatura, pH, força iônica e atividade da água. Além de lactose pura, podem ser utilizados outros substratos com alta concentração de lactose, como soro de leite e permeado do soro de leite. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi estudar a produção enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir de lactose e do permeado do soro de leite, utilizando a enzima β -galactosidase livre oriunda da *Kluyveromyces lactis* com o intuito de construir modelos matemáticos que possibilitem a utilização de ferramentas computacionais para a otimização do processo. Utilizou-se um delineamento composto central rotacional para verificar a influência de pH, temperatura e força iônica nas velocidades iniciais de síntese e hidrólise, seletividade e atividade total da enzima. Foram empregados como substrato 220 g/L de lactose (pura, ou presente em permeado do soro de leite), e as reações foram conduzidas em tampão fosfato de potássio (diversas concentrações), na presença de cofatores (10 mM NaCl e 1,5 mM MgCl₂). Os resultados obtidos evidenciam que, dentro da região estudada, as velocidades de síntese e de hidrólise, utilizando lactose ou permeado, ambas aumentam com elevação de temperatura e diminuição de pH. Já a seletividade é maximizada com o aumento do pH. Também foi feita análise de estabilidade da β -galactosidase de *K. lactis*. Estes ensaios foram realizados na presença de cofatores, incubando a enzima em tampão fosfato de potássio. Variou-se a temperatura de 35 a 45 °C (pH 7 e 50 mM), pH de 6 a 8 (35 °C e 50 mM) e força iônica de 25 a 200 mM (35 °C e pH 7) e amostras foram coletadas no decorrer do tempo. Dos modelos testados, o que se ajusta melhor aos dados experimentais é o modelo com intermediário inativo reversível. Contudo, esse modelo não é capaz de prever comportamentos como dos ensaios de força iônica de 25, 100 e 200 mM. Os ajustes dos modelos cinéticos para a síntese de GOS foram feitos por regressão não linear, e utilizaram-se dados experimentais de diferentes ensaios de síntese de GOS, empregando como substrato lactose pura e permeado do soro de leite. Nos resultados

obtidos, um modelo simples (que não leva em consideração a formação de galactobiose) não se ajustou aos dados experimentais. Modelo recente proposto na literatura que leva em consideração essa formação se ajusta aos dados, mas tem um problema de inconsistência fenomenológica. O modelo proposto neste trabalho se ajustou aos dados experimentais e não apresenta inconsistências no balanço de resíduos de glicose por galactose. Além disso, o modelo possibilita a estimação da fração de GOS formados somente por galactose, o que permite discriminar os dissacarídeos em galactobiose (que têm propriedades prebióticas) e lactose.

Palavras-chave: Galacto-oligossacarídeos, β -galactosidase, Lactose.

ABSTRACT

Galactooligosaccharides are indigestible oligosaccharides with recognized prebiotic capacity. They can be synthesized enzymatically from lactose-rich substrates using the β -galactosidase enzyme by means of a kinetically controlled reaction in which they are intermediates (synthesis) in the hydrolysis reaction. The predominance of synthesis on the hydrolysis depends mainly on the concentration of lactose and origin of β -galactosidase, but it also depends on other factors, such as temperature, pH, ionic strength and water activity. Apart from pure lactose, other substrates with high concentration of lactose may be used, such as whey and whey permeate. The objective of this research was to study the enzymatic production of galactooligosaccharides (GOS) from lactose and whey permeate using free β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* to reach mathematical models that enable the use computational tools for process optimization. A rotational central composite design to verify the influence of pH, temperature and ionic strength in the initial rates of hydrolysis and synthesis, selectivity and total enzyme activity was used. Lactose (pure or present in whey permeate) were used as substrate (220 g/L) and the reactions were conducted in a potassium phosphate buffer (various concentrations) in the presence of cofactors (10 mM NaCl, and 1.5 mM MgCl₂). The results showed that, within the studied region, both rates, of synthesis and hydrolysis using lactose or permeate, increase with temperature increase and pH decreases. Selectivity is maximized by increasing pH. Stability analysis of β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* was also addressed. These tests were performed in presence of cofactor, incubating the enzyme in potassium phosphate buffer. The temperature was varied from 35 to 45 ° C (pH 7 and 50 mM), pH 6 to 8 (35 ° C and 50 mM) and ionic strength 25 to 200 mM (35 ° C and pH 7) and samples were collected over time. Among tested models, what best fits the experimental data is the reversible inactive intermediate model. However, this model could not predict behaviors such as those obtained when using 25, 100 and 200 mM. Fitting of kinetic models for GOS synthesis were made by nonlinear regression. Experimental data of different GOS synthesis assays employing lactose and whey permeate as substrates was used. The results showed that a simple model (which does not take into account the formation of galactobiose) does not fit the experimental data. Recent model proposed in the literature

that takes into account such training, fits the data, but it has a problem of phenomenological inconsistency. The model proposed in this work fit the experimental data and does not show inconsistencies in the balance of glucose residues per galactose. Moreover, the model allows the estimation of GOS fraction formed only by galactose, which allows to discriminate disaccharides into galactobiose (having prebiotic properties) and lactose.

Keywords: Galacto-oligosaccharides, β -galactosidase, Lactose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Exemplo de variação das estruturas químicas de GOS. (A) Composição, (B) regioquímica e (C) grau de polimerização.	24
Figura 2.2 - Esquema reacional simplificado da hidrólise da lactose e da transgalactosilação a partir da β -galactosidase. E- enzima; Lac- lactose; Gal- galactose; Gli- glicose; AA- açúcar acceptor de galactosil.	27
Figura 2.3 - Mecanismo de reação da β -galactosidase em galactosídeos.	30
Figura 2.4 - Mecanismo de inibição reversível competitiva.	34
Figura 2.5 - Mecanismo de inibição reversível mista.	34
Figura 2.6 - Mecanismo de inibição reversível incompetitiva.	35
Figura 2.7 - Mecanismo cinético considerando apenas a síntese de trissacarídeos (GOS-3).	40
Figura 2.8 - Mecanismo cinético considerando síntese de dissacarídeos (Di), trissacarídeos (Tri), tetrassacarídeos (Tet) e pentassacarídeos (Pen).	40
Figura 3.1 - Cromatograma de síntese de GOS para concentração de lactose de 400 g/L, utilizando HPLC com detector de índice de refração e coluna SUPELCOGEL Ca ⁺² (30 cm x 7,8 mm). Tempo de retenção: GOS-4 - 9,7 min, GOS-3 - 10,3 min, lactose - 11,5 min, GOS-2 - 11,6 min, glicose - 13,3 min e galactose - 14,5 min.	52
Figura 4.1 - Estabilidade da β -galactosidase em função do tempo (h), para as temperaturas de 35, 40 e 45 °C com e sem cofatores, incubando a enzima em tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM.	55
Figura 4.2 - Estabilidade da β -galactosidase em tampão fosfato de potássio versus tempo (h). (A) Variação de temperatura, (B) variação de pH e (C) variação de força iônica.	56

- Figura 4.3 - Ajuste do modelo de primeira ordem. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo..... 57
- Figura 4.4 - Ajuste do modelo de Sadana e Henley. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo..... 57
- Figura 4.5 - Ajuste do modelo com intermediário inativo reversível. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo. 58
- Figura 4.6 - Síntese de GOS utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL. (A) Concentração inicial de lactose de 400 g/L (1,2 M), (B) concentração inicial de lactose de 220 g/L (0,64 M) e (C) concentração inicial de lactose de 220 g/L (0,64 M), utilizado como substrato permeado do soro de leite. 59
- Figura 4.7 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com lactose (400 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL. 60
- Figura 4.8 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com lactose (220 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL. 61
- Figura 4.9 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com permeado do soro (220 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL. 61
- Figura 4.10 - Resíduos de (Gli/Gal)* versus conversão de lactose. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), a 40°C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi de 5,8 U/mL. (●) Concentração inicial de lactose de 400 g/L, (■) concentração inicial de lactose de 220 g/L e (▲) concentração inicial de lactose de 220 g/L, utilizado como substrato permeado do soro de leite. 63

Figura 4.11 - Mecanismo cinético considerando síntese de GOS formado por galactose ligada a glicose e galactose ligadas a outras galactose..... 64

Figura 4.12 - Ajuste do modelo de Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) e Boon, Janssen e Van't Riet (2000). (A) Concentração inicial de lactose de 400 g/L, (B) concentração inicial de lactose de 220 g/L, (C) concentração inicial de lactose de 220g/L, foi utilizado como substrato permeado do soro de leite. Fonte: Elaborado pela autora. 67

Figura 4.13 - Concentração (mol/L) versus tempo (min) utilizando como substrato lactose pura. (A $[Lac]_0 = 400$ g/L e B $[Lac]_0 = 220$ g/L) considerando $k_E = 0$, ajustando os outros parâmetro, (C $[Lac]_0 = 400$ g/L e D $[Lac]_0 = 220$ g/L) fazendo $k_E = 0$, $k_{cat} = k_H$ e $k_{cat'} = k_T$, (E $[Lac]_0 = 400$ g/L e F $[Lac]_0 = 220$ g/L) considerando a inativação enzimática ($k_E = 1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), (G $[Lac]_0 = 400$ g/L e H $[Lac]_0 = 220$ g/L) considerando $k_E = 1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $k_{cat} = k_H$ e $k_{cat'} = k_T$, (I $[Lac]_0 = 400$ g/L e J $[Lac]_0 = 220$ g/L) ajustando todos os parâmetros, inclusive k_E , (K $[Lac]_0 = 400$ g/L e L $[Lac]_0 = 220$ g/L) fazendo $k_{cat} = k_H$, $k_{cat'} = k_T$ e ajustando os outros parâmetros. Di = Lac + GOS-2 (preto), GOS-3 = tri + trig (magenta) e GOS-4 = tet + tetg (verde), Gli (azul) e Gal (vermelho). 69

Figura 4.14 - Concentração (mol/L) versus tempo (min) utilizando como substrato permeado do soro de leite. Utilizaram-se os parâmetros de lactose (Figura 4.13C e D), porém ajustou-se apenas k_E 73

Figura 4.15 - Separação dos galacto-oligosacarídeos. (A) Utilizando lactose como substrato, $[Lac]_0=400$ g/L, ajuste considerando $k_E=1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e ajustando os outros parâmetros. (B) Utilizou-se permeado como substrato, $[Lac]_0=220$ g/L e foi ajustado apenas o k_E 73

Figura 4.16 - Resíduos de (Gli/Gal)* versus tempo (min), utilizando $[Lac]_0=400$ g/L. (■) resíduo determinado experimentalmente e (–) resíduo obtido através do modelo proposto, considerando $k_E=1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e ajustando os outros parâmetros..... 74

Figura 4.17 - Velocidade de síntese de GOS em função da temperatura (°C) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato. 78

Figura 4.18 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da temperatura (°C) e pH.....	78
Figura 4.19 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da força iônica (I) (mM) e pH.....	78
Figura 4.20 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da temperatura (°C) e força iônica (I) (mM).	79
Figura 4.21 - Seletividade em função da temperatura (°C) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.....	79
Figura 4.22 - Atividade total em função da temperatura (°C) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.....	79
Figura 4.23 - Atividade total em função da força iônica (I) (mM) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.	80
Figura 4.24 - Atividade total em função da temperatura (°C) e força iônica (I) (mM), utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.	80
Figura 4.25 - Velocidade de síntese de GOS, utilizando permeado (220 g/L lactose) em função da temperatura (°C) e pH.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção do volume de soro de leite, considerando o rendimento de queijo, tendo em vista o tipo de leite processado.	19
Tabela 2.2 - Estrutura de diferentes oligossacarídeos formados pela ação da β -galactosidase.....	23
Tabela 2.3 - Propriedades das β -galactosidasas oriundas de alguns microorganismos...29	
Tabela 2.4 - Modelos cinéticos enzimáticos.....	35
Tabela 2.5 - Algumas equações cinéticas empregadas na inativação enzimática.	38
Tabela 3.1 - Níveis utilizados para três fatores.	48
Tabela 3.2 - Valores codificados e reais.....	49
Tabela 4.1- Parâmetros ajustado do modelo proposto, utilizando lactose pura como substrato.....	71
Tabela 4.2 - Parâmetro ajustado do modelo proposto, utilizando permeado como substrato.....	73
Tabela 4.3 - Valores dos parâmetros com erro padrão (E_p), intervalo de confiança de 95% ($\pm t_{95\%}$), coeficientes de determinação (R^2) e as respostas para cada ensaio (síntese, hidrólise, seletividade e atividade total) com valores máximo (y_{\max}) e mínimo (y_{\min}), desvio padrão do modelo (S_{modelo}) e réplicas ($S_{\text{réplicas}}$), utilizando lactose como substrato.	75
Tabela 4.4 - Valores dos parâmetros com erro padrão (E_p), intervalo de confiança de 95% ($\pm t_{95\%}$), coeficientes de determinação (R^2) e as respostas para cada ensaio (síntese, hidrólise, seletividade e atividade total) com valores máximo (y_{\max}) e mínimo (y_{\min}), desvio padrão do modelo (S_{modelo}) e réplicas ($S_{\text{réplicas}}$), utilizando permeado como substrato.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivo	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Soro de leite	18
2.1.1 Permeado do soro de leite.....	20
2.1.1.1 Lactose	20
2.2 Oligossacarídeos	21
2.2.1 Oligossacarídeos não digeríveis	21
2.2.1.1 Galacto-oligossacarídeos (GOS)	23
2.2.1.2 Produção enzimática de galacto-oligossacarídeos.....	26
2.3 Enzimas	27
2.3.1 β -Galactosidase.....	28
2.4 Reatores enzimáticos	31
2.5 Cinética enzimática.....	32
2.5.1 Inibição enzimática.....	33
2.5.2 Estabilidade da enzima	36
2.5.2.1 Modelos cinéticos de inativação térmica.....	37
2.5.2.2 Modelos cinéticos para a síntese de GOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Materiais.....	42
3.1.1 Enzima.....	42
3.1.2 Substratos	42
3.2 Métodos	42
3.2.1 Caracterização do permeado do soro de leite	42
3.2.1.1 Determinação do teor de proteínas	43
3.2.1.2 Determinação do teor de lactose.....	44
3.2.1.3 Determinação de sais minerais e umidade.....	44
3.2.2 Caracterização da enzima	45
3.2.2.1 Determinação de proteínas	45
3.2.2.2 Ensaio de atividade enzimática da β -galactosidase	46
3.2.2.3 Estudo da temperatura, pH e força iônica na estabilidade enzimática.....	47

3.2.2.3.1 Efeito da temperatura.....	47
3.2.2.3.2 Efeito do pH	47
3.2.2.3.3 Efeito da força iônica (I).....	47
3.2.3 Experimentos para síntese de GOS	48
3.2.3.1 Delineamento composto central rotacional para a síntese de GOS.....	48
3.2.3.2 Planejamento experimental de velocidades iniciais	50
3.2.3.3 Cinética de síntese de GOS	51
3.2.3.4 Análises.....	51
3.2.4 Ajuste de modelos cinéticos	52
3.2.5 Cálculo do rendimento total de GOS.....	53
3.2.6 Modelos cinéticos de inativação enzimática	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Caracterização do permeado do soro	54
4.2 Caracterização da enzima.....	54
4.3 Ensaio de estabilidade.....	54
4.4 Modelos de estabilidade da β-galactosidase	56
4.5 Ensaio de síntese de GOS a partir de lactose e permeado do soro de leite.....	58
4.5.1 Rendimento de GOS.....	60
4.5.2 Balanço dos resíduos de glicose e galactose durante a síntese.....	62
4.6 Mecanismo cinético para a síntese de GOS.....	63
4.6.1 Ajuste de modelos para síntese de GOS	66
4.7 Respostas do delineamento composto central rotacional.....	74
5 CONCLUSÕES.....	81
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2015) no ano de 2013, a produção mundial de leite foi estimada em 636 milhões de toneladas, dos quais o Brasil alcançou a quarta maior produção, com a marca de 34 milhões de toneladas. Esse leite produzido é processado nos laticínios dando origem a uma variedade de produtos tanto para consumo como para aplicação na produção de rações e produtos alimentares e farmacêuticos (HILLIAM, 1990; MANUCCI, 2009). Dentre os produtos processados pode-se destacar: manteiga, creme de leite, caseína e queijos.

A produção nacional de queijo em 2013, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2015), foi de 1032 mil toneladas. Ou seja, aproximadamente 30% do leite produzido é utilizado na fabricação de queijo, o que gera cerca de 9 milhões de toneladas de soro. O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijo ou caseína industrial, representando cerca de 90% do volume do leite utilizado na fabricação de queijo. Ele retém cerca de 55% de todos os nutrientes presentes no leite, incluindo proteínas solúveis, lactose, vitaminas e minerais e outros nutrientes. O soro de leite já foi considerado um resíduo indesejado durante a fabricação do queijo, pois o único destino que era dado a ele, era alimentação de suínos em sua forma in natura. Contudo, devido seu alto volume produzido, alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e seu alto valor nutritivo, sua reutilização se faz necessária. Isso vem sendo feito em parte na indústria de laticínios de diversas formas, como por exemplo: em formulações de bebidas lácteas fermentadas, bolos, produção de lactose refinada e concentrado proteico. A obtenção do concentrado proteico é realizada por processo de ultrafiltração, pelo qual é gerado como subproduto o permeado do soro de leite (ANTUNES, 2003; GONZÁLEZ-SISO, 1996).

O permeado do soro de leite é composto principalmente de lactose, de modo que se torna possível utilizá-lo para a produção de compostos de alto valor agregado, como os galacto-oligossacarídeos (GOS). Assim, síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir da enzima β -galactosidase pode ser uma alternativa ao descarte do soro de queijo (ou seu permeado), por alguns produtores de produtos lácteos, principalmente quando associada à produção de concentrado proteico de soro.

A produção enzimática de GOS é conhecida como uma reação de transgalactosilação, na qual é utilizada lactose como substrato e a enzima β -galactosidase como catalisador. Os galactooligossacarídeos são oligossacarídeos não digeríveis (NDO) com capacidades prebióticas reconhecidas, promovendo o crescimento de bactérias probióticas no intestino, gerando benefícios para a saúde humana (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; BOUHNİK *et al.*, 2004). Os NDO podem estimular e aumentar a absorção de minerais como o cálcio e magnésio, ajudar na síntese de vitaminas do complexo B, reduzir os níveis de colesterol no sangue, proporcionar atividade anticárie, aliviar os sintomas de diabetes e intolerância à lactose, prevenir o cancro do cólon e outros (MITSUOKA, 1992; MUSSATO; MANCILHA, 2007). Devido a estas características, os GOS tornam-se atraentes para o mercado de alimentos e valorizados comercialmente.

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção enzimática de galactooligossacarídeos (GOS) a partir de lactose e do permeado do soro de leite utilizando enzima β -galactosidase livre proveniente da *Kluyveromyces lactis* com o intuito de construir modelos matemáticos que possibilitem a utilização de ferramentas computacionais para a otimização do processo. Para atender o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar o permeado do soro seco e a enzima β -galactosidase.
- Avaliar inativação enzimática em função da temperatura, pH e força iônica.
- Avaliar influência das variáveis de processo, como: pH, temperatura, força iônica, concentração enzimática e concentração de lactose no processo de síntese enzimática de GOS.
- A partir de ensaios experimentais, propor e ajustar modelos cinéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soro de leite

Soro de leite é um subproduto obtido através da produção do queijo ou caseína industrial (DAUFIN *et al.*, 1998). Este é um líquido residual amarelo-esverdeado obtido após o procedimento de precipitação e coagulação da caseína do leite (GONZÁLEZ-SISO, 1996). A cor amarela do soro de leite é causada pela presença de riboflavina (vitamina B2) (DE WIT, 2001).

Para a coagulação da caseína são utilizados enzimas ou ácidos, dando origem a dois tipos de soro de leite: o soro ácido ($\text{pH} < 5$) e o soro doce ($\text{pH} = 6-7$). O soro ácido é obtido após a fermentação ou adição de ácidos orgânicos ou minerais, e contém elevada quantidade de cálcio. O soro doce é obtido pela adição de enzimas proteolíticas como a quimosina (coalho), contém pequena quantidade de cálcio e seu teor de proteína é maior do que o soro ácido. Dessa forma, a utilização do soro ácido na alimentação é mais limitada, por causa de seu gosto ácido e alto conteúdo salino (GONZÁLEZ-SISO, 1996; WONG; LACROIX; MCDONOUGH, 1978; YANG, 2007).

Tradicionalmente, o soro de leite era considerado um resíduo que precisa ser tratado na fabricação de queijo, devido ao grande volume produzido e ao problema ambiental que causa, com elevada carga orgânica, resultando numa alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (ABREU, 1999). Atualmente, por causa de regulamentações mais rigorosas de eliminação de resíduo, e por apresentar lactose e proteína, este subproduto tem sido utilizado em formulações de bebidas lácteas fermentadas, bolos, sorvetes (SILVA, 1997), queijos, iogurtes, cremes (SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004), como fertilizantes e para a alimentação animal (ABREU, 1999). Embora uma parte do soro de leite seja reutilizada por grandes indústrias, outra parte ainda é descartada por algumas empresas de forma incorreta na natureza, gerando problemas ambientais, pois essas empresas não conseguem reutilizar o soro no seu processo.

Soro de leite é produzido mundialmente com uma quantidade estimada entre 150 e 200 milhões de toneladas por ano e crescimento em torno de 2% por ano (SMITHERS,

2008), e representa cerca de 85-95% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (Tabela 2.1). O soro retém 55% de todos os nutrientes encontrados no leite, incluindo proteínas solúveis, lactose, vitaminas e minerais, entre outros (GONZÁLEZ-SISO, 1996).

Tabela 2.1 - Produção do volume de soro de leite, considerando o rendimento de queijo, tendo em vista o tipo de leite processado.

Tipo de leite Processado	Densidade média do leite (g cm ⁻³)	Rendimento (Kg queijo/ 100 Kg leite)	Volume soro de leite produzido (L L ⁻¹)	Referências
		9,86	0,873	Fox <i>et al.</i> (2000)
Vaca	1,032	-	0,85-0,90	Mizubuti (1994) e Serpa, Priamo e Reginatto (2009)
		14,78	0,822	Fox <i>et al.</i> (2000)
Ovelha	1,036	-	0,85-0,90	Mizubuti (1994) e Serpa, Priamo e Reginatto (2009)
		9,84	0,872	Fox <i>et al.</i> (2000)
Cabra	1,034	-	0,85-0,90	Mizubuti (1994) e Serpa, Priamo e Reginatto (2009)

Fonte: Reproduzido de CARVALHO, PRAZERES, RIVAS (2013).

A composição do soro de leite fresco liberada do coágulo durante a fabricação de queijo possui cerca de 94,25% de água e 5,75% de sólidos, dos quais incluem 4,30% de lactose, 0,8% de proteínas do soro, 0,55% de minerais e 0,10% de gordura. Ou seja, do teor de sólidos, aproximadamente 13% são proteínas contendo em média 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactoalbumina e 25% de outras frações, que incluem teores menores de imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, albumina do soro bovino (BSA), lisozima e vários peptídeos (OLIVEIRA, 2009; ILLANES, 2011; OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). Estas proteínas possuem elevado valor nutritivo e demonstram excelentes propriedades fisiológicas funcionais (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS *et al.*, 1993).

O soro de leite apresenta ótimo valor nutricional, dessa forma sua presença em alguns alimentos vem sendo incentivada. Atualmente, ele está presente em uma variedade de produtos alimentícios (recheios, coberturas, bombons e chocolates). A grande vantagem de sua utilização é a flexibilidade que ele oferece em relação a seus componentes (lactose, concentração de proteínas, minerais e gorduras), podendo sofrer alterações de acordo com a necessidade do produto ao qual ele será adicionado (DALLAS, 1999).

As proteínas presentes no soro de leite são geralmente separadas por processo de ultrafiltração, pela qual ocorre a separação física das proteínas e gordura da lactose e minerais, originando o Concentrado Proteico do Soro (CPS, também conhecido pela sigla em inglês WPC), que é utilizado como aditivo alimentar ou suplemento de proteína. Assim, o

retentado torna-se rico em proteínas enquanto que o permeado do soro de leite permanece com a lactose (composto principal), minerais e pequenas quantidades de lipídeos e proteínas (ANTUNES, 2003).

2.1.1 Permeado do soro de leite

O permeado do soro de soro de queijo (conhecido pela sigla em inglês WP) é um subproduto obtido quando o soro de queijo é passado por uma membrana de ultrafiltração para concentrar as proteínas do soro. As proteínas do soro permanecem retidas pela membrana, enquanto que, compostos com baixo peso molecular tais como lactose, minerais e pequenas quantidades de lipídeos e proteínas atravessam a membrana originando o permeado do soro (DALLAS *et al.*, 2014). O permeado é um ingrediente versátil na formulação de vários alimentos por conferir sabor agradável, reduzir a adição de sal ao produto, substituir carboidratos e enriquecimento dos produtos com seus minerais.

O permeado pode ser seco e utilizado principalmente na produção de soro em pó para produção de lactose refinada e alimentação suína (NESSMITH *et al.*, 1997; GOLOWCZYC *et al.*, 2013). Devido à elevada concentração de lactose, o permeado do soro também pode ser utilizado para produzir diversos produtos de valor agregado, tais como GOS (VERA *et al.*, 2012, 2014), o ácido láctico, o álcool etílico, ou mesmo como um meio de cultura para bactérias probióticas (CUI *et al.*, 2012).

2.1.1.1 Lactose

A lactose é o principal açúcar do leite e outros produtos lácteos, sendo produzida comercialmente a partir de soro ou, mais recentemente, a partir de permeado do soro (ILLANES, 2011).

A lactose é um dissacarídeo composto por dois monossacarídeos - glicose e galactose - unidos por ligação glicosídica β -(1 \rightarrow 4). É considerado um açúcar com baixa doçura quando comparado com sacarose ou glicose (LADERO; SANTOS; GARCIA-

OCHOA, 2000), podendo ser utilizada em confeitarias, suplemento de formulações infantis, padaria e produtos de carne. O aumento da temperatura é uma variável importante para o aumento da solubilidade da lactose, pois ela apresenta baixa solubilidade em temperatura ambiente (220 g/L em 25 °C (WHITE, 2000)), tornando sua aplicação em produtos alimentícios limitada. Além disso, também existem pessoas com intolerância a este dissacarídeo (FOX, 2009). Ela tem tendência a adsorver odores e sabores e é higroscópica, causando o endurecimento dos derivados lácteos em pó. A transgalactosilação da lactose permite agregar bastante valor ao permeado do soro ou soro de queijo, uma vez que esse material iria gerar custos nas Estações de Tratamento de Efluentes.

2.2 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são considerados carboidratos solúveis, constituídos por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas com diferentes graus de polimerização, contendo entre dois a dez monossacarídeos. Eles são encontrados como componentes naturais de muitos alimentos, incluindo vegetais, frutas, mel e leite (MEHRA; KELLY, 2006). Algumas pesquisas têm surgido sobre a produção e aplicação de oligossacarídeos devido suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. São utilizados na indústria de alimentos (formulação de leite em pó infantil, bebidas, adoçantes), aplicação medicinal (produtos para diabéticos e farmacêuticos, cosméticos) e ração animal com inibidor de salmonella (LISBOA, 2008). Porém, o grande interesse visa à produção de oligossacarídeos não digeríveis devido às suas propriedades funcionais (bioativos e prebióticos).

2.2.1 Oligossacarídeos não digeríveis

Oligossacarídeos não digeríveis (NDO, Non Digestible Oligosaccharides) são considerados compostos bioativos e prebióticos. Bioativos por apresentarem interação benéfica com células, tecidos ou com todo o organismo. Prebióticos por serem compostos não-cariogênicos, não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano e de baixa caloria que

atuam como fibra alimentar e estimulam o desenvolvimento de microflora intestinal benéfica, as chamadas bactérias probióticas (lactobacilos e bifidobactérias) (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; BOUHNİK *et al.* 2004).

Alguns oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano, pois este não possui as enzimas necessárias para romper as ligações do tipo β existentes nesses casos. Outros são parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal e podem resultar na formação de carboidratos essenciais para a saúde, servindo de substratos e reguladores para a maioria das rotas metabólicas (MACFARLANE, G.; STEED; MACFARLANE, S., 2008).

O aumento na população de probióticos no intestino e seus produtos da fermentação (ácidos graxos de cadeia curta, como lactato, butirato, propionato e acetato) (ALANDER *et al.*, 2001; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; CRITTENDEN; PLAYNE, 1996) promovem diversos efeitos fisiológicos, tais como: síntese de nutrientes (vitaminas do complexo B); equilíbrio da microflora intestinal com a diminuição de patógenos e micro-organismos putrefativos, como resultado de competição microbiana e da redução do pH no cólon; aumento de absorção de minerais (Mg, Fe, Ca); aumento dos movimentos peristálticos e diminuição da constipação; estimulação do sistema imunológico, protegendo contra infecções e redução do risco de câncer, especialmente intestinal, devido a inibição do crescimento de organismos exógenos (MITSUOKA, 1992; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

Os NDO podem ser sintetizados enzimaticamente via biotecnológica ou por via química (BARTOLOZZI; SEEBERGER, 2001). Alguns dos NDO que satisfazem os critérios para serem considerados prebióticos são os fruto-oligossacarídeos (FOS), lactulose e os galacto-oligossacarídeos (GOS) (GIBSON *et al.*, 2004) e são amplamente utilizados como substitutos de açúcares e gorduras ou simplesmente com a função de fibras dietéticas ou agentes de corpo de baixa caloria compatíveis para indivíduos diabéticos (DELZENNE; ROBERFROID, 1994; MUSSATO; MANCILHA, 2007; RENUKA; PRAKASH; PRAPULLA, 2010).

2.2.1.1 Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Os galacto-oligossacarídeos são oligossacarídeos não digeríveis (NDO) com capacidade prebiótica reconhecida, permitindo alterações específicas, tanto na composição como na atividade da microbiota no trato gastrointestinal, o que confere benefícios de saúde e bem-estar ao hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004; ROBERFROID, 2007). Conforme pode ser observado na Tabela 2.2, os GOS são compostos por uma mistura de di-, tri-, e oligossacarídeos maiores, formados por estruturas de D-glicose- $[\beta$ -D-galactose]_n ou D-galactose- $[\beta$ -D-galactose]_n (SANZ, M; SANZ, J; MARTÍNEZ-CASTRO, 2002), no qual seu grau de polimerização (n) geralmente varia de 1-5 unidades monoméricas e estes são unidas por diferentes ligações glicosídicas (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; TZORTZIS; VULEVIC, 2009). Os GOS podem ser encontrados na forma líquida ou em pó, sendo uma mistura de diferentes espécies de oligossacarídeos (mais de 55 %), lactose (~20%), glicose (~20%) e poucas quantidades de galactose (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Tabela 2.2 - Estrutura de diferentes oligossacarídeos formados pela ação da β -galactosidase.

	Estrutura*	Ligações glicosídicas	Nomenclatura
Dissacarídeos	D-Gal-D-Gli	β -(1→6) β -(1→3) ou β -(1→2)	Alolactose
	D-Gal-D-Gal	β -(1→6) β -(1→3)	Galactobiose
Trissacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1→6)/ β -(1→6) β -(1→6)/ β -(1→4) β -(1→4)/ β -(1→4)	6' dilactosil-glicose 6' galactosil-lactose 4' galactosil-lactose
	D-Gal-D-Gal-D-Gal	β -(1→3)/ β -(1→4) β -(1→6)/ β -(1→6)	3' galactosil-lactose 6' galactotriose
Tetrassacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1→6)/ β -(1→6)/ β -(1→4) β -(1→6)/ β -(1→3)/ β -(1→4) ou β -(1→3)/ β -(1→6)/ β -(1→4)	6' digalactosil-lactose
Pentassacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1→6)/ β -(1→6)/ β -(1→6)/ β -(1→4)	6' trigalactosil-lactose

*D-Gal = resíduo de D-galactose; D-Gli = resíduo de D-glicose.

Fonte: adaptado de MAHONEY (1998); MANUCCI (2009).

Na Figura 2.1 pode-se verificar que as estruturas químicas de GOS podem se diferenciar em relação às seguintes características: composição dos sacarídeos, regioquímica das ligações glicosídicas e grau de polimerização (GP). Estas propriedades dependem das condições reacionais do processo e do mecanismo do biocatalisador utilizado (GOSLING *et al.*, 2010). A Figura 2.1A exemplifica os GOS formados de galactose com terminação de

glicose ou galactose ligada a outra galactose, na Figura 2.1B foram consideradas as diferentes ligações glicosídicas numa mesma estrutura e, Figura 2.1C considera os diferentes tamanhos das estruturas de GOS.

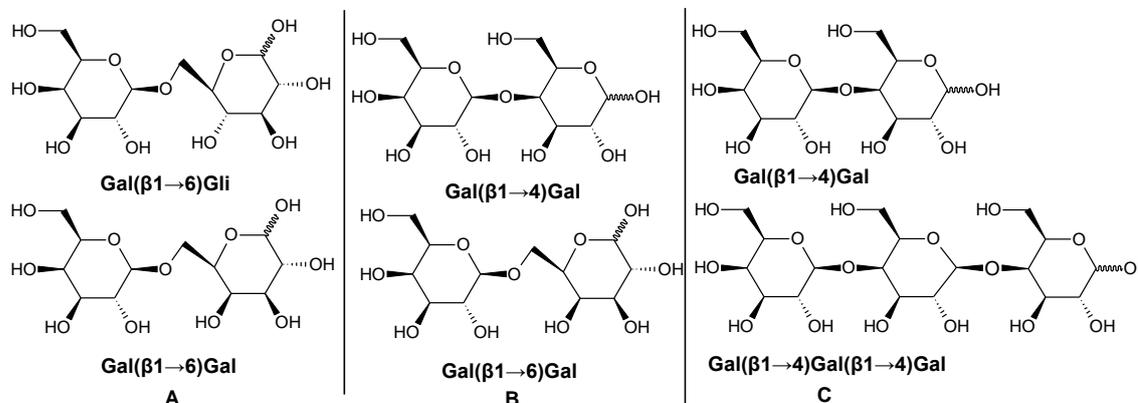


Figura 2.1 - Exemplo de variação das estruturas químicas de GOS. (A) Composição, (B) regioquímica e (C) grau de polimerização.

Fonte: Adaptado de GOSLING *et al.* (2010).

Dissacarídeos transgalactosilados formados por galactose e glicose (alolactose) ou duas unidades de galactose (galactobiose) com ligações β-glicosídicas diferentes da lactose podem ser constatados (PARK; OH, 2010; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

É importante lembrar que todos os tipos de GOS, incluindo os dissacarídeos transgalactosilados, são NDO e demonstram propriedades fisiológicas similares (CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011).

Os GOS não são digeridos pelas enzimas do intestino delgado, mas são fermentados por bactérias (bifidobactérias) no intestino grosso, tornando-os NDO ou fibras dietéticas solúveis. Dessa forma, os GOS são considerados prebióticos relacionados a muitos benefícios para saúde, tais como: efeito anticancerígeno devido a um aumento da imunidade celular; redução de metabólitos tóxicos e com isto uma desintoxicação do fígado; síntese de vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido nicotínico e ácido fólico produzido por linhagens de bifidobactéria; prevenção de diarreias patogênicas, devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bifidobactérias; melhora na absorção de minerais, como magnésio e cálcio e, por isso, reduz os riscos de osteoporose; alivia os sintomas de diabetes e intolerância à lactose; auxilia em processos de constipação, por estímulo dos movimentos peristálticos do intestino; reduz os níveis de colesterol sanguíneo, pela assimilação de colesterol por algumas linhagens de *Lactobacillus acidophilus*; melhora os níveis de glicose e triglicerídeos no

sangue e possibilidade de utilização como adoçantes naturais não-cariogênicos e de baixa caloria (TOMOMATSU, 1994; BROUNS; VERMEER, 2000).

Além disso, os GOS apresentam *status* GRAS (Generally Recognized as safe), uma vez que são componentes do leite humano e do iogurte tradicional, sendo produzidos por bactérias intestinais a partir da ingestão da lactose. É considerado não tóxico e normalmente são encontrados na soja. O único efeito adverso apresentado é a diarreia, quando consumido em excesso (OTIENO, 2010; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014).

Devido a esses efeitos benéficos para a saúde, os GOS são muito atrativos para a indústria alimentícia e com alto valor comercial. Eles são adequados para formulações infantis e idosas e também são utilizados em produtos tratados termicamente, por serem compostos estáveis (MANUCCI, 2009), permitindo a adição destes em produtos alimentares, como bebidas, pães, geleias e produtos lácteos fermentados (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Nos últimos anos, o consumo e interesse nos oligossacarídeos têm aumentado de forma gradativa, particularmente no Japão e Europa. Em 1991, os GOS foram licenciados como aditivo de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999). São produzidos em escala comercial por várias empresas, dentre as quais se destacam: Morinaga, Snow Brand, Friesland, Yakult, Nissin e Foods Domo. Mundialmente, o mercado para GOS atinge cerca de 20000 toneladas, ou aproximadamente US\$ 120 milhões, aumentando cerca de 10 a 20% anualmente (3A BUSINESS CONSULTING, 2007). No Japão, há uma maior demanda por alimentos funcionais, sendo que o GOS consumido foi de 3500 toneladas a um preço estimado de US\$ 6,0/kg (NAKAKUKI, 2002).

GOS podem ser sintetizados de diferentes maneiras, tais como síntese química, fermentação ou enzimática. A síntese química de oligossacarídeos é complexa, uma vez que as unidades de monossacarídeos contêm vários grupos hidroxila de reatividade semelhante, permitindo a formação da ligação indiscriminada e, como consequência, a síntese de compostos altamente ramificados (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006). A fermentação apresenta como desvantagem a necessidade de manter o processo em condições estéreis para que não haja contaminação no sistema e o produto de interesse seja efetivamente acumulado (GOSLING *et al.*, 2010; LEE; KIM; OH, 2004). Por outro lado, a síntese

enzimática de oligossacarídeos é regio e estereoespecífica, sendo estas as principais vantagens deste método (BUCKE, 1996; CROUT; VIC, 1998).

2.2.1.2 Produção enzimática de galacto-oligossacarídeos

Os GOS podem ser sintetizados enzimaticamente a partir de substratos ricos em lactose utilizando a enzima β -galactosidase (β -D-galactosideo-galactohidrolase, E.C.3.2.1.23) (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996), por meio de uma reação controlada cineticamente caracterizada pela competição entre as reações de síntese e hidrólise. O predomínio de síntese sobre a hidrólise depende essencialmente da concentração inicial de lactose (HUBER; KURZ; WALLENFELS, 1976; GOSLING *et al.*, 2011; URRUTIA *et al.*, 2013) e origem da β -galactosidase (BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000; GUERRERO *et al.*, 2011).

A principal forma industrial de síntese de GOS pode ser representada pelo mecanismo bioquímico da Figura 2.2. A variação da concentração de lactose no meio reacional e o tipo de β -galactosidase utilizado produzem diferentes tamanhos da cadeia dos GOS. Dessa forma, a formação dos distintos tipos de GOS obedece a seguinte ordem: di->tri->tetra-> sacarídeos maiores e, as ligações formadas são predominantemente β -(1 \rightarrow 6) > β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 2). Para aditivos alimentares comerciais, oligossacarídeos de cadeia curta são preferíveis aos de cadeia longa, pois são metabolizados mais facilmente pelas bifidobactérias, sendo rapidamente transformados em ácidos graxos de cadeia curta (MANUCCI, 2009).

Podem ser utilizadas diferentes enzimas para produção de GOS, sendo que as glicosil hidrolases são as mais utilizadas, uma vez que estas enzimas encontram-se mais disponíveis e com preço acessível, apesar de apresentarem menor estereoseletividade que as glicosil transferases (TORRES *et al.*, 2010).

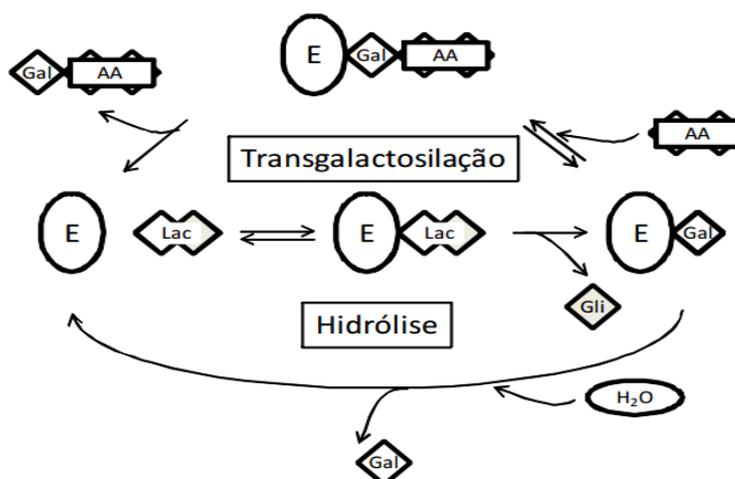


Figura 2.2 - Esquema reacional simplificado da hidrólise da lactose e da transgalactosilação a partir da β -galactosidase. E- enzima; Lac- lactose; Gal- galactose; Gli- glicose; AA- açúcar aceptor de galactosil.

Fonte: Adaptado de MANUCCI (2009).

2.3 Enzimas

Enzimas são biocatalisadores de natureza proteica ou glicoproteica, de natureza intracelular ou extracelular, que aumentam a velocidade de uma reação bioquímica por meio da redução da energia de ativação, sem afetar o equilíbrio da reação (CHIBATA, 1978; FABER, 2004; LEHNINGER, 1986). Dependendo do processo, as enzimas são preferíveis a catalisadores químicos, pois apresentam as seguintes características: são mais seletivas, resultando em um rendimento maior e um produto mais “limpo” (menos subproduto), e a catálise é realizada em condições brandas de pressão e temperaturas amenas (MOFFAT *et al.*, 1994; VIEIRA, 2009).

Dependendo do tipo de catalisadores químicos utilizados, ocorre limitação na aquisição de produtos e intermediários de interesse comercial, pois possuem baixa especificidade, geralmente fornecendo produtos contaminados, requerendo etapa posterior de purificação, composição química mista, altas temperaturas e pouca versatilidade.

As enzimas possuem uma variedade de aplicações, dentre elas: indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas e são em grande parte produzidas por microrganismos (KRAJEWSKA, 2004). A utilização de enzimas é interessante, pois possibilita que pequenas quantidades sejam suficientes para catalisar reações específicas.

2.3.1 β -Galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -D-galactosideo-galactohidrolase, E.C.3.2.1.23) é uma lactase, sendo classificada como glicosil hidrolase, presente em vegetais (pêssegos, damascos, amêndoas, maçãs etc.), em órgãos de animais (intestino, cérebro, placenta, testículo) e, também, podendo ser produzida por uma variedade de microrganismos (SHUKLA, 1975) como fungos: *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenecis* (FAI *et al.*, 2014; SANTOS; SIMIQUELI; PASTORE, 2009); bactérias: *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus sp*, *Streptococcus lactis* (GOSLING *et al.*, 2009); e leveduras: *Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis e fragilis* e *Candida pseudotropicalis* (FAI *et al.*, 2015; PETROVA; KUJUMDZIEVA, 2010). As β -galactosidasas produzidas a partir de leveduras são mais utilizadas para aplicação em processos industriais. Na Tabela 2.3 são apresentadas suas propriedades catalíticas que são distintas, devido suas diversas fontes de obtenção.

As lactases obtidas de *A. oryzae* e *Saccharomyces sp (lactis ou fragilis)*, *A. niger* e *A. oryzae* são reconhecidas como seguras, em razão de seu histórico e suas aplicações. Porém, não se aconselha a utilização, por exemplo, da β -galactosidase obtida de *Escherichia coli* em produtos alimentares, uma vez que apresenta problemas de toxicidade (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH; CLARK, 1997).

A β -galactosidase catalisa a reação de hidrólise da ligação $\beta(1\rightarrow4)$ da lactose, originando seus monômeros, β -D-galactose e D-glicose. Esta reação de hidrólise é de grande importância comercial, uma vez que possibilita a produção de produtos lácteos de baixo teor de lactose, visto que mundialmente cerca de 75% da população apresenta intolerância a este dissacarídeo (NIH, 2016). Além disso, permite a reutilização do soro, sendo possível sua utilização em aditivo para a alimentação humana ou de animais (DWEVEDI; KAYASTHA, 2009; GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; LADERO *et al.*, 2006; MARÍN-NAVARRO *et al.*, 2014).

Tabela 2.3 - Propriedades das β -galactosidases oriundas de alguns microorganismos.

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Temperatura Ótima (°C)	Cofatores necessários	Peso Molecular (kDa)	Referência
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	7-7,5	35	Mg ⁺² , Mn ⁺² , Na ⁺	135	Cavaille e Combes (1995)
<i>Kluyveromyces Fragilis</i>	6,6	6,5-7,5	37	Mg ⁺² , Mn ⁺² , K ⁺	200	Jurado <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	2,5-8,0	55-60	Nenhum	124	Aehle (2004)
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	3,5-8,0	50-55	Nenhum	90	Aehle (2004)
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6,0 - 8,0	40	K ⁺ , Na ⁺	540	Aehle (2004)

As enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são menos estáveis que as fúngicas, e assim necessitam ser utilizadas apenas em temperaturas moderadas. Elas são ativas em pH neutro e são apropriadas para hidrolisar a lactose do leite ou do soro doce. Essas enzimas de leveduras dependem de cofatores que normalmente são metais como Mg⁺², Mn⁺², K⁺. As enzimas que necessitam de metais formam um complexo enzimático, através de uma associação reversível. Esse complexo enzima-íon metálico é 50% mais ativo do que a enzima sozinha. É descrito que estas enzimas de *Kluyveromyces* são inibidas na presença de produtos da reação (glicose e galactose) (MATEO *et al.*, 2004), e produzem dissacarídeos (Gal-Gal) e trissacarídeos (Gal-Gal-Gli) e apenas uma quantidade limitada de tetrassacarídeos (LADERO *et al.*, 2002; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987b; VIEIRA, 2009).

A β -galactosidase de *Escherichia coli* é encontrada comercialmente na forma bruta e pura, sendo utilizada na hidrólise da lactose ou na produção de oligossacarídeos. Esta enzima é muito conhecida em termos catalíticos e estruturais. Sua utilização na síntese de oligossacarídeos leva à formação principalmente do dissacarídeo galactobiose (PESSALA *et al.*, 2007).

As enzimas de origem fúngicas, como *A. oryzae* e *A. niger*, são eficientes para hidrolisar a lactose em soro ácido, pois são ativas em pH ácido. Estas enzimas não necessitam de cofatores para a estabilidade ou atividade, têm temperatura ótima relativamente alta e são relativamente pequenas quando comparado às enzimas de outras fontes microbianas (leveduras e bactérias). As enzimas de origem fúngicas têm uma grande variação de estabilidade a pH (YANG; OKOS, 1989). É relatado que a β -galactosidase de *A. oryzae*, em condições de síntese, produz principalmente trissacarídeos (LÓPEZ-LEIVA; GUZMAN, 1995; YANAHIRA *et al.*, 1992) e uma pequena quantidade de tetrassacarídeos (IWASAKI; NAKAJIMA; NAKAO, 1996; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987b).

De acordo com a legislação brasileira (Resolução RDC nº 205/2006), a enzima β -galactosidase, utilizada para aplicações alimentícias, deve ser de origem microbiana, derivada dos seguintes microrganismos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2006). Estas espécies são classificadas como GRAS pela Food and Drug Administration (FDA).

Além de catalisar a reação de hidrólise da lactose, a β -galactosidase catalisa a reação de transgalactosilação. Em meios com baixas concentrações de substrato (lactose), apenas a reação de hidrólise é observada. Contudo, em meio com altas concentrações de lactose (com o aumento de aceptores de galactosil e baixa atividade da água) também ocorre a formação de galacto-oligossacarídeos através da reação de transgalactosilação (GOSLING *et al.*, 2010). Na Figura 2.3, é apresentado de forma esquemática o mecanismo bioquímico para a atividade da β -galactosidase para síntese de GOS e hidrólise da lactose. Prenosil, Stuker e Bourne (1987a), demonstraram que muitas β -galactosidases possuem dois resíduos de ácido glutâmico, Glu⁴⁸² e Glu⁵⁵¹, que atuam, respectivamente, como doador de prótons e como nucleófilo.

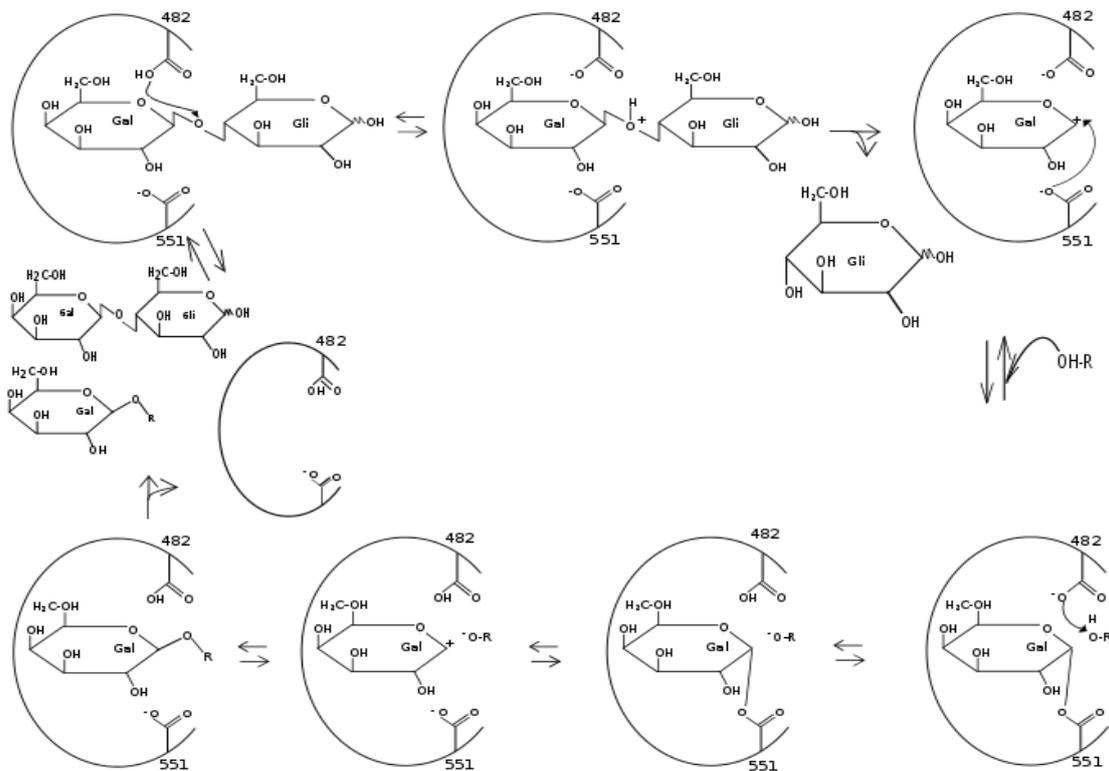


Figura 2.3 - Mecanismo de reação da β -galactosidase em galactosídeos.

Fonte: Adaptado de MANUCCI (2009).

No mecanismo bioquímico apresentado para a β -galactosidase (Figura 2.3), a enzima reage com o substrato, formando o complexo enzima-lactose, em seguida, ocorre a formação do complexo enzima-galactosil e simultaneamente a glicose é liberada; a transferência do complexo enzima-galactosil para um aceptor nucleofílico que pode ser água ($\text{HO-R} = \text{H}_2\text{O}$) ou outros galactosídeos ($\text{HO-R} =$ molécula de açúcar como: lactose, galactose) produzindo respectivamente galactose (reação de hidrólise) e di, tri- ou galactosil-sacarídeos maiores, chamados de GOS (reação de transgalactosilação) e a enzima é liberada (MANUCCI, 2009).

O rendimento de GOS e sua concentração máxima variam de acordo com as condições do meio reacional, como: fonte de enzima, concentração de lactose e enzima no meio, temperatura empregada na reação enzimática, atividade da água e o tempo de reação. É válido ressaltar que a produção de GOS aumenta com o aumento da concentração inicial de lactose e sua produção decresce com o decorrer da reação. Na literatura, apenas alguns trabalhos apresentam síntese de GOS com rendimento superior a 40%, uma vez que a maior parte dos trabalhos apresenta rendimento entre 20 e 25% (MANUCCI, 2009). De acordo com trabalhos analisados, utilizando enzimas de leveduras, fungos e bactérias, o rendimento de GOS foi de 13 a 31%, 17 a 32 % e 5 a 64 %, respectivamente (CHO; SHIN; BUCKE, 2003; CRUZ *et al.*, 1999; GAUR *et al.*, 2006; GOULAS; TZORTZIS; GIBSON, 2007; IWASAKI; NAKAJIMA; NAKAO, 1996; KIM; LEE D; LEE J; 2001; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; ONISHI; TANAKA, 1995, 1998; ONISHI; YOKOZEKI, 1996; SANZ VALERO, 2009).

2.4 Reatores enzimáticos

Reatores enzimáticos são biorreatores operados com biocatalisadores (células inativadas, enzimas, organelas), no qual a reação é catalisada por uma enzima que gera produtos sob condições específicas (ILLANES; ALTAMIRANO, 2008). Os reatores enzimáticos são divididos em dois grupos: descontínuos (batelada) e contínuos (leito fixo e fluidizado) e sua seleção é baseado em características de transferência de massa, custo de fabricação, espaço e reutilização do biocatalisador, quando este está em sua forma imobilizado (XUE; WOODLEY, 2012).

O reator mais comum é o reator em batelada do tipo tanque agitado, e este apresenta algumas vantagens como: melhor eficiência na transferência de massa e calor, por causa da agitação do sistema, configuração simples, facilidade e flexibilidade de operação. Tal reator é compatível tanto para uso com enzimas livres como com enzimas imobilizadas. Porém, esse reator apresenta como desvantagem o fato de que a utilização em pequena escala é dificultada e o biocatalisador, quando imobilizado, é exposto a estresse mecânico, devido à agitação, o que diminui a atividade catalítica (TUFVESSON *et al.*, 2010; XUE; WOODLEY, 2012).

O reator contínuo de leito fixo é largamente empregado para enzimas imobilizadas. Ele apresenta como vantagem, em comparação ao reator em batelada, facilidade de operação e alta produtividade. Porém, apresenta transferência de massa limitada, queda de pressão e formação de caminhos preferenciais (HILLS, 2003; TUFVESSON *et al.*, 2010).

O reator contínuo de leito fluidizado é utilizado quando há substrato ou produtos gasosos e a solução de substrato tem alta viscosidade. Nestes reatores, o meio reacional é mantido fluidizado por alimentação contínua, sendo este utilizado para promover o contato e a transferência de massa no decorrer da reação. O reator contínuo de leito fluidizado, quando comparado ao leito fixo, a formação de caminhos preferenciais é menor, uma vez que o fluxo é menos variável e a queda de pressão é menos evidenciada (GOMEZ *et al.*, 2007).

2.5 Cinética enzimática

A cinética enzimática estuda como a velocidade de uma reação enzimática é alterada conforme se variam as seguintes condições: concentração de substratos e enzima, temperatura, pH, força iônica e presença de quaisquer ativadores e inibidores (DIXON; WEBB, 1979; MOSIER; LADISCH, 2009).

Em 1913, foi proposto pelos bioquímicos Leonor Michaelis e Maud Leonola Menten um mecanismo (Equação 2.1) para explicar a relação entre a velocidade de reação catalisada por enzimas em relação à concentração de substrato (DIXON; WEBB, 1979).



Neste mecanismo, a enzima (E) reage com o substrato (S) reversivelmente, formando o complexo enzima-substrato (ES), posteriormente há a formação do produto (P) e a liberação da enzima. Nesta equação, k_{1a} , k_{-1a} e k_{2a} representam as constantes de velocidades (DIXON; WEBB, 1979; VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1976). A constante (k_{2a}) de dissociação do complexo (ES) é muito menor quando comparado com as constantes k_{1a} e k_{-1a} , uma vez que Michaelis e Menten (1913) consideram que a concentração de enzima é muito menor que a concentração de substrato. Foi considerado também que a concentração total de enzima era igual à soma da concentração do complexo enzima-substrato e da enzima livre.

Briggs e Haldane (1925) utilizaram o mecanismo de Michaelis e Menten e propuseram a hipótese de estado estacionário, em que a velocidade de consumo e produção do complexo (ES) são iguais. Assim, foi possível demonstrar que a velocidade da reação (v) depende da velocidade máxima da reação (V_{max}), da concentração do substrato (S) e da constante de Michaelis-Menten (K_m), como pode ser observado na Equação 2.2.

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

A constante de Michaelis-Menten equivale numericamente à concentração de substrato que define uma velocidade igual à metade da velocidade máxima, quando k_{-1a} for muito maior que k_{2a} . K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato, de forma que quanto maior essa afinidade menor será o valor de K_m . Este parâmetro é independente da concentração total de enzima e V_{max} é dependente dessa condição (FOGLER, 1992).

A Equação 2.2 é muito útil para descrever várias reações enzimáticas, porém ela não representa o processo de forma eficiente em situações que a enzima estiver sofrendo inibição e a concentração de enzima e substrato forem comparáveis. Nesses casos, partindo-se da equação de Michaelis-Menten, são acrescentados termos de correção, levando em consideração múltiplos substratos, ativadores e inibidores (RIBEIRO, 1989).

2.5.1 Inibição enzimática

A inibição enzimática é o impedimento da catálise enzimática, que é evidenciado pela redução da velocidade da reação. O inibidor pode se ligar ao complexo enzima-substrato ou ao sítio catalítico da enzima, sendo que a inibição pode ser irreversível

ou reversível. Na inibição irreversível o inibidor bloqueia o local e inativa a enzima de forma permanente, através de uma ligação covalente ao sítio da enzima. Nessa inibição não ocorre formação de produto, portanto a cinética de Michaelis-Menten não pode ser aplicada (NELSON; COX, 2011). Porém, a inibição reversível reduz temporariamente a atividade da enzima, por meio da ligação não-covalente do inibidor na enzima, mas se o inibidor for removido sua atividade é recuperada. Essa inibição pode acontecer de três maneiras distintas: competitiva, não competitiva e acompetitiva (DIXON; WEBB, 1979; DUTTA, 2008).

Na inibição competitiva o inibidor com estrutura semelhante ao substrato, compete com ele pelo sítio ativo da enzima (Figura 2.4). A combinação de um inibidor (I) competitivo com a enzima (E) pode ser descrita do mesmo modo que a combinação com o substrato, contudo o inibidor não é catalisado (MOSIER; LADISCH, 2009).

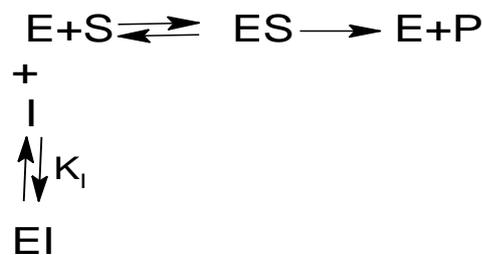


Figura 2.4 - Mecanismo de inibição reversível competitiva.

Fonte: Adaptado de NELSON; COX (2011).

No caso da inibição mista o inibidor pode se ligar ao sítio catalítico do complexo enzima-substrato (ES) ou da enzima, formando os complexos inativados enzima-substrato-inibidor e enzima-inibidor, tornando o processo catalítico ineficiente, uma vez que a formação do complexo enzima-substrato é inibida (Figura 2.5). Dessa forma, a velocidade máxima da reação é modificada, mas não a constante de Michaelis-Menten (DUTTA, 2008; MOSIER; LADISCH, 2009). A inibição não-competitiva é raramente encontrada e é um caso particular de inibição mista em que K'_i é igual a K_i .

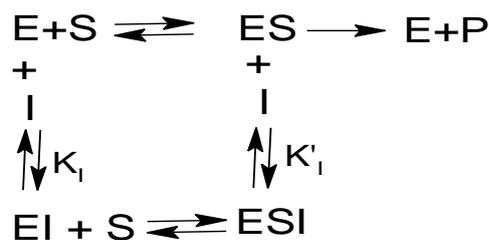


Figura 2.5 - Mecanismo de inibição reversível mista.

Fonte: Adaptado de NELSON; COX (2011).

Na inibição acompetitiva (vide Figura 2.5) o inibidor se liga unicamente ao complexo enzima-substrato, formando o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), não ocorrendo à formação de produto. Assim, tanto a velocidade máxima da reação quanto a constante de Michaelis-Menten são modificadas. Outro mecanismo descrito como inibição acompetitiva ocorre com o excesso de substrato no meio reacional, provocando a inibição pelo substrato, ou seja, quando um segundo substrato se liga ao complexo enzima-substrato, ocorre à formação do complexo enzima-substrato-substrato (ESS), acontecendo assim, inibição devido à segunda molécula do substrato (DUTTA, 2008; MOSIER; LADISCH, 2009).

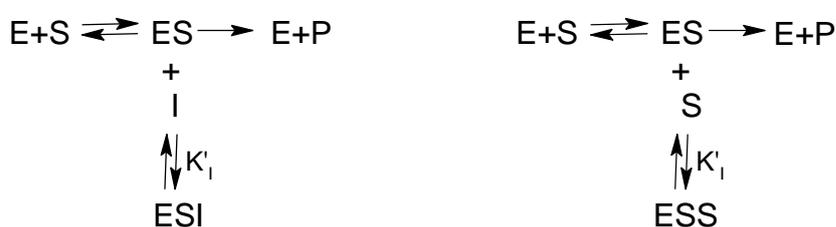


Figura 2.6 - Mecanismo de inibição reversível acompetitiva.

Fonte: Adaptado de NELSON; COX (2011).

Os modelos cinéticos enzimáticos com inibição apresentados na Tabela 2.4 são úteis para descrever tanto a reação de hidrólise quanto a reação de transgalactosilação da lactose, uma vez que dependendo da origem da enzima, a equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva é válida para representar a inibição pela formação da galactose, porém, nesse caso, a glicose não exerce efeito inibidor.

Tabela 2.4 - Modelos cinéticos enzimáticos.

Michaelis-Menten sem inibição	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$	2.2
Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$	2.3
Michaelis-Menten com inibição acompetitiva por produto	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S] \times \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$	2.4
Michaelis-Menten com inibição não-competitiva por produto	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{(K_m + [S]) \times \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$	2.5
Michaelis-Menten com inibição mista linear	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right) + [S] \times \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$	2.6

Fonte: Adaptado de SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA (1998).

Vera *et al.* (2011) estudaram a produção de galacto-oligossacarídeos a partir da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre, utilizando uma concentração inicial de lactose de

400 g/L. Neste estudo foi utilizado modelo de Michaelis-Menten, com inibição competitiva pela galactose. A 40 °C, os valores da velocidade máxima (v_{max}), constante de Michaelis-Menten (K_m) e constante de inibição competitiva (K_I) foram respectivamente 59716 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g enz}^{-1}$; 3,86 mol kg^{-1} e 9,37 mol kg^{-1} .

Freitas (2007) imobilizou β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio e gelatina, utilizando como agente reticulante glutaraldeído e encontrou valores de K_m e K_I de 46,78 e 53,33 mM para inibição competitiva pela galactose.

2.5.2 Estabilidade da enzima

Na estrutura proteica de uma enzima podem ocorrer modificações conformacionais, devido à influência de fatores como temperatura, pH e força iônica. O conhecimento da influência do pH na estabilidade da enzima é de grande importância, uma vez que diversas enzimas possuem velocidades máximas em um pH específico, conhecido como pH ótimo, enquanto outras possuem a mesma eficiência em um intervalo limitado de pH (SMITH *et al.*, 1985).

A estabilidade da enzima em um intervalo ou pH específico depende de fatores como concentração de enzima e substrato, temperatura, presença de cofatores, natureza química do tampão e força iônica (SEGEL, 1993).

Uma enzima pode ser carregada de forma positiva ou negativa, dependendo do pH, uma vez que existe uma variedade de aminoácidos em sua composição, os quais possuem grupos laterais básicos, ácidos ou neutros. Estes grupos ionizáveis ajudam a estabelecer a conformação da enzima, assim como de seu sítio ativo. Dessa forma, o estado de ionização dos grupos laterais será afetado em diferentes condições de pH, podendo levar à interrupção das interações iônicas, modificando e/ou desnaturando a estrutura proteica. Em outros casos, a força iônica do meio afeta a ligação entre apoenzima (porção proteica de uma enzima) e coenzima (porção não protéica), e também pode modificar o estado de ionização do substrato. Dessa forma, todas as enzimas apresentam um pH ótimo. A velocidade da reação aumenta com o pH até um valor ótimo a partir do qual a taxa decresce, devido à existência de estados de ionização inadequados na enzima ou à desnaturação (AEHLE, 2000; SEGEL, 1993).

A temperatura influencia a cinética enzimática de duas maneiras diferentes: com o aumento da temperatura ocorre o aumento da energia cinética das moléculas do sistema, conseqüentemente gerando o aumento da velocidade da reação (Equação 2.7). Vale ressaltar que na faixa de temperatura apropriada com a manutenção da estrutura espacial da enzima, esse efeito é perceptível. A desnaturação da enzima acontece por causa de temperaturas elevadas, uma vez que elas modificam as ligações químicas responsáveis pela manutenção de sua estrutura tridimensional. O rompimento das pontes de hidrogênio provoca alterações na estrutura da enzima, gerando uma estrutura sem definição ou uma conformação diferente (MARIOTTO, 2006).

A temperatura de estabilidade da enzima é dependente de alguns fatores, como ausência ou presença de ligantes, força iônica e pH. A desnaturação da enzima provocada pelo calor, comumente pode ser amenizada pela presença do substrato (SEGEL, 1993).

Na Equação 2.7, representado pela equação de Arrhenius, pode-se verificar o efeito da temperatura sobre a velocidade da reação.

$$k = B * e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.7)$$

No qual: B = constante de Arrhenius;

k = constante da velocidade;

R = constante universal dos gases;

T = temperatura absoluta;

E_a = energia de ativação.

Vale lembrar que algumas enzimas são termolábeis, ou seja, com o proceder da reação enzimática, ocorre também a reação de inativação térmica (MARIOTTO, 2006).

2.5.2.1 Modelos cinéticos de inativação térmica

O estudo da cinética de inativação das enzimas é de grande importância em reações enzimáticas, uma vez que a estabilidade delas determina a possibilidade de aplicá-las em vários processos biotecnológicos. Os modelos cinéticos de inativação térmica visam

avaliar o efeito sobre a atividade residual de diversos tratamentos térmicos, possibilitando a estimativa da perda de atividade, sem a execução de vários ensaios (VAN BOEKEL, 2008).

Os modelos cinéticos de inativação apresentados na Tabela 2.5 são baseados em diferentes mecanismos, como primeira ordem, reações paralelas e consecutivas. Neles foi considerado que a inativação segue por meio de uma série de reações, compreendendo a decomposição química, agregação, coagulação e desnaturação.

Tabela 2.5 - Algumas equações cinéticas empregadas na inativação enzimática.

Modelo	Equação	Referência
1ª ordem	$\frac{A}{A_0} = \exp(-k \times t)$ (2.8)	Ludikhuyze <i>et al.</i> (1999)
Duas frações	$\frac{A}{A_0} = a \times \exp(-k_L \times t) + (1 - a) \times \exp(-k_R \times t)$ (2.9)	Aymard e Belarbi (2000)
Distintas isoenzimas	$\frac{A}{A_0} = A_L \times \exp(-k_L \times t) + A_R \times \exp(-k_R \times t)$ (2.10)	Daniel e Danson (2013)
Multicomponente	$\frac{A}{A_0} = \frac{\exp(-k_1 \times t) + r \times \exp(-k_2 \times t)}{1 + r}$ (2.11)	Fujikawa e Itoh (1996)
Conversão fracionada	$\frac{A}{A_0} = A_R + (1 - A_R) \times \exp(-k \times t)$ (2.12)	Sadana e Henley (1987)
Weibull	$\frac{A}{A_0} = \exp(-b \times t^n)$ (2.13)	Peleg e Pechina (2000)
Enésima ordem	$\frac{A}{A_0} = [A_0^{1-n} + (n - 1) \times -k \times t]^{\frac{1}{1-n}}$ (2.14)	Shalini, Shivhare e Basu (2008)

Fonte: Adaptado de KLEIN *et al.* (2018).

Nas equações cinéticas apresentadas na Tabela 2.5 A/A_0 , k (min^{-1}) e t (min) representam respectivamente atividade residual da enzima, constante de inativação térmica para uma temperatura específica e tempo.

Na Equação 2.8 foi considerada reação irreversível com cinética de primeira ordem, utilizada para descrever a inativação térmica de diversas enzimas (LUDIKHUYZE *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2013). A influência da temperatura nessa equação é representada pela Equação 2.7, que é a equação de Arrhenius.

Em diversas situações, o modelo de primeira ordem simples não pode ser utilizado, uma vez que os dados experimentais não são ajustáveis. Dessa forma, foram propostas equações mais complexas para representar a inativação térmica de enzimas.

Nas Equações 2.9, 2.10 e 2.12 foram considerados modelos paralelos, no qual foi considerado que a enzima é uma mistura de duas formas ativas (isoformas e isoenzimas) com sensibilidades distintas, representadas pela fração "resistente" (A_R) e pela fração "lábil" (A_L), cada uma delas seguindo uma reação de primeira ordem, com suas constantes (k_R e k_L , respectivamente) (AYMARD; BELARBI, 2000; DANIEL; DANSON, 2013). O coeficiente α

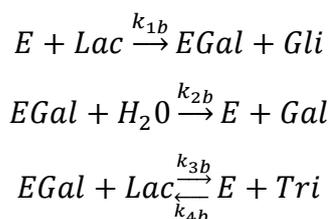
apresentado na Equação 2.9 é a atividade da porção lábil da enzima em relação à atividade total (CHEN; WU, 1998). Na Equação 2.12 foi levado em consideração um processo de inativação de primeira ordem, considerando a atividade da enzima diferente de zero, posteriormente a um extenso aquecimento, por causa da presença de uma fração de enzima muito resistente (SADANA; HENLEY, 1987; RIZVI; TONG, 1997).

A Equação 2.11 foi desenvolvida a partir de uma equação de primeira ordem. Ela utiliza o somatório da cinética de seus componentes, na qual cada um segue uma cinética de inativação térmica também de primeira ordem (FUJIKAWA; ITOH, 1996).

Na Equação 2.13 foi apresentado o padrão de distribuição de Weibull (1951), baseado na taxa de sensibilidade térmica ao calor, que não é um fator da taxa da atividade residual atingida, mas sim da intensidade do aquecimento transiente (PELEG; PENCHINA, 2000). Nesta equação, o parâmetro b representa a taxa de inativação térmica e ele é específico para cada reação. Finalmente, tem-se a atividade enzimática residual representada pela equação de enésima ordem (n) (Equação 2.14), no qual n é diferente de um (SHALINI; SHIVHARE; BASU, 2008).

2.5.2.2 Modelos cinéticos para a síntese de GOS

Na literatura existem diversos mecanismos cinéticos propostos para a síntese de GOS a partir de β -galactosidase (BOON; JANSSEN; VAN DER PADT, 1999; BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000; IWASAKI; NAKAJIMA; NAKAO, 1996; KIM; JI; OH, 2004). Entretanto, alguns mecanismos simples não conseguem se ajustar ao comportamento complexo do sistema e mecanismos muito complexos tendem a ser de difícil ajuste devido ao grande número de parâmetros ajustáveis, obtendo assim alta correlação paramétrica (OSMAN *et al.*, 2010). Dos mecanismos presentes na literatura, o mais utilizado é o proposto por Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) (vide Figura 2.7).



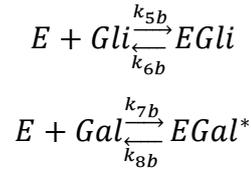


Figura 2.7 - Mecanismo cinético considerando apenas a síntese de trissacarídeos (GOS-3).

Fonte: Adaptado de BOON; JANSSEN; VAN DER PADT (1999).

No mecanismo apresentado na Figura 2.7 Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) consideram que a enzima (E) reage com o substrato (lactose - Lac), formando o complexo enzima-galactosil (EGal) e a glicose (Gli) é liberada, em seguida o complexo reage com água ou lactose, liberando a enzima e a galactose (Gal) para o meio reacional e ocorre a formação de trissacarídeos (Tri). Depois, a enzima é inibida pela galactose ou glicose formando respectivamente os complexos enzima-galactose não reativo (EGal*) e enzima-glicose não reativo (EGli). Esse mecanismo apresenta apenas 6 parâmetros, porém nele foi considerado apenas a produção de trissacarídeos, tornando o mecanismo específico para determinada enzima. Além disso, os autores não consideram a formação de galactobiose (Gal-Gal).

Vera *et al.* (2011), desenvolveram um modelo cinético capaz de ajustar a cinética de síntese de GOS no qual foi considerado a produção de dissacarídeos (GOS-2), trissacarídeos (GOS-3), tetrassacarídeos (GOS-4) e pentassacarídeos (GOS-5) (vide Figura 2.8).

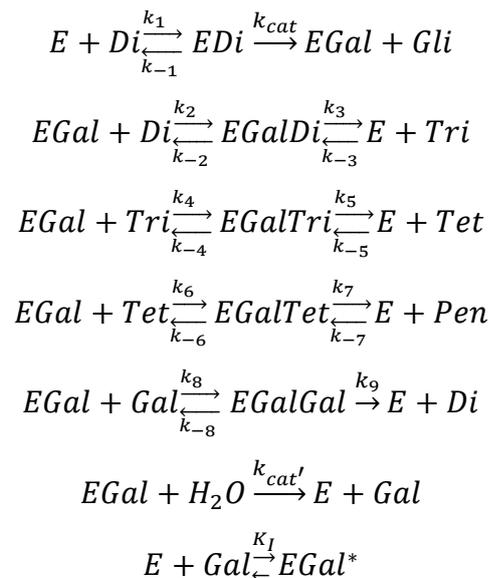


Figura 2.8 - Mecanismo cinético considerando síntese de dissacarídeos (Di), trissacarídeos (Tri), tetrassacarídeos (Tet) e pentassacarídeos (Pen).

Fonte: Reproduzido de VERA *et al.* (2011).

No mecanismo apresentado na Figura 2.8, Vera *et al.* (2011) consideraram a formação de complexos intermediários, dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacarídeos e pentassacarídeos, e que estes galacto-oligossacarídeos podem ser formados exclusivamente por galactose. Para a construção deste mecanismo foram consideradas as seguintes hipóteses: a enzima é capaz de sintetizar dissacarídeos transgalactosilados formados por dois monômeros de galactose (galactobiose), a enzima não é capaz de diferenciar GOS-2 de lactose, a galactose liberada para o meio reacional pode ser descrita como uma reação de primeira ordem em relação ao complexo enzima-galactosil, o efeito da glicose na cinética da reação é desprezado, e a enzima é inibida competitivamente pela galactose.

Dessa forma, foi obtido inicialmente um modelo cinético com dezoito parâmetros ajustáveis. Para reduzir o número de parâmetros foi assumido que a afinidade da enzima livre aos diferentes substratos era semelhante. Suposição análoga foi feita também para o complexo enzima-galactosil e seus substratos. Ou seja, foi utilizada apenas uma constante de dessorção para a enzima livre e uma para o complexo enzimático. Dessa maneira, o número de parâmetros a serem ajustados foi reduzido para oito.

Os resultados mostraram boa concordância entre o modelo e os dados experimentais. Além disso, na análise dos parâmetros foram utilizadas três temperaturas distintas e os modelos foram ajustados a equações fenomenológicas. Porém, nesse modelo há uma inconsistência no balanço de massa, porque os autores consideram que a galactobiose é o mesmo dissacarídeo formado por galactose ligado a glicose e foi assumido que a hidrólise de qualquer dissacarídeo produz uma glicose. Além disso, o modelo não traz nenhuma informação da quantidade de galacto-oligossacarídeos formados unicamente por galactose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzima

A enzima comercial líquida β -galactosidase do microrganismo *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G, Novozymes, Dinamarca) foi doada pela Empresa de Desenvolvimento Tecnológico Ltda. (EDETTEC, Belo Horizonte, MG) e estocada sob refrigeração.

3.1.2 Substratos

Neste trabalho utilizou-se permeado do soro de leite seco doado pela Tangará Foods (Belo Horizonte, MG). Foi utilizado também o substrato sintético o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o-NPG) obtido da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, Estados Unidos) e lactose obtida da Synth de Diadema-SP. Os demais reagentes são todos de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização do permeado do soro de leite

O permeado do soro foi caracterizado em relação ao seu teor de proteínas, seu teor de lactose e seu teor de sais minerais e umidade.

3.2.1.1 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método Kjeldahl (COTTA *et al.*, 2007; LABCONCO, 1998) usando destilador de nitrogênio Buchi 323 e um fator de 6,38 para o cálculo da concentração de proteínas no permeado de soro.

Para execução do procedimento foram realizadas as seguintes etapas: digestão, destilação e titulação.

Digestão: foram adicionados 1 g de catalisador ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, 1:10, m/m) e aproximadamente 500 mg de permeado aos tubos de digestão. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico e, em seguida, os tubos foram colocados no bloco digestor e mantidos por 150 min a uma temperatura aproximada de 250 °C. Após a digestão, foi esperado as amostras atingirem temperatura ambiente.

Destilação: os tubos com as amostras digeridas foram colocados no destilador de nitrogênio Buchi 323, e em seguida adicionou-se 25 mL de água destilada e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 M até surgimento de uma coloração preta. Posteriormente, as amostras foram destiladas por um tempo de 10 min e a amônia liberada foi absorvida em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de ácido bórico 20 g/L e 3 gotas de indicador misto.

Titulação: a amônia recolhida nos Erlenmeyer foi titulada com uma solução padronizada de HCl 0,01 M e o volume gasto foi utilizado no cálculo do nitrogênio total das amostras.

Para o cálculo do teor de proteínas total nas amostras líquidas foram utilizadas as Equações 3.1 e 3.2.

$$C_N(\text{g/g}) = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot C_{\text{HCl}} \cdot 14}{M_{\text{amostra}} \cdot 1000} \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Proteína (m/m)} = C_N(\text{g/g}) \cdot 6,38 \cdot 100 \quad (3.2)$$

No qual:

C_N (g/g) = concentração de nitrogênio total;

V_{HCl} (mL) = volume de ácido consumido na titulação;

C_{HCl} (M) = concentração de ácido clorídrico utilizado na titulação;

14 (g/mol) = massa molecular de nitrogênio;

M_{amostra} (g) = massa seca de amostra;

6,38 = fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio proteico para proteínas de leite e produtos lácteos;

% Proteína (m/m) = porcentagem de proteína na amostra (base seca).

3.2.1.2 Determinação do teor de lactose

A determinação do teor de lactose no permeado do soro foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - Waters 2424 ELS detector), utilizando uma coluna de troca iônica SUPELCOGEL Ca^{2+} (30 cm x 7,8 mm), fabricada pela Sigma-Aldrich, mantida a 80 °C e vazão de 0,5 mL/min. A fase móvel utilizada foi água Milli-Q e a quantificação foi feita por detector de índice de refração (RID), utilizando amostras padrões de lactose disponível comercialmente para a construção de curva de calibração externa.

3.2.1.3 Determinação de sais minerais e umidade

Os sais minerais e umidade presentes no permeado foram determinados pelo método de sólidos totais secos (CLESCERI; GREENBERG; EATON, 1999; SYMONS; MOREY, 1941). Este procedimento consistiu em incinerar os cadinhos vazios em uma mufla a uma temperatura de 550 °C durante 15 minutos, em seguida foram esperados 24 horas para retirar os cadinhos da mufla e foram pesados quando atingiram temperatura ambiente em dessecador. Posteriormente, foi pesado 1,5 g da amostra e transferiu-a para os cadinhos, depois o mesmo foi levado para uma estufa a 105 °C, posteriormente colocados em dessecador até ser pesado para verificar se a massa estava constante (sólidos totais). Os cadinhos com amostra foram colocados em uma mufla a 550 °C por 15 minutos e esperou-se o tempo de resfriamento em dessecador e pesaram-se os conjuntos. O experimento foi realizado em

triplicata. Os sólidos fixos (sais minerais) e umidade foram calculados de acordo com as Equações 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$\% \text{ sólidos totais (g/g)} = \frac{(m_{550^\circ\text{C}} - m_{\text{cad}})}{m_0} * 100 \quad (3.3)$$

$$\% \text{ umidade} = \left(1 - \frac{m_{105^\circ\text{C}} - m_{\text{cad}}}{m_0}\right) * 100 \quad (3.4)$$

No qual:

$m_{550^\circ\text{C}}$ (g) = massa da amostra após a mufla;

m_{cad} (g) = massa do cadinho vazio;

m_0 (g) = massa inicial do permeado;

$m_{105^\circ\text{C}}$ (g) = massa da amostra após a estufa.

3.2.2 Caracterização da enzima

A enzima foi caracterizada em relação a quantidade de proteínas, a atividade enzimática e estabilidade variando temperatura, pH e força iônica.

3.2.2.1 Determinação de proteínas

Para determinar a concentração de proteína na enzima β -galactosidase foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA) para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 750 mg/L. Nesse método foram adicionados 25 μL de amostra de enzima previamente diluída e adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford, esperou-se 5 min em temperatura ambiente e posteriormente mediu-se a amostra em espectrofotômetro, utilizando absorvância de 595 nm.

3.2.2.2 Ensaio de atividade enzimática da β -galactosidase

A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, medindo-se o aumento de absorbância devido à formação do produto de hidrólise do substrato. O ensaio foi realizado em cubeta de plástico, de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Scientific, USA) acoplado a um acessório (Air-Cooled Peltier) responsável por controlar a temperatura e agitação da amostra, e um software VISIONlite.

A atividade hidrolítica da β -galactosidase (β -D-galactosideo-galactohidrolase, E.C.3.2.1.23) foi determinada utilizando como substrato o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o-NPG). Amostra de solução enzimática foi adicionada a uma cubeta com 2 mL de solução 2 mM de o-NPG em tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7 e temperatura de 37 °C, contendo 10 mM NaCl e 1,5 mM de MgCl₂. A atividade foi determinada espectrofotometricamente a 410 nm e a reação foi medida nos primeiros 5 minutos, de modo a determinar a inclinação da região linear. O coeficiente de extinção molar do produto o-nitrofenil (o-NP) utilizado foi de 1385 M⁻¹ cm⁻¹ (KIM; JI; OH, 2004). Uma unidade da atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima para produzir 1 μ mol de o-NP por minuto sob as condições definidas. A atividade foi calculada de acordo com a Equação 3.5.

$$At \text{ (U/mL)} = \frac{tg * V_{reator}}{1,385 * V_{enzima}} \quad (3.5)$$

No qual:

At = atividade hidrolítica do o-NPG;

tg = tangente da curva de hidrólise;

V_{reator} (mL) = volume total do reator (cubeta);

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

3.2.2.3 Estudo da temperatura, pH e força iônica na estabilidade enzimática

As faixas de pH, temperatura e força iônica foram escolhidas baseando-se nas melhores condições de operação da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (vide Tabela 2.3).

3.2.2.3.1 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da lactase foi determinado incubando a enzima em fosfato de potássio 50 mM e pH 7, contendo 10 mM NaCl e 1,5 mM de MgCl₂ nas temperaturas de 35, 40, 42,5 e 45 °C. Em intervalos de tempos pré-determinados, amostras foram retiradas e imediatamente medidas para determinar as atividades enzimáticas através da hidrólise do o-NPG conforme procedimento descrito no item 3.2.2.2.

3.2.2.3.2 Efeito do pH

Para determinar a influência do pH na estabilidade da enzima, a lactase foi incubada em fosfato de potássio 50 mM e 35 °C, contendo 10 mM NaCl e 1,5 mM de MgCl₂ nos pH de 6, 6,5, 7, 7,5 e 8. Em tempos pré-definidos, foram retiradas as amostras e medidas em espectrofotômetro para determinar as atividades enzimáticas, utilizando como substrato o-NPG em NaCl e MgCl₂ e temperatura de 37 °C (item 3.2.2.2).

3.2.2.3.3 Efeito da força iônica (I)

A influência da força iônica na estabilidade da lactase foi determinada, incubando a enzima na presença de fosfato de potássio pH 7 e 35 °C, contendo 10 mM NaCl e 1,5 mM de MgCl₂ nas forças iônicas de 25, 50, 100 e 200 mM. Em intervalos de tempo

definidos amostras foram retiradas e posteriormente foram medidas suas atividades, conforme procedimento descrito no item 3.2.2.2.

3.2.3 Experimentos para síntese de GOS

3.2.3.1 Delineamento composto central rotacional para a síntese de GOS

Com o objetivo de verificar a influência da temperatura, do pH e da força iônica na relação entre as velocidades iniciais de síntese de GOS e hidrólise foi realizado delineamento composto central rotacional, utilizando como substrato lactose e permeado, na concentração de 220 g/L de lactose (pura, ou presente em permeado do soro de leite). Utilizou-se essa concentração para garantir que a lactose estivesse completamente solúvel no meio reacional. Nesse delineamento foram selecionadas as melhores condições de pH, temperatura e força iônica para a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (vide Tabela 2.3).

Na Tabela 3.1 e Tabela 3.2 foram apresentados os níveis utilizados no planejamento e os valores codificados e originais, respectivamente.

Tabela 3.1 - Níveis utilizados para três fatores.

Variáveis	código	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	x1	6,83	7	7,25	7,5	7,67
Temperatura (°C)	x2	33,3	35	37,5	40	41,7
Força iônica (mM)	x3	33	50	75	100	117

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3.2 - Valores codificados e reais.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	x1	x2	x3	pH	Temperatura (°C)	Força iônica (mM)
1	+1	+1	+1	7,5	40	100
2	+1	+1	-1	7,5	40	50
3	+1	-1	+1	7,5	35	100
4	-1	+1	+1	7	40	100
5	-1	-1	+1	7	35	100
6	-1	-1	-1	7	35	50
7	+1	-1	-1	7,5	35	50
8	-1	+1	-1	7	40	50
9	0	0	0	7,25	37,5	75
10	+1,68	0	0	7,67	37,5	75
11	0	+1,68	0	7,25	41,7	75
12	0	0	+1,68	7,25	37,5	117
13	-1,68	0	0	6,83	37,5	75
14	0	-1,68	0	7,25	33,3	75
15	0	0	-1,68	7,25	37,5	33
16	0	0	0	7,25	37,5	75
17	0	0	0	7,25	37,5	75
18	0	0	0	7,25	37,5	75
19	0	0	0	7,25	37,5	75
20	0	0	0	7,25	37,5	75

Fonte: Elaborado pela autora.

Estes ensaios foram realizados em tampão fosfato de potássio e foi adicionado ao meio 10 mM NaCl e 1,5 mM MgCl₂, sendo que o volume do meio reacional foi de 5 mL e enzima foi adicionada em uma concentração de 5,8 U/mL para iniciar a reação, em seguida, amostras foram coletadas em intervalos pré-definidos de tempo, nos primeiros 30 minutos de reação e submetidas a um banho de 90 °C por 3 min para paralisação a reação. Após, as amostras foram diluídas, filtradas e quantificadas por HPLC, utilizando detector de índice de refração (RID) e coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm), conforme item 3.2.3.4.

3.2.3.2 Planejamento experimental de velocidades iniciais

O delineamento composto central rotacional possibilitou encontrar uma superfície de resposta (vide Equação 3.6).

$$y = a_0 + a_1 * x_1 + a_2 * x_2 + a_3 * x_3 + a_4 * x_1 * x_2 + a_5 * x_2 * x_3 + a_6 * x_1 * x_3 + a_7 * x_1^2 + a_8 * x_2^2 + a_9 * x_3^2 \quad (3.6)$$

Nesta equação x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis, respectivamente pH, temperatura e força iônica, referentes aos fatores; a_0 (ponto de interseção), a_1 , a_2 , a_3 (efeitos lineares), a_4 , a_5 , a_6 (efeitos de interação dupla) e a_7 , a_8 , a_9 (efeitos quadráticos). Estes fatores foram determinados através do método de mínimos quadrados linear. A resposta do delineamento (y) foram a velocidade inicial de síntese (r_{GOS}) e hidrólise (r_{Gal}), seletividade (r_{GOS}/r_{Gal}) e atividade total da β -galactosidase ($r_{GOS} + r_{Gal}$). A Equação 3.7 representa o modelo descrito na Equação 3.6, onde \hat{y} é vetor das respostas estimadas, X é a matriz de coeficientes de contraste e $\hat{\theta}$ é o vetor de parâmetros.

$$\hat{y} = X\hat{\theta} \quad (3.7)$$

$\hat{\theta}$ foi estimado através do método dos mínimos quadrados linear (NELLES, 2001) (vide Equação 3.8).

$$\hat{\theta} = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (3.8)$$

Com a estimação do vetor de parâmetros obteve-se também seus respectivos erros padrões, determinados a partir da matriz de covariância paramétrica ($cov\{\hat{\theta}\}$) (vide Equação 3.9).

$$cov\{\hat{\theta}\} = \sigma^2 (X^T X)^{-1} \quad (3.9)$$

Sendo a variância (σ^2) representada pela Equação 3.10, onde $e = y - \hat{y}$, N é o número de ensaios totais, m é a quantidade de parâmetros e R são as réplicas dos ensaios:

$$\sigma^2 = \frac{(e^T e)}{N - m - R} \quad (3.10)$$

Assim a determinação do erro padrão (Ep) dos parâmetros foi feita de acordo com a Equação 3.11:

$$E_p = \pm \sqrt{\text{diag}(\text{cov}\{\widehat{\theta}\})} \quad (3.11)$$

3.2.3.3 Cinética de síntese de GOS

A síntese de GOS foi realizada utilizando concentração de 400 g/L e 220 g/L de lactose (pura, ou presente em permeado do soro de leite). Os substratos foram dissolvidos em tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM, adicionando 10 mM NaCl e 1,5 mM MgCl₂, posteriormente aquecidas em 95 °C para a completa dissolução. O volume do meio reacional foi de 25 mL e a reação foi iniciada adicionando enzima β-galactosidase obtida de *K. lactis* com concentração de 5,8 U/mL, e a reação foi mantida a 40 °C por 10 h. Em intervalos definidos de tempo amostras foram coletadas e submetidas a um banho de 90 °C por 3 minutos para a inativação da enzima. Posteriormente, essas amostras foram diluídas, filtradas e quantificadas através de HPLC (item 3.2.3.4).

3.2.3.4 Análises

Os produtos da reação e a lactose foram quantificados por HPLC Shimadzu contendo degaseificador DGU-20A5R, alto injetor SIL 10 ADVP, detector de índice de refração (RID-10A), forno de coluna CTO-20A, todos controlados por controlador SCL-10A VP. Foi utilizada uma coluna de troca iônica SUPELCOGEL Ca⁺² (30 cm x 7,8 mm) fabricada pela Sigma-Aldrich. As amostras foram eluídas com água Milli-Q em uma vazão de 0,5 mL/min. A coluna e detector foram mantidos a 80 °C e 40 °C, respectivamente. Também foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). Neste caso, a fase móvel utilizada foi 6,5 mM H₂SO₄ e a coluna foi mantida a uma vazão de 0,7 mL/min. A temperatura da coluna e do detector foram respectivamente 55 °C e 45 °C. Na Figura 3.1 foi apresentado exemplo de cromatograma com o tempo de retenção para os produtos e substrato. Na integração dos cromatogramas foi utilizado o *software* LC solution.

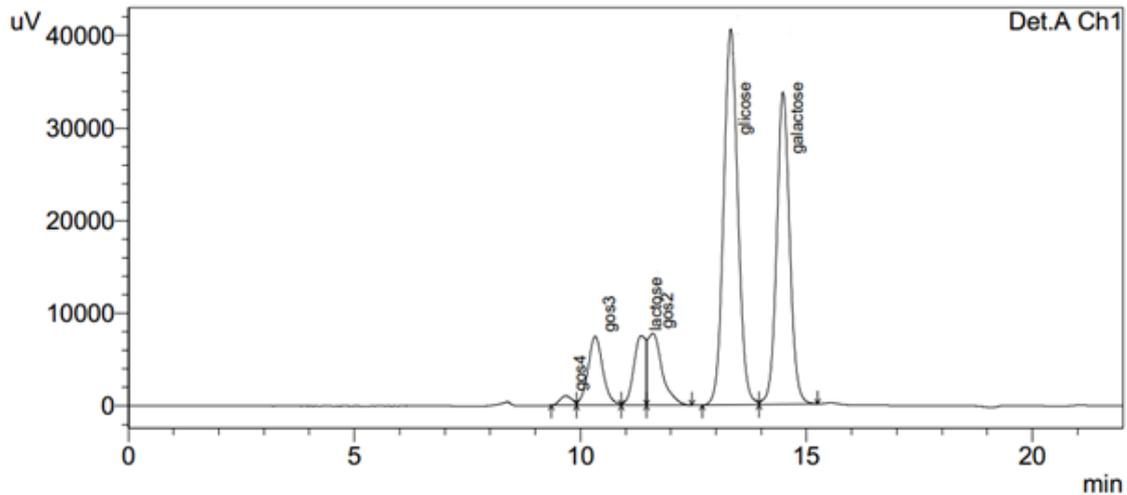


Figura 3.1 - Cromatograma de síntese de GOS para concentração de lactose de 400 g/L, utilizando HPLC com detector de índice de refração e coluna SUPELCOGEL Ca^{+2} (30 cm x 7,8 mm). Tempo de retenção: GOS-4 - 9,7 min, GOS-3 - 10,3 min, lactose - 11,5 min, GOS-2 - 11,6 min, glicose - 13,3 min e galactose - 14,5 min.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.4 Ajuste de modelos cinéticos

Os ajustes dos modelos cinéticos foram feitos utilizando dados experimentais de diferentes ensaios de síntese enzimática de GOS utilizando como substrato lactose e permeado do soro de leite. Os ajustes foram feitos por regressão não-linear utilizando a função `lsqnonlin` do software Matlab®. A Equação 3.12 representa a função objetivo utilizada (J) que corresponde à soma do erro quadrado.

$$J(\theta) = \sum_{k=1}^l \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (Y_{ijk} - \phi(\theta)_{ijk})^2 \quad (3.12)$$

No qual:

θ = vetor de parâmetros ajustáveis;

$\phi(\theta)_{ijk}$ = modelo da i -ésima variável medida, calculado no i -ésimo ensaio experimental;

Y = vetor das variáveis medidas.

Durante o ajuste de parâmetros, intervalo de confiança e a matriz de correlação paramétrica também foram calculados.

3.2.5 Cálculo do rendimento total de GOS

Para diminuir o erro na concentração inicial de lactose (Lac₀), afetou-se o cálculo de Lac₀ utilizando a média do somatório em base molar de todos os resíduos de galactose (Gal_i) e glicose (Gli_i) presentes na reação dividido por dois (Equação 3.13). Esses resíduos foram calculados de acordo com a Equação 4.1. O rendimento de GOS total (GOS_t) foi calculado considerando a Equação 3.14, que expressa quanto da galactose disponibilizada para a reação foi utilizada para formar GOS. Observe que ao representar a equação de rendimento dessa maneira, também é levada em consideração a formação de galactobiose. A conversão da lactose foi calculada utilizando a concentração inicial de lactose e a concentração de lactose em um tempo (t) qualquer da reação (Lac (t)) (vide Equação 3.15).

$$\text{Lac}_0 = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\text{Gal}_i + \text{Gli}_i) \right] * \frac{1}{2} \quad (3.13)$$

$$\text{GOS}_t = \frac{\text{Gal em GOS}}{\text{Gal disponibilizada}} = \frac{\text{Gli} - \text{Gal}}{\text{Lac}_0} \quad (3.14)$$

$$\text{Conversão} = \frac{\text{Lac}_0 - \text{Lac}(t)}{\text{Lac}_0} \quad (3.15)$$

3.2.6 Modelos cinéticos de inativação enzimática

Três modelos de inativação enzimática foram abordados (vide Tabela 2.5). O de 1ª ordem (Equação 2.8), o proposto por Sadana e Henley (1987) (Equação 2.12), e um modelo baseado em um intermediário inativo reversível (DANIEL; DANSON, 2013) (Equação 2.10).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do permeado do soro

Primeiramente, realizou-se a caracterização do permeado de soro. A caracterização do permeado do soro é importante, pois sua composição pode variar com a fonte do leite, com o processo de coagulação do leite e com o processo de ultrafiltração do soro.

A concentração em porcentagem de proteína (m/m) presente no permeado do soro foi de $2,11 \pm 0,06\%$. Ele apresentou um teor de lactose ($m_{\text{Lac}}/m_{\text{per}}$) de 82,2%. Seu teor de umidade foi de 8,9% e a quantidade de sais presentes foi de 7,3%. Resultados análogos também foram obtidos por Manucci (2009). A autora realizou a caracterização do permeado do soro e obteve uma composição 92% de lactose, 2,5% de proteína, 1% de gordura e 1% de minerais.

4.2 Caracterização da enzima

A solução comercial da β -galactosidase de *K. lactis* também foi caracterizada e apresentou concentração de proteína de 32,9 g/L. Sua atividade de hidrólise enzimática foi de $5,27 \times 10^3$ U/mL em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7 e 37 °C, na presença de cofatores (10 mM NaCl e 1,5 mM MgCl_2). Portanto, a atividade específica da lactase (por massa de proteína) foi de 160 U/mg.

4.3 Ensaio de estabilidade

É necessário o estudo da inativação da lactase de *K. lactis* ao longo do processo em que são utilizadas, de forma a conhecer as condições adequadas a serem empregadas, como pH, temperatura e força iônica, visando a manutenção da sua estabilidade.

A influência dos cofatores NaCl e MgCl₂ sobre a estabilidade térmica da lactase de *K. lactis* está apresentada na Figura 4.1. Observou-se que na ausência dos cofatores, a perda de atividade da enzima é mais acentuada quando a temperatura aumenta de 35 °C para 40 °C. Contudo, mesmo a 35 °C a presença dos cofatores (10 mM NaCl e 1,5 mM MgCl₂) no meio é importante para o aumento da estabilidade da enzima. Ao utilizar a temperatura de 45 °C, tanto na presença ou ausência de cofatores a estabilidade da enzima decresce rapidamente, quando comparado com os ensaios de a 35 e 40 °C.

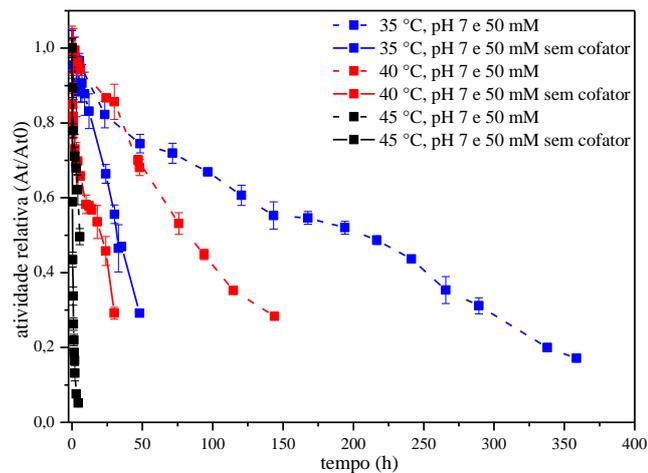
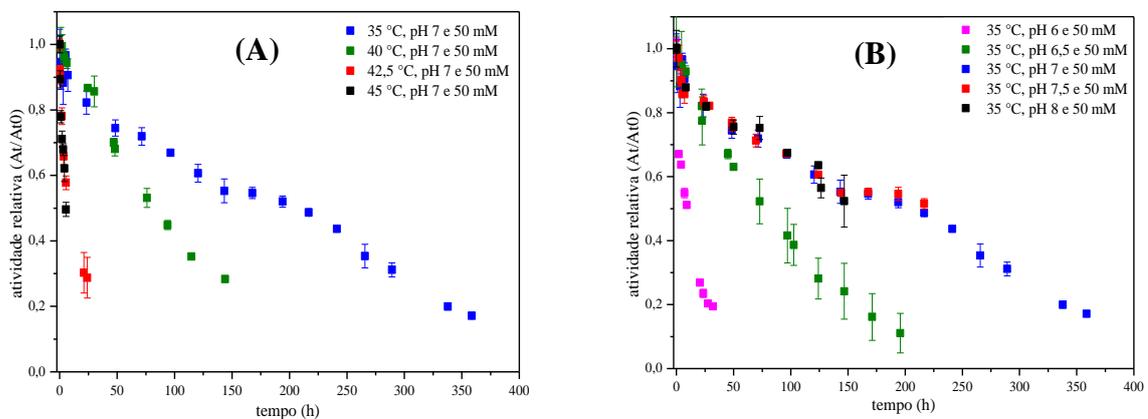


Figura 4.1 - Estabilidade da β -galactosidase em função do tempo (h), para as temperaturas de 35, 40 e 45 °C com e sem cofatores, incubando a enzima em tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM.

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim, os outros ensaios de estabilidade com variação de força iônica, pH e temperatura foram realizados na presença de cofatores e estão expostos na Figura 4.2.



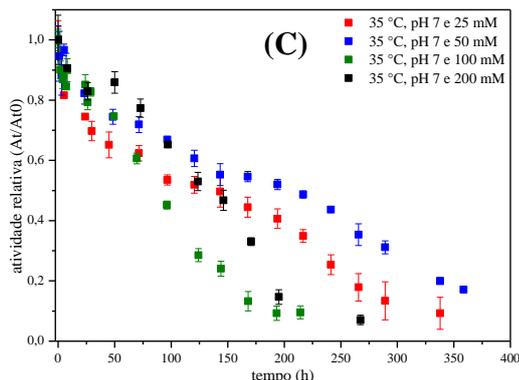


Figura 4.2 - Estabilidade da β -galactosidase em tampão fosfato de potássio versus tempo (h). (A) Variação de temperatura, (B) variação de pH e (C) variação de força iônica.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados apresentados, a estabilidade da enzima cai bruscamente entre 35 °C e 45 °C. Na literatura, foi relatado que temperaturas acima de 45 °C ocorre uma significativa inativação da β -galactosidase (SANTOS; LADERO; GARCIA-OCHOA, 1998). Os dados também mostram que a redução do pH de 6,5 para 6, provoca uma significativa redução na estabilidade da lactase. Nas primeiras 25 h de reação as quedas de atividade relativas foram similares nos pH 6,5, 7,0 7,5 e 8,0. Após esse período, no pH 6,5 ocorreu significativa inativação. Nos ensaios com variação de força iônica, houve um comportamento similar de queda da atividade relativa nas primeiras 75 h iniciais nas forças iônicas de 25, 50, 100 e 200 mM. Após esse período, ocorre considerável perda de estabilidade na força iônica de 100 mM seguida pela força iônica de 200 mM.

4.4 Modelos de estabilidade da β -galactosidase

Um modelo de inativação de enzima é uma ferramenta importante para que se possa avaliar a quantidade de enzima necessária para um processo específico, principalmente em processos em batelada alimentada, onde longos tempos de reação tornam a inativação um fenômeno importante. Um modelo de primeira ordem (Equação 2.8) é o mais simples e mais utilizado para descrever a inativação enzimática. Porém, embora o modelo se encaixe em algumas curvas (Figura 4.3B), o modelo de 1ª ordem não consegue descrever a grande maioria das curvas obtidas (vide, por exemplo, a Figura 4.3A).

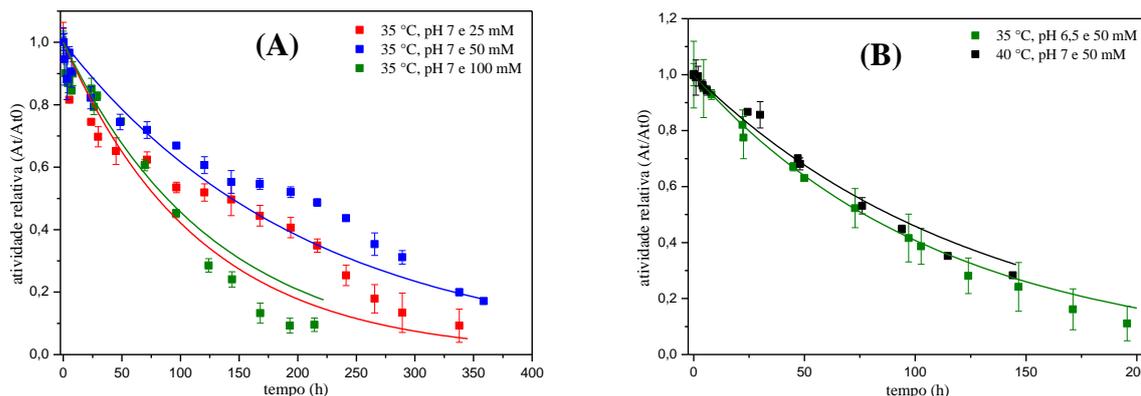


Figura 4.3 - Ajuste do modelo de primeira ordem. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo.

Fonte: Elaborado pela autora.

O modelo de Sadana e Henley (1987) (Equação 2.12) é muitas vezes utilizado quando a atividade da enzima cai rapidamente nos instantes iniciais, mas após certo tempo, a atividade estabiliza em certo patamar. Este modelo se ajusta satisfatoriamente a alguns ensaios (Figura 4.4B), porém tampouco se ajusta à maioria dos dados experimentais (Figura 4.4A). A grande desvantagem desse modelo é que ele prevê que não haverá mais inativação a partir de certo ponto. Isso raramente ocorre experimentalmente.

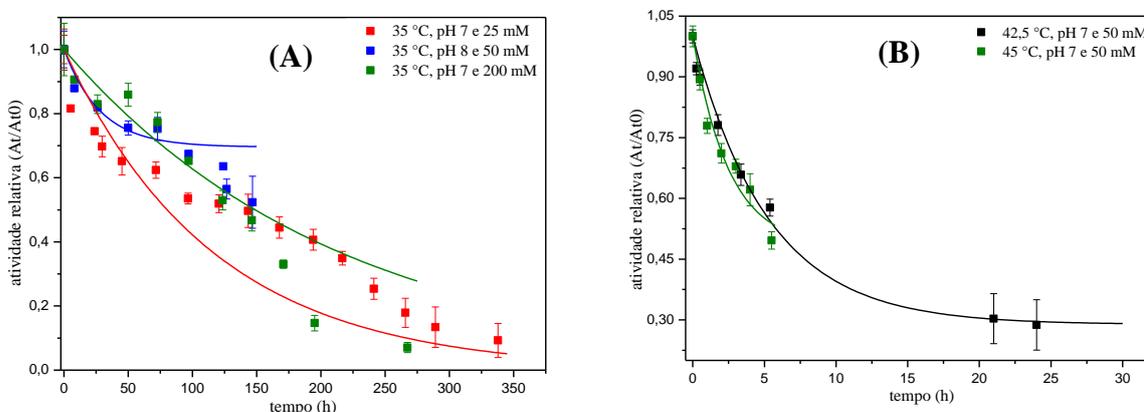


Figura 4.4 - Ajuste do modelo de Sadana e Henley. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.5 é apresentado o ajuste do modelo com intermediário inativo reversível (Equação 2.10). Este modelo consegue descrever uma inativação inicial rápida seguida de uma inativação menos acentuada. De acordo com a Figura 4.5B, pode-se analisar que alguns dados experimentais se ajustam bem ao modelo. Contudo, é observado que esse modelo também não é capaz de prever o comportamento de alguns ensaios experimentais (Figura 4.5A). O perfil de inativação em certas condições (25 mM e 50 mM, Fig. 4.3A; 200

mM Fig. 4.4A e Fig. 4.5A), mostra um ponto de inflexão. Nenhum dos modelos presentes na Tabela 2.5 é capaz de descrever tal comportamento. Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre mecanismos de inativação da β -galactosidase.

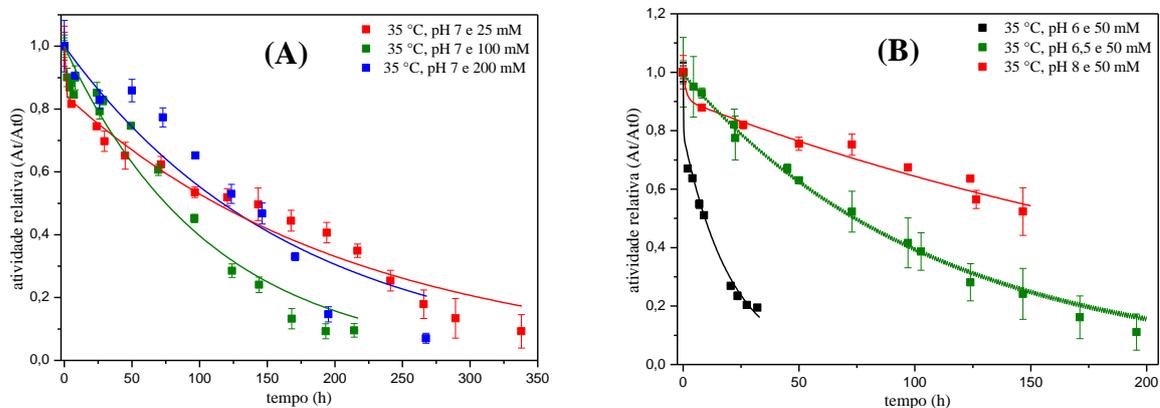


Figura 4.5 - Ajuste do modelo com intermediário inativo reversível. Exemplos de dados não ajustáveis (A) e ajustáveis (B) a este modelo.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Ensaios de síntese de GOS a partir de lactose e permeado do soro de leite

Os ensaios de síntese de GOS foram realizados utilizando uma concentração inicial de lactose de 400 e 220 g/L de lactose pura utilizando como substrato lactose e permeado. Os resultados destes ensaios, que são o consumo de dissacarídeo (Di), a formação dos produtos glicose (Gli), Galactose (Gal), trissacarídeos (GOS-3) e tetrassacarídeos (GOS-4), estão apresentados na Figura 4.6. É importante ressaltar que o dissacarídeo apresentado nessas figuras, é a soma das concentrações de lactose e GOS-2, uma vez que a separação completa desses dois componentes durante a análise em HPLC não é possível durante a maior parte da reação. Isso ocorre, pois o pico de lactose sobrepõe o pico de GOS-2, principalmente no início da reação no qual o meio reacional apresenta alta concentração de lactose. Essa dificuldade de separar o GOS-2 da lactose também foi encontrada por outros autores, como Vera *et al.* (2011).

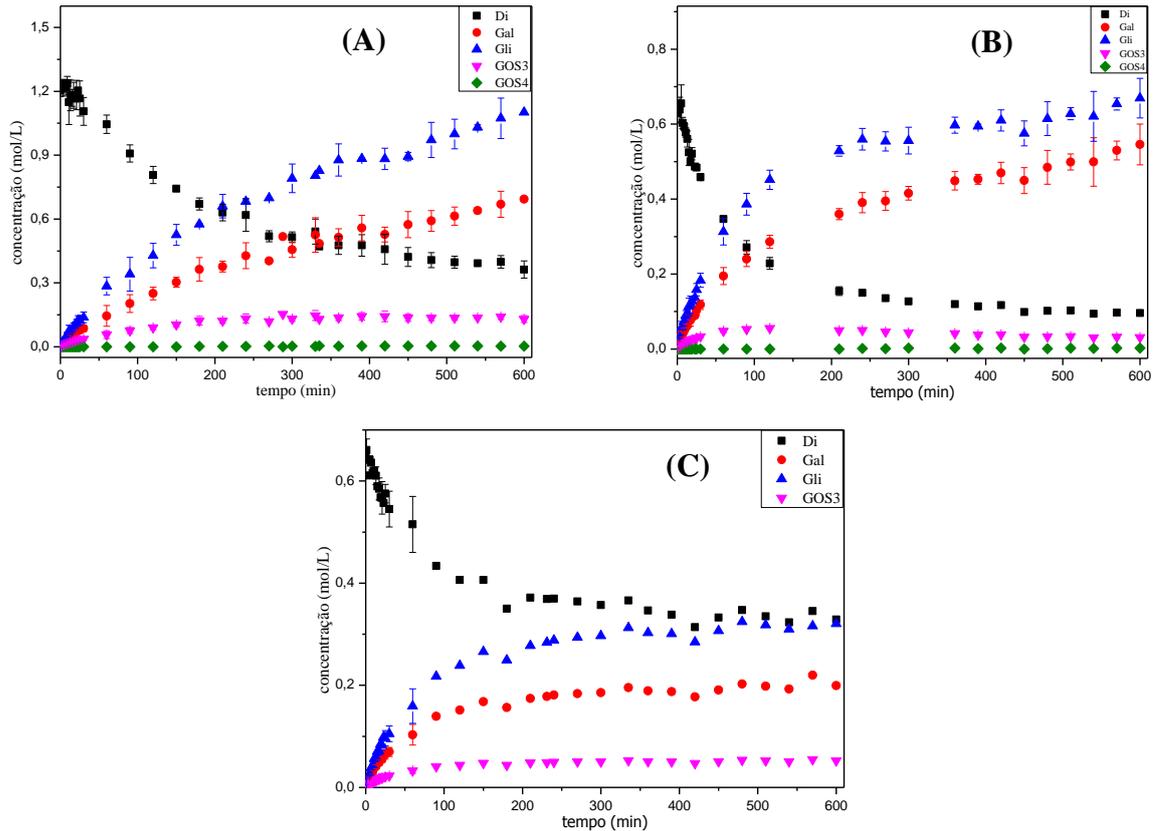


Figura 4.6 - Síntese de GOS utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL. (A) Concentração inicial de lactose de 400 g/L (1,2 M), (B) concentração inicial de lactose de 220 g/L (0,64 M) e (C) concentração inicial de lactose de 220 g/L (0,64 M), utilizado como substrato permeado do soro de leite.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.6 é demonstrada a influência da concentração de lactose nas reações de transgalactosilação e hidrólise. Como pode ser observado, nos primeiros minutos de reação há uma competição entre as reações de transgalactosilação e hidrólise, pois o meio está com alta concentração de lactose (vide Fig. 4.6A). A concentração máxima de GOS-3 obtida na Figura 4.6 (A) e (B) são respectivamente de 0,15 M e 0,05 M em aproximadamente 275 min e 125 min de reação. Após esse tempo há a tendência da reação de hidrólise ser mais acentuada. Tanto com 400 g/L (Fig. 4.6A) como 220 g/L (Fig. 4.6B) há a formação de GOS-4, porém sua concentração é muito baixa (0,0044 M e 0,0023M respectivamente). A influência de altas concentrações de lactose na síntese de galacto-oligossacarídeos utilizando a β -galactosidase é consistente com trabalhos semelhantes apresentados na literatura (GOULAS; TZORTZIS; GIBSON, 2007; HUERTA *et al.*, 2011; MAUGARD *et al.*, 2003; NERI *et al.*, 2009).

Na Figura 4.6B e C foram utilizados como substrato, respectivamente, lactose pura e permeado de soro, ambos com 220 g/L de concentração inicial de lactose. Pode-se perceber que no experimento com permeado não houve produção de GOS-4. É importante observar que as velocidades de reações (tanto de síntese quanto de hidrólise) praticamente cessaram a partir de 200 min aproximadamente (vide Fig. 4.6C). Este resultado pode estar ligado à inibição da enzima por proteínas e minerais presentes no permeado (MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985). Futuramente essa possível inibição da enzima, quando utilizado permeado como substrato, será levada em consideração no modelo proposto neste trabalho. A concentração máxima de GOS-3 neste ensaio também foi de 0,05 M após 125 min do início da reação. Nestas figuras ainda pode-se observar que a relação entre as velocidades de síntese e de hidrólise (seletividade) em 60 min de reação é melhor para o permeado quando comparado com a lactose, nas mesmas concentrações.

4.5.1 Rendimento de GOS

A concentração inicial de lactose foi calculada de acordo com a Equação 3.13 para a redução do erro no cálculo de conversão (Equação 3.15). Nas Figuras 4.7 a 4.9 são apresentados os rendimentos de GOS total obtidos para cada ensaio (Equação 3.14).

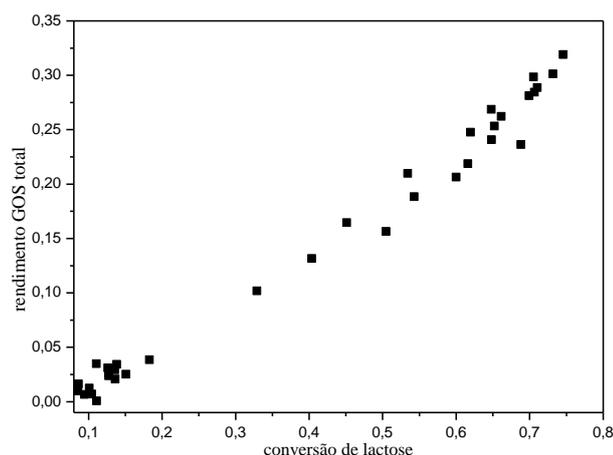


Figura 4.7 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaios realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com lactose (400 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL.

Fonte: Elaborado pela autora.

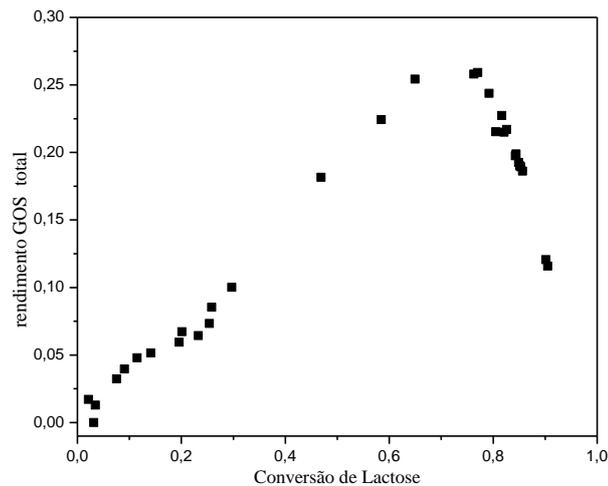


Figura 4.8 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com lactose (220 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL.

Fonte: Elaborado pela autora.

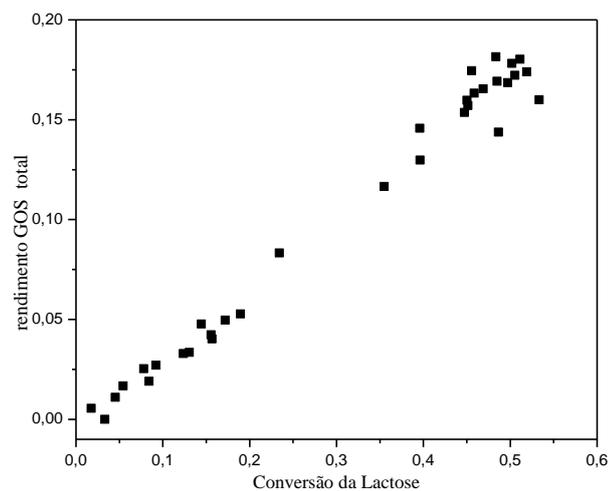


Figura 4.9 - Rendimento de GOS total utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) com permeado do soro (220 g/L), a 40 °C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi 5,8 U/mL.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.7 foi realizado ensaio com concentração inicial de lactose de 400 g/L, o rendimento máximo de GOS (32%) foi obtido quando 75% de lactose foi convertida. Nas Figuras 4.8 e 4.9 foram utilizados como substrato respectivamente lactose pura e permeado do soro ambos na concentração de 220 g/L de lactose. Pode-se perceber que o rendimento máximo de GOS, isto é, 26% e 18% foi alcançado quando 76% e 51% de lactose foi convertido, respectivamente. É possível notar que utilizando o permeado do soro ao invés de lactose pura, ambos na mesma concentração, obtêm-se um rendimento inferior de GOS,

porém ao usar lactose pura ocorre hidrólise dos GOS formados a partir de 76% de lactose convertida.

Na literatura é reportado que baixos rendimentos de GOS em leite ou soro são resultado, por causa de uma possível inibição da enzima por proteínas de leite (CHEN; HSU; CHIANG, 2002).

Manucci (2009) utilizou permeado do soro (200 g/L) como substrato para a β -galactosidase de *K. lactis* e obteve um rendimento de GOS de 18% quando a conversão de lactose foi de 62%. Chockchaisawasdee *et al.* (2005) também utilizou β -galactosidase de *K. lactis* com concentração inicial de lactose de 400 g/L e alcançaram um rendimento de GOS de 24,8% com conversão de lactose de 92%. Vera *et al.* (2011) encontrou um rendimento máximo de GOS total de 27,5% em 50% de conversão da lactose. Os autores utilizaram uma concentração inicial de lactose de 400 g/L e a síntese foi feita utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Dessa forma, diferenças no rendimento de GOS acontecem devido às diferentes concentrações iniciais de lactose e as diversas fontes de enzima utilizada (BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000; URRUTIA *et al.*, 2013).

4.5.2 Balanço dos resíduos de glicose e galactose durante a síntese

Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) propuseram uma expressão para se determinar o balanço dos resíduos de glicose e galactose durante a síntese de GOS, na qual considerou-se também a síntese de GOS-4 (vide Equação 4.1). Porém, os autores não consideraram que há a formação de galactobiose (Gal-Gal). $\left(\left(\frac{\text{Gli}}{\text{Gal}}\right)^*\right)$ caso todos os GOS contivessem Gli).

$$\left(\frac{\text{Gli}}{\text{Gal}}\right)^* = \frac{\text{Di}+\text{Gli}+\text{Tri}+\text{Tet}}{\text{Di}+\text{Gal}+2\times\text{Tri}+3\times\text{Tet}} \quad (4.1)$$

Por meio da Equação 4.1 obteve-se a Figura 4.10, demonstrando que há a formação de oligossacarídeos formados unicamente de galactose. Caso contrário, o resultado da equação 4.1 deveria ser sempre constante e igual a um. Além disso, dentro da variância experimental obtida, a utilização de permeado como substrato parece não alterar a seletividade da enzima na produção de galactobiose.

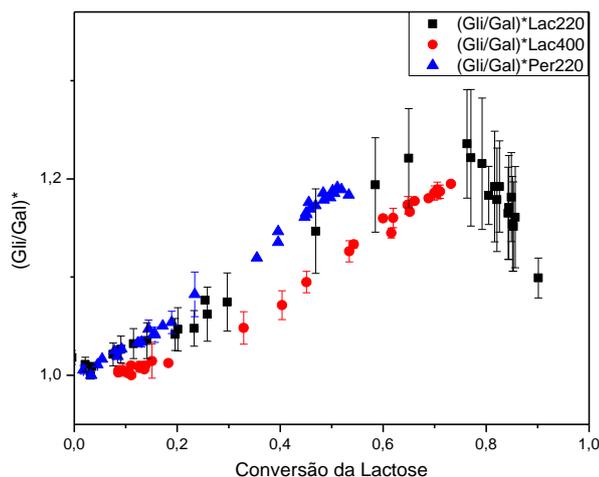


Figura 4.10 - Resíduos de (Gli/Gal)* versus conversão de lactose. Ensaio realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), a 40°C, durante 600 minutos de reação. A concentração de enzima utilizada foi de 5,8 U/mL. (●) Concentração inicial de lactose de 400 g/L, (■) concentração inicial de lactose de 220 g/L e (▲) concentração inicial de lactose de 220 g/L, utilizado como substrato permeado do soro de leite.

Fonte: Elaborado pela autora.

A formação de galacto-oligossacarídeos formados exclusivamente por moléculas de galactose também foi reportado na literatura por Adamczak, Charubin e Bednarsky (2009) e Ladero *et al.* (2002).

4.6 Mecanismo cinético para a síntese de GOS

No item 4.5.2 constatamos que há a formação da galactobiose. Dessa maneira, baseado em algumas considerações feitas Boon, Janssen e Van Der Padt (1999), Boon, Janssen e Van't Riet (2000) e Vera *et al.* (2011), propôs-se um mecanismo cinético para a síntese de GOS (vide Figura 4.11), uma vez que o mecanismo de Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) e Boon, Janssen e Van't Riet (2000) não leva em consideração a formação de galacto-oligossacarídeos formados unicamente por galactose. Já o mecanismo apresentado por Vera *et al.* (2011) há uma inconsistência no balanço de massa, porque eles consideram que o dissacarídeo formado por galactose ligada a outra galactose é o mesmo dissacarídeo formado por galactose ligada a glicose e se assume que a quebra de qualquer dissacarídeo produz uma glicose. Além disso, não é possível a separação de galacto-oligossacarídeos formados unicamente por galactose daqueles formados por terminação de glicose.

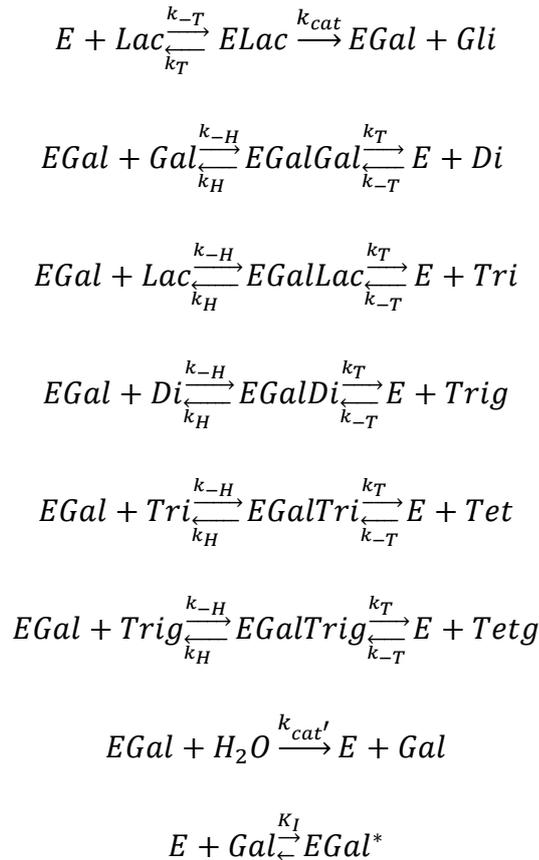


Figura 4.11 - Mecanismo cinético considerando síntese de GOS formado por galactose ligada a glicose e galactose ligadas a outras galactose.

Fonte: Elaborado pela autora.

No mecanismo apresentado na Figura 4.11 Di, Trig e Tetg são dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos formados exclusivamente por galactose, ao passo que Tri e Tet são trissacarídeos e tetrassacarídeos formados por galactose ligada a glicose.

Com o mecanismo proposto neste trabalho a separação de GOS composto exclusivamente por galactose daqueles constituídos por terminação de glicose é possível. Assim o cálculo da Equação 4.1 versus conversão ou tempo pode ser previsto teoricamente. Para o modelo cinético utilizou-se considerações feitas por Vera *et al.* (2011) (vide item 2.5.2.2). Ao derivar as expressões de velocidade de reação (Equações 4.2 a 4.9), utilizou-se a hipótese de pseudo estado-estacionário para a concentração dos complexos enzimáticos ELac, EGal, EGalGal, EGalLac, EGalDi, EGalTri, EGalTrig, EGal* e o balanço de massa sobre a carga total da enzima (E_T).

$$r(\text{Lac}) = E \left[\frac{k_H \times \text{Tri}}{K_{MH}} - \text{Lac} \times \left(\frac{k_{cat}}{K_M} + \frac{\gamma \times k_T}{K_{MT}} \right) \right] \quad (4.2)$$

$$r(\text{Gli}) = E \frac{k_{\text{cat}} \times \text{Lac}}{K_M} \quad (4.3)$$

$$r(\text{Gal}) = E \left[\gamma \left(k_{\text{cat}}' - \frac{k_T}{K_{MT}} \times \text{Gal} \right) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times \text{Di} \right] \quad (4.4)$$

$$r(\text{Di}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times (\text{Gal} - \text{Di}) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (\text{Trig} - \text{Di}) \right] \quad (4.5)$$

$$r(\text{Tri}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times (\text{Lac} - \text{Tri}) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (\text{Tet} - \text{Tri}) \right] \quad (4.6)$$

$$r(\text{Trig}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times (\text{Di} - \text{Trig}) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (\text{Tetg} - \text{Trig}) \right] \quad (4.7)$$

$$r(\text{Tet}) = E \left[\frac{k_T}{K_{MT}} \times \text{Tri} \times \gamma - \frac{k_H}{K_{MH}} \times \text{Tet} \right] \quad (4.8)$$

$$r(\text{Tetg}) = E \left[\frac{k_T}{K_{MT}} \times \text{Trig} \times \gamma - \frac{k_H}{K_{MH}} \times \text{Tetg} \right] \quad (4.9)$$

$$r(E_T) = -k_E \times E_T \quad (4.10)$$

No qual γ , a e b estão representados pelas Equações 4.11 a 4.13.

$$\gamma = \frac{\frac{k_{\text{cat}} \times \text{Lac} + \frac{k_H}{K_{MH}} \times a}{k_{\text{cat}}' + \frac{k_T}{K_{MT}} \times b}}{\quad} \quad (4.11)$$

$$a = \text{Di} + \text{Tri} + \text{Trig} + \text{Tet} + \text{Tetg} \quad (4.12)$$

$$b = \text{Gal} + \text{Lac} + \text{Di} + \text{Tri} + \text{Trig} \quad (4.13)$$

As constantes de equilíbrio para reação de hidrólise (K_{MH}), transgalactosilação (K_{MT}), inibição (K_I) e o balanço de enzima (E) estão apresentadas respectivamente nas Equações 4.14 a 4.18.

$$K_M = \frac{k_{\text{cat}} + k_T}{k_{-T}} \quad (4.14)$$

$$K_{MH} = \frac{k_H + k_T}{k_{-T}} \quad (4.15)$$

$$K_{MT} = \frac{k_H + k_T}{k_{-H}} \quad (4.16)$$

$$K_I = \frac{E \times \text{Gal}}{E_{\text{Gal}}^*} \quad (4.17)$$

$$E = \frac{E_T}{1 + \frac{\text{Gal}}{K_I} + \frac{\text{Lac}}{K_M} + \frac{a}{K_{MH}} + \gamma \times \left(1 + \frac{b}{K_{MT}}\right)} \quad (4.18)$$

K_{MH} e K_{MT} representam respectivamente a afinidade da enzima livre para diferentes substratos e a afinidade do complexo enzima-galactosil pelos diversos açúcares presentes na reação. K_M representa a formação do complexo EGal e Gli. k_H , k_{-H} , k_T e k_{-T} são as constantes de dissociação direta e inversa para as reações de hidrólise e transgalactosilação. Neste modelo foi considerada a inativação da enzima (E_T) durante a reação e a inibição da enzima pela galactose (EGal*). Na equação 4.10, k_E representa a constante de inativação da enzima ao longo da reação.

4.6.1 Ajuste de modelos para síntese de GOS

O modelo proposto por Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) e Boon, Janssen e Van't Riet (2000) foi testado, porém, como esperado, o modelo não se ajustou aos dados experimentais (vide Figura 4.12).

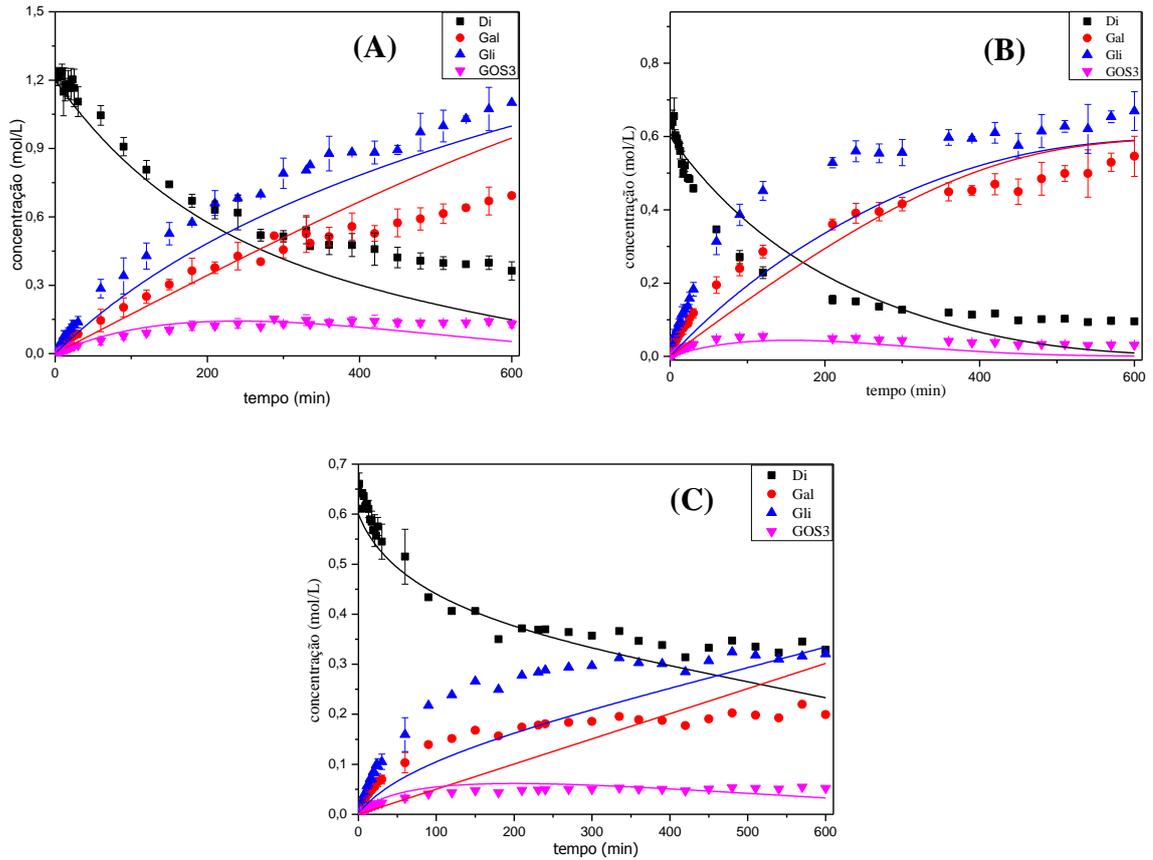
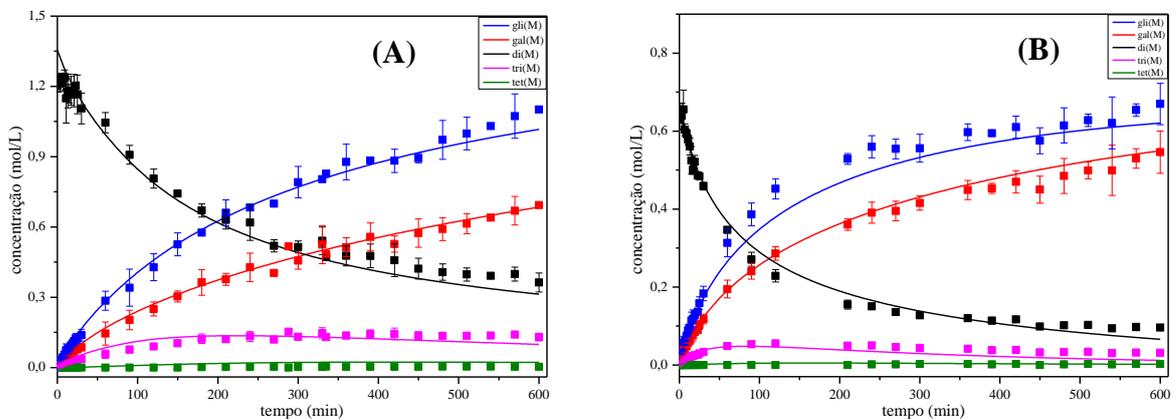


Figura 4.12 - Ajuste do modelo de Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) e Boon, Janssen e Van't Riet (2000). (A) Concentração inicial de lactose de 400 g/L, (B) concentração inicial de lactose de 220 g/L, (C) concentração inicial de lactose de 220g/L, foi utilizado como substrato permeado do soro de leite.

Fonte: Elaborado pela autora.

O modelo de Vera *et al.*, 2011, leva em consideração essa formação e deve se ajustar aos dados experimentais, porém tem um problema de inconsistência no balanço de massa. O modelo proposto neste trabalho se ajustou aos dados experimentais sem chegar a inconsistências do modelo (vide Figura 4.13).



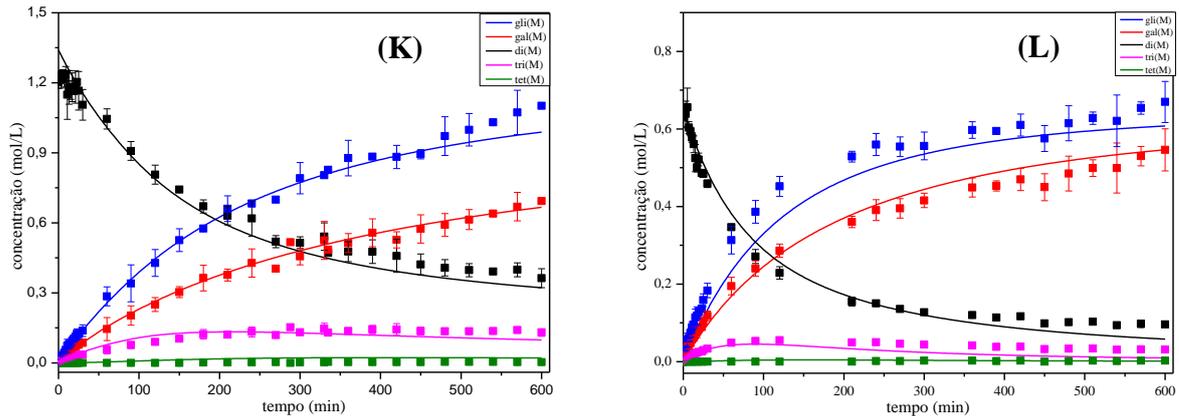


Figura 4.13 - Concentração (mol/L) versus tempo (min) utilizando como substrato lactose pura. (A [Lac]₀ = 400 g/L e B [Lac]₀ = 220 g/L) considerando $k_E = 0$, ajustando os outros parâmetro, (C [Lac]₀ = 400 g/L e D [Lac]₀ = 220 g/L) fazendo $k_E = 0$, $k_{cat} = k_H$ e $k_{cat'} = k_T$, (E [Lac]₀ = 400 g/L e F [Lac]₀ = 220 g/L) considerando a inativação enzimática ($k_E = 1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), (G [Lac]₀ = 400 g/L e H [Lac]₀ = 220 g/L) considerando $k_E = 1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $k_{cat} = k_H$ e $k_{cat'} = k_T$, (I [Lac]₀ = 400 g/L e J [Lac]₀ = 220 g/L) ajustando todos os parâmetros, inclusive k_E , (K [Lac]₀ = 400 g/L e L [Lac]₀ = 220 g/L) fazendo $k_{cat} = k_H$, $k_{cat'} = k_T$ e ajustando os outros parâmetros. Di = Lac + GOS-2 (preto), GOS-3 = tri + trig (magenta) e GOS-4 = tet + tetg (verde), Gli (azul) e Gal (vermelho).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nesse modelo proposto foi levado em consideração a solubilidade da lactose a 40°C, que é de 30 g de lactose por 100 g de água (ROOS, 2009; SCOTTA; VERA; CONEJEROS, 2016). Foi considerada apenas a lactose solúvel no meio reacional, ou seja, concentrações superiores ao seu limite de solubilidade foram desconsideradas na cinética, embora considerada no balanço de massa. Na Figura 4.13 é apresentado o ajuste pelo modelo desenvolvido no presente trabalho, utilizando lactose pura como substrato. De acordo com essa figura percebe-se que ao igualar a velocidade de formação do complexo enzima-galactosil e glicose com a formação dos demais complexos EGal e açúcares presente na reação ($k_{cat} = k_H$) e ainda, igualar a velocidade de liberação da enzima e formação de GOS com a formação da galactose ($k_{cat'} = k_T$), visivelmente não há diferença no ajuste, porém há uma melhora na confiança paramétrica.

Na Figura 4.13A e B Não foi considerado a inativação enzimática ($k_E = 0$), porém foi ajustado todos os outros parâmetros. Já a Figura 4.13C e D também considera $k_E = 0$, mas, foi feito ainda que $k_{cat} = k_h$ e $k_{cat'} = k_T$. Observa-se que o modelo consegue descrever bem o perfil de concentrações experimentais embora haja um pequeno desvio (entre 50 e 300 min) nos ensaios utilizando 220 g/L. Baseado no estudo de inativação enzimática (item 4.3), nas 10 horas de reação aproximadamente 10% da enzima inicial deveria ser inativada. A inativação foi então considerada no ajuste. O modelo de inativação utilizado foi o modelo de 1ª ordem, pois foi o suficiente para descrever a inativação na condição desses ensaios durante 10 h. O ajuste do modelo de inativação foi realizado utilizando dados de estabilidade (Figura

4.2). A Figura 4.13E, F, G e H mostra que a incorporação da cinética de inativação não altera visualmente o comportamento da curva. Testou-se também o modelo de inativação, mas ajustando k_E com os demais parâmetros (Figura 4.13I, J, K e L). A liberação desse parâmetro não levou a um melhor ajuste da curva. Embora a incorporação da inativação enzimática não tenha alterado o desempenho do ajuste, ela é importante para que possam ser simulados processos com maior tempo de reação, como é o caso de um processo em batelada alimentada.

Tabela 4.1- Parâmetros ajustado do modelo proposto, utilizando lactose pura como substrato.

Substrato Lactose										
Parâmetros \pm erro padrão [intervalo de confiança (95%)]										
Fig. 4.13	Σ erro	$E_T.k_{cat}$	$E_T.k_{cat}'$	K_{MH} (mol/L)	K_{MT} (mol/L)	$E_T.k_H$ (mol. L ⁻¹ .min ⁻¹)	$E_T.k_T$	K_I (mol/L)	K_M (mol/L)	k_E (min ⁻¹)
A e B	1,113	22,75 \pm 3,45 $\times 10^4$ [-6,77; 6,77] $\times 10^4$	1,77 $\times 10^4 \pm$ 1,29 $\times 10^9$ [-2,54; 2,54] $\times 10^9$	1,01 $\times 10^6 \pm$ 4,96 $\times 10^2$ [-9,74; 9,74] $\times 10^2$	2,45 $\times 10^7 \pm$ 1,72 $\times 10^2$ [-3,37; 3,37] $\times 10^2$	3,46 $\times 10^3 \pm$ 2,78 $\times 10^3$ [-1,99; 8,92] $\times 10^3$	2,76 $\times 10^3 \pm$ 1,19 $\times 10^3$ [0,419; 5,11] $\times 10^3$	7,79 $\times 10^{-7} \pm$ 3,84 $\times 10^{-2}$ [-7,54; 7,54] $\times 10^{-2}$	7,20 $\times 10^{-3} \pm$ 3,63 $\times 10^2$ [-7,12; 7,12] $\times 10^2$	0
C e D	1,624	$E_T.k_H$	$E_T.k_T$	2,34 $\times 10^{-5} \pm$ 7,86 $\times 10^{-7}$ [2,18; 2,49] $\times 10^{-5}$	1,147 \pm 8,35 $\times 10^{-2}$ [0,983; 1,311]	5,142 $\times 10^{-3}$ \pm 0,00 [5,142; 5,142] $\times 10^{-3}$	1,932 $\times 10^2 \pm$ 0,785 [1,917; 1,948] $\times 10^2$	1,83 $\times 10^{-5} \pm$ 1,99 $\times 10^{-6}$ [1,44; 2,22] $\times 10^{-5}$	3,46 $\times 10^{-5} \pm$ 2,49 $\times 10^{-6}$ [2,97; 3,95] $\times 10^{-5}$	0
E e F	1,110	23,43 \pm 1,33 [20,82; 26,04]	1,56 $\times 10^4 \pm$ 2,28 $\times 10^{-7}$ [1,56; 1,56] $\times 10^4$	1,00 $\times 10^{-6} \pm$ 0,59 $\times 10^{-6}$ [- 0,169; 2,17] $\times 10^{-6}$	2,55 $\times 10^{-7}$ \pm 0,157 $\times 10^{-7}$ [2,24; 2,85] $\times 10^{-7}$	5,14 $\times 10^3 \pm$ 3,18 $\times 10^3$ [-1,097; 11,38] $\times 10^3$	2,66 $\times 10^{-3} \pm$ 0,172 $\times 10^{-3}$ [2,32; 2,99] $\times 10^{-3}$	5,33 $\times 10^{-7} \pm$ 0,167 $\times 10^{-7}$ [5,01; 5,66] $\times 10^{-7}$	5,04 $\times 10^3 \pm$ 0,0182 $\times 10^3$ [5,01; 5,08] $\times 10^3$	1,664 $\times 10^{-4}$
G e H	1,430	$E_T.k_H$	$E_T.k_T$	1,77 $\times 10^{-6} \pm$ 4,01 $\times 10^{-2}$ [-7,87; 7,87] $\times 10^{-2}$	1,248 \pm 0,105 [1,043; 1,454]	5,142 $\times 10^3 \pm$ 0,00 [5,142; 5,142] $\times 10^3$	1,529 $\times 10^2 \pm$ 3,003 $\times 10^5$ [-5,896; 5,899] $\times 10^5$	1,41 $\times 10^{-6} \pm$ 3,19 $\times 10^{-2}$ [-6,27; 6,27] $\times 10^{-2}$	2,59 $\times 10^{-6} \pm$ 5,86 $\times 10^{-2}$ [-0,115; 0,115]	1,664 $\times 10^{-4}$
I e J	1,109	26,91 \pm 5,15 $\times 10^4$ [-10,11; 10,11] $\times 10^4$	1,77 $\times 10^4 \pm$ 4,09 $\times 10^7$ [-8,03; 8,03] $\times 10^7$	1,46 $\times 10^{-6} \pm$ 0,108 [-0,212; 0,212]	2,17 $\times 10^{-7} \pm$ 5,02 $\times 10^{-4}$ [-9,86; 9,86] $\times 10^{-4}$	7,73 $\times 10^{-3} \pm$ 1,28 $\times 10^{-2}$ [-1,75; 3,29] $\times 10^{-2}$	2,58 $\times 10^{-3} \pm$ 1,02 $\times 10^{-3}$ [0,57; 4,58] $\times 10^{-3}$	5,43 $\times 10^{-7} \pm$ 4,02 $\times 10^{-2}$ [-7,88; 7,88] $\times 10^{-2}$	5,65 $\times 10^{-3} \pm$ 4,26 $\times 10^2$ [-8,37; 8,37] $\times 10^2$	3,84 $\times 10^{-4} \pm$ 2,73 $\times 10^{-4}$ [-1,52; 9,20] $\times 10^{-4}$
K e L	1,357	$E_T.k_H$	$E_T.k_T$	2,03 $\times 10^{-6} \pm$ 6,60 $\times 10^{-2}$ [-0,129; 0,129]	1,489 \pm 0,118 [1,257; 1,722]	5,14 $\times 10^3 \pm$ 2,42 $\times 10^5$ [5,094; 5,189] $\times 10^3$	1,72 $\times 10^2 \pm$ 4,477 $\times 10^5$ [-8,789; 8,793] $\times 10^5$	2,25 $\times 10^{-6} \pm$ 7,32 $\times 10^{-2}$ [-0,144; 0,144]	2,31 $\times 10^{-6} \pm$ 7,516 $\times 10^{-2}$ [-0,148; 0,148]	1,55 $\times 10^{-3} \pm$ 4,25 $\times 10^{-4}$ [0,717; 2,39] $\times 10^{-3}$

Fonte: Elaborado pela autora.

Analisando o resultado dos parâmetros, de acordo com a Tabela 4.1, pode-se verificar que ao considerar a inativação enzimática desprezível (Figura 4.13A e B) e ajustar todos os parâmetros (Figura 4.13I e J), não houve confiança nos parâmetros ajustados, sendo k_T o único parâmetro cujo intervalo de 95 % de confiança não passa pelo zero. Isso é reflexo da grande correlação entre os parâmetros e o número pequeno de condições experimentais utilizadas. Ao igualar os parâmetros k_{cat} e k_{cat}' com as constantes de hidrólise e transgalactosilação, respectivamente, ajustando os demais parâmetros (Figura 4.13K e L) e considerar a inativação enzimática, mas sem ajustá-la (Figura 4.13G e H) houve uma redução na confiança da maioria dos parâmetros. Ao considerar a inativação, mas sem ajustá-la (Figura 4.13E e F), houve uma redução no intervalo de confiança da maioria dos parâmetros, com exceção de k_H e K_{MH} . E, sem considerar a inativação ($k_E = 0$), mas fazendo $k_{cat} = k_h$ e $k_{cat}' = k_T$ (Figura 4.13C e D), obtêm-se um modelo com apenas 5 parâmetros e, com confiança em todos os parâmetros. Dessa maneira, utilizaram-se os parâmetros apresentados na Tabela 4.1, Figura 4.13C e D, para simular os dados experimentais quando foi utilizado permeado como substrato, com concentração de lactose de 220 g/L. Porém, o modelo não ajustou aos dados experimentais do permeado (resultados não apresentados), uma vez que na composição do permeado além de lactose, há a presença de sais e pequena quantidade de proteína. Dessa forma, utilizaram-se novamente os parâmetros calculados anteriormente, porém considerando a inativação da enzima e ajustando apenas k_E (vide Figura 4.14). De acordo com a Figura 4.14 percebe-se que os parâmetros da lactose descrevem a cinética da síntese de GOS, quando utilizado permeado como substrato. Dessa forma, a única diferença ao utilizar permeado ao invés de lactose pura é uma grande inativação da enzima (vide Tabela 4.2). A razão para isso pode ser a inibição por proteínas presentes no permeado ou a presença de sais neste substrato (MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985).

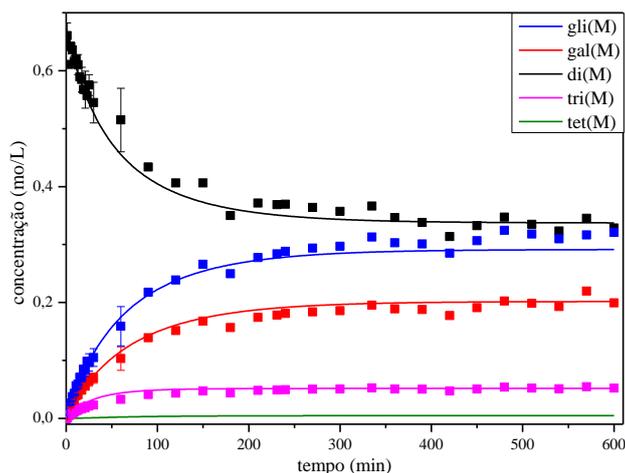


Figura 4.14 - Concentração (mol/L) versus tempo (min) utilizando como substrato permeado do soro de leite. Utilizaram-se os parâmetros de lactose (Figura 4.13C e D), porém ajustou-se apenas k_E .

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.2 - Parâmetro ajustado do modelo proposto, utilizando permeado como substrato.

Permeado				
Σ erro	Parâmetro	Valor	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
$3,95 \times 10^{-2}$	k_E (min^{-1})	$1,11 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-4}$	$[1,08; 1,14] \times 10^{-2}$

Fonte: Elaborado pela autora.

O modelo proposto neste trabalho possibilitou inferir a quantidade de GOS formado exclusivamente de galactose (vide Figura 4.15) e prever o comportamento (Gli/Gal)* (vide Figura 4.16). Contudo, ainda há a necessidade de validar esses resultados a partir de dados analíticos.

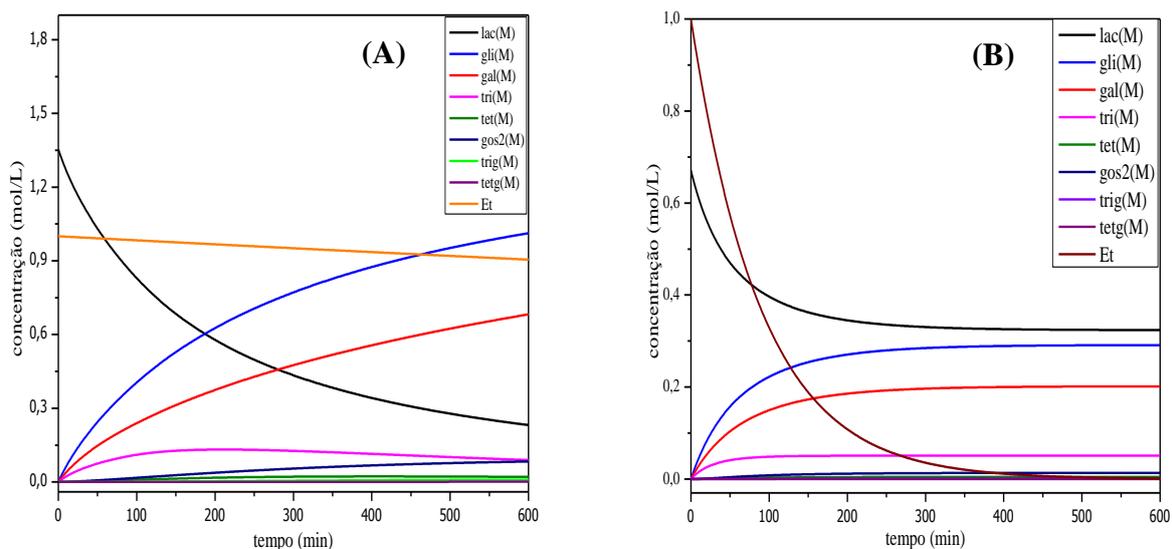


Figura 4.15 - Separação dos galacto-oligosacarídeos. (A) Utilizando lactose como substrato, $[\text{Lac}]_0 = 400$ g/L, ajuste considerando $k_E = 1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e ajustando os outros parâmetros. (B) Utilizou-se permeado como substrato, $[\text{Lac}]_0 = 220$ g/L e foi ajustado apenas o k_E .

Fonte: Elaborado pela autora.

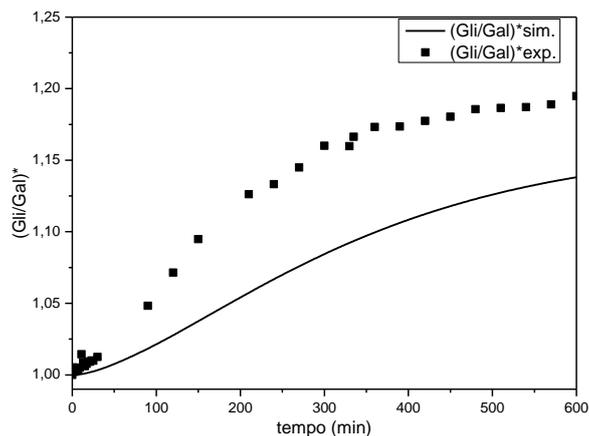


Figura 4.16 - Resíduos de $(Gli/Gal)^*$ versus tempo (min), utilizando $[Lac]_0=400$ g/L. (■) resíduo determinado experimentalmente e (—) resíduo obtido através do modelo proposto, considerando $k_E=1,664 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e ajustando os outros parâmetros.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Respostas do delineamento composto central rotacional

Com o objetivo de se determinar quais as melhores condições de velocidade de síntese e seletividade para a produção de GOS, avaliou-se a influência das variáveis pH, força iônica e temperatura na velocidade inicial de síntese (r_{GOS}) e de hidrólise (r_{Gal}), seletividade (r_{GOS}/r_{Gal}) e atividade total da β -galactosidase ($r_{GOS} + r_{Gal}$) através de um delineamento central composto rotacional.

As respostas do delineamento (y) estão apresentadas nas Tabelas 4.3 e 4.4. Os efeitos quadráticos e de interação não foram significativos e a_1 , a_2 e a_3 são os efeitos exercidos pelas variáveis pH, temperatura e força iônica, respectivamente.

Tabela 4.3 - Valores dos parâmetros com erro padrão (Ep), intervalo de confiança de 95% ($\pm t_{95\%}$), coeficientes de determinação (R^2) e as respostas para cada ensaio (síntese, hidrólise, seletividade e atividade total) com valores máximo (y_{\max}) e mínimo (y_{\min}), desvio padrão do modelo (s_{modelo}) e réplicas ($s_{\text{réplicas}}$), utilizando lactose como substrato.

y y _(max) y _(min) s(modelo) s(réplicas)	a ₀	a ₁	$(\hat{\theta} \pm Ep)$ $[-t^{95\%}_v; +t^{95\%}_v]$		a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	R ²
			a ₂	a ₃								
r(síntese) (0,626 1,180 0,1090 0,1091)*10 ⁻³	(0,91 ± 0,024) × 10 ⁻³ [0,86; 0,97] × 10 ⁻³	(-0,093 ± 0,029) × 10 ⁻³ [-0,16; -0,028] × 10 ⁻³	(0,092 ± 0,029) × 10 ⁻³ [0,028; 0,16] × 10 ⁻³	(0,064 ± 0,029) × 10 ⁻³ [-0,0002; 0,13] × 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	0,669
r(hidrólise) (6,160 2,280 0,7107 0,6848)*10 ⁻³	(39,9 ± 1,59) × 10 ⁴ [36,5; 43,4] × 10 ⁴	(-8,34 ± 1,92) × 10 ⁴ [-12,53; -4,15] × 10 ⁴	(5,96 ± 1,92) × 10 ⁴ [1,77; 10,2] × 10 ⁴	(4,25 ± 1,92) × 10 ⁴ [0,058; 8,44] × 10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	0,735
seletividade 0,2796 0,1818 0,0224 0,0187	(0,236 ± 0,0050) [0,225; 0,247]	(0,024 ± 0,0061) [0,011; 0,038]	(-0,0103 ± 0,0061) [-0,024; 0,0029]	(-0,0096 ± 0,0061) [-0,023; 0,0037]	-	-	-	-	-	-	-	0,642
atividade total (7,280 2,906 0,8064; 0,7925)*10 ⁻³	(49,1 ± 1,80) × 10 ⁴ [45,1; 53,0] × 10 ⁴	(-9,27 ± 2,18) × 10 ⁴ [-14,0; -4,51] × 10 ⁴	(6,88 ± 2,18) × 10 ⁴ [2,12; 11,6] × 10 ⁴	(4,89 ± 2,18) × 10 ⁴ [0,13; 9,6] × 10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	0,733

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.4 - Valores dos parâmetros com erro padrão (Ep), intervalo de confiança de 95% ($\pm t_{95\%}$), coeficientes de determinação (R^2) e as respostas para cada ensaio (síntese, hidrólise, seletividade e atividade total) com valores máximo (y_{\max}) e mínimo (y_{\min}), desvio padrão do modelo (s_{modelo}) e réplicas ($s_{\text{réplicas}}$), utilizando permeado como substrato.

Y $y_{(\max)}$ $y_{(\min)}$ s(modelo) s(réplicas)	a_0	a_1	$(\hat{\theta} \pm Ep)$ $[-t_{95\%}^v; +t_{95\%}^v]$		a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	R^2
			a_2									
r(síntese) (114,329 76,659 9,423 8,502) $\times 10^{-5}$	$(99,6 \pm 2,11) \times 10^{-5}$ [95,0; 104,2] $\times 10^{-5}$	$(-5,58 \pm 2,55) \times 10^{-5}$ [-11,14; -0,021] $\times 10^{-5}$	$(5,97 \pm 2,55) \times 10^{-5}$ [0,42; 11,53] $\times 10^{-5}$		$(1,66 \pm 2,55) \times 10^{-5}$ [-3,89; 7,22] $\times 10^{-5}$	-	-	-	-	-	-	0,471
r(hidrólise) (58,028 34,625 8,041 8,601)	$(43,6 \pm 1,79) \times 10^{-4}$ [39,6; 47,5] $\times 10^{-4}$	$(-3,63 \pm 2,18) \times 10^{-4}$ [-8,37; 1,12] $\times 10^{-4}$	$(1,62 \pm 2,18) \times 10^{-4}$ [-3,12; 6,37] $\times 10^{-4}$		$(2,64 \pm 2,18) \times 10^{-4}$ [-2,11; 7,38] $\times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-	0,286
seletividade (27,578 18,959 2,626 2,518) $\times 10^{-2}$	$(231,9 \pm 5,87) \times 10^3$ [219,2; 44,74] $\times 10^3$	$(6,83 \pm 7,11) \times 10^3$ [-8,66; 22,32] $\times 10^3$	$(6,47 \pm 7,11) \times 10^{-3}$ [-9,02; 21,9] $\times 10^3$		$(-10,7 \pm 7,11) \times 10^3$ [-26,2; 4,8] $\times 10^{-3}$	-	-	-	-	-	-	0,251
atividade total (69,029 43,706 8,842 9,386)	$(53,5 \pm 1,98) \times 10^{-4}$ [49,2; 57,8] $\times 10^{-4}$	$(-4,2 \pm 2,4) \times 10^{-4}$ [-9,4; 1,03] $\times 10^{-4}$	$(2,22 \pm 2,39) \times 10^{-4}$ [-2,99; 7,44] $\times 10^{-4}$		$(2,8 \pm 2,4) \times 10^{-4}$ [-2,4; 8,02] $\times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-	0,306

Fonte: Elaborado pela autora.

Na faixa da região estudada de acordo com a tabela 4.3 e 4.4 pode-se perceber que o pH e temperatura exercem efeito na velocidade de síntese do GOS, utilizando como substrato lactose ou permeado. Porém o efeito da força iônica não é conhecido, por causa do seu intervalo de confiança que passa pelo zero. Nas Figuras 4.17 e 4.25 são apresentadas as superfícies de velocidade inicial de síntese de GOS em função do pH e temperatura (T), utilizando como substrato lactose pura e permeado com concentração de 220 g/L. Nas Figuras 4.18 a 4.20 são apresentadas as superfícies de velocidade inicial de hidrólise da lactose em função do pH, temperatura (T) e força iônica (I), utilizando como substrato lactose pura (220 g/L). Nas Figuras 4.22 a 4.24 são apresentadas as superfícies de atividade total da β -galactosidase em função do pH, temperatura (T) e força iônica (I), utilizando como substrato lactose pura.

De acordo com estas figuras percebe-se que as velocidades de reação, tanto de síntese quanto de hidrólise, aumentam com o aumento da temperatura e diminuição do pH. Dessa forma, ao maximizar a síntese conseqüentemente a hidrólise também será maximizada. Porém, para a seletividade ao utilizar lactose pura como substrato (vide Figura 4.21), verificou-se que o efeito da temperatura e força iônica não é conhecido, devido à falta de confiabilidade em seus intervalos de confiança e que a seletividade aumenta com o aumento do pH. Dessa forma, pode-se perceber que ao aumentar a seletividade não ocorrerá aumento na atividade de síntese e de hidrólise.

De acordo com a Tabela 4.3 a variância do erro foi muito grande a ponto dos efeitos da temperatura, força e pH, para a velocidade de hidrólise, seletividade e atividade total, não poderem ser calculadas.

Conforme os resultados obtidos no DCCR e de estabilidade enzimática discutidos no item 4.3, pode-se perceber que ao manter as velocidades de síntese e hidrólise alta implica em gastar mais enzimas, uma vez que em altas temperaturas a enzima perde rapidamente sua estabilidade. Assim, regiões boas para se trabalhar depende da otimização do processo em termos de custos de operação e de enzima.

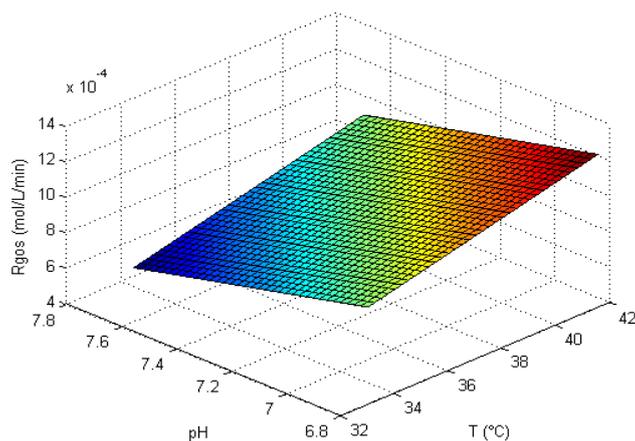


Figura 4.17 - Velocidade de síntese de GOS em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

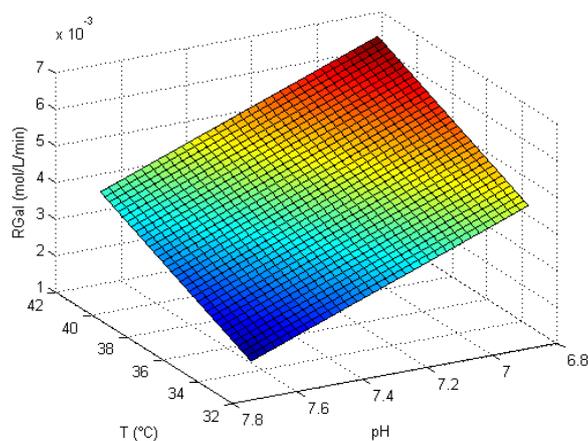


Figura 4.18 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH.

Fonte: Elaborado pela autora.

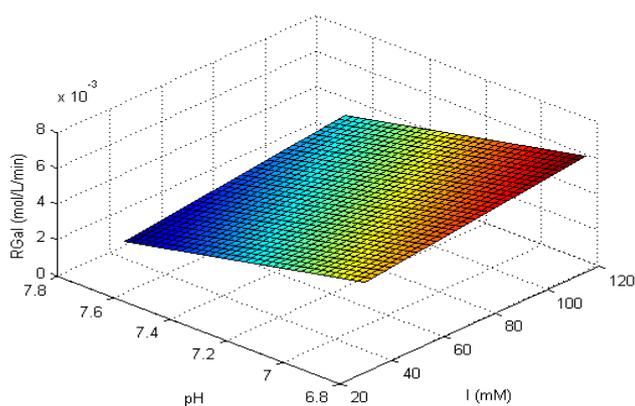


Figura 4.19 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da força iônica (I) (mM) e pH.

Fonte: Elaborado pela autora.

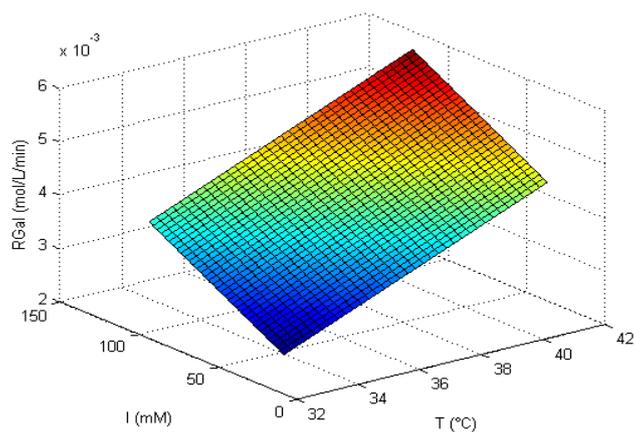


Figura 4.20 - Velocidade de hidrólise da lactose (220 g/L) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e força iônica (I) (mM).

Fonte: Elaborado pela autora.

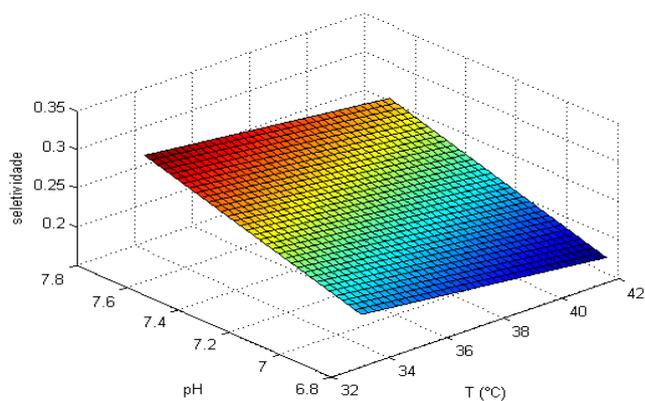


Figura 4.21 - Seletividade em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

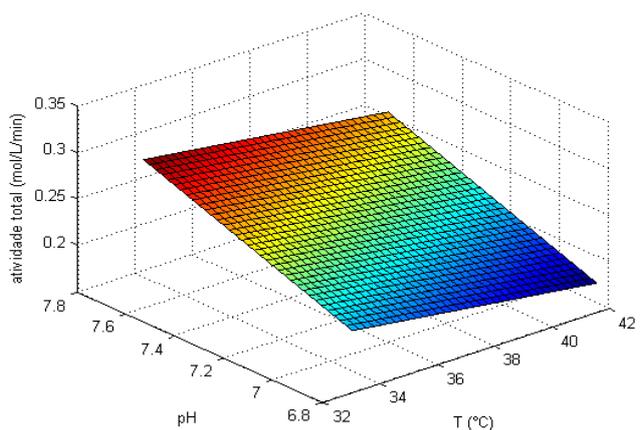


Figura 4.22 - Atividade total em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

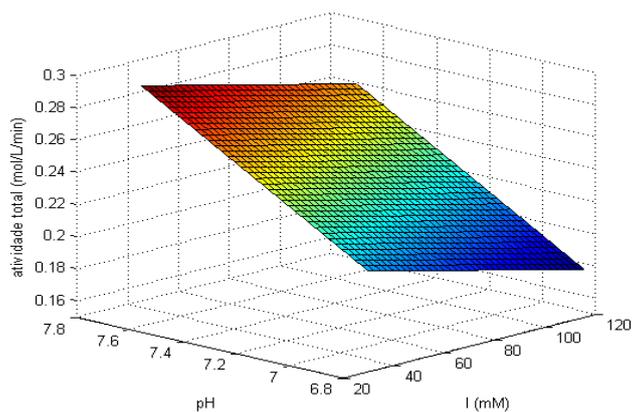


Figura 4.23 - Atividade total em função da força iônica (I) (mM) e pH, utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

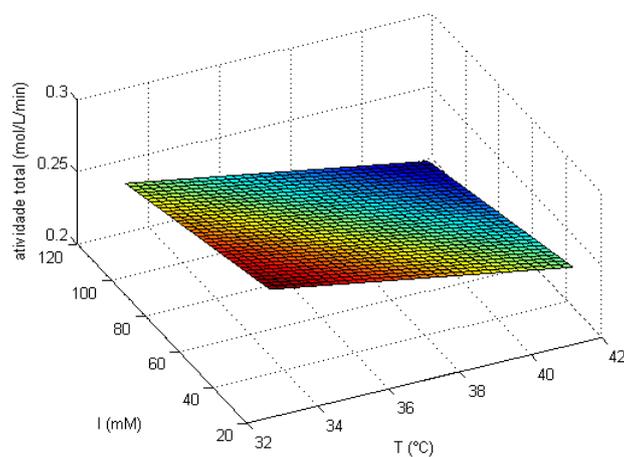


Figura 4.24 - Atividade total em função da temperatura (°C) e força iônica (I) (mM), utilizando lactose pura (220 g/L) como substrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

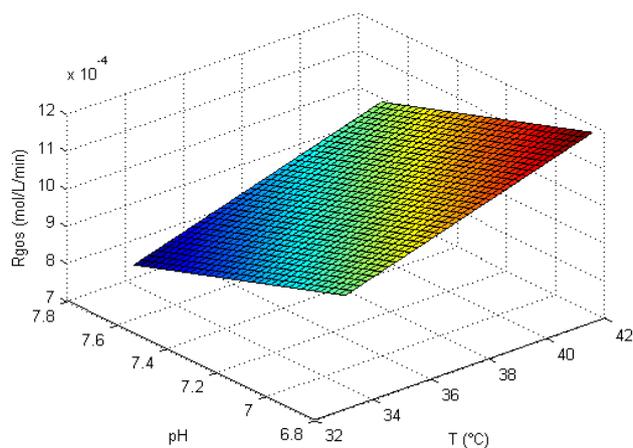


Figura 4.25 - Velocidade de síntese de GOS, utilizando permeado (220 g/L lactose) em função da temperatura (°C) e pH.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 CONCLUSÕES

No decorrer da elaboração deste trabalho foram realizados estudos para compreender a produção enzimática de galacto-oligosacarídeos a partir do substrato lactose pura ou presente em permeado do soro de leite, utilizando a enzima β -galactosidase livre oriunda de *K. lactis*.

O estudo da inativação da *K. lactis* em função de pH, temperatura e força iônica mostrou que dos modelos testados, o que encaixa melhor aos dados experimentais é o modelo com intermediário inativo reversível. Contudo, esse modelo não é capaz de prever comportamentos como dos ensaios de força iônica de 25, 100 e 200 mM. Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado de modelos que consigam prever esses comportamentos.

O modelo cinético proposto se ajusta tão bem quanto o modelo proposto por Vera *et al.* (2011), não apresenta inconsistências no balanço de resíduos de glicose por galactose e possui poucos parâmetros. Além disso, possibilita a estimação da fração de GOS formados somente por galactose, o que permite discriminar os dissacarídeos em galactobiose (que têm propriedades prebióticas) e lactose. Embora o modelo se encaixe aos dados experimentais, mais ensaios devem ser realizados para ajustar melhor os parâmetros (tanto com lactose quanto utilizando permeado do soro como substrato).

O rendimento de GOS é maximizado em meios com alta concentração de lactose, e nesses meios a razão síntese hidrólise também é maior. A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando como substrato o permeado de soro, não produz GOS-4, provavelmente porque ele contém sais minerais e proteínas (pequenas quantidades), que podem inibir a atividade da enzima β -galactosidase.

A atividade da enzima é menor e a seletividade é maior quando se utiliza permeado do soro como fonte de lactose em comparação à utilização de lactose pura.

O delineamento composto central rotacional permitiu observar que a velocidade de síntese de GOS é maximizada, com o aumento da temperatura e a diminuição do pH, quando utilizado lactose e permeado como substrato para a β -galactosidase de *K. lactis*. O aumento da temperatura é interessante para aumentar a solubilidade da lactose, porém a enzima *K. lactis* rapidamente perde sua estabilidade em temperaturas elevadas. Para a lactose a velocidade inicial de hidrólise também é maximizada com o aumento da

temperatura e da força iônica e a diminuição do pH. A atividade total também aumenta com a diminuição do pH. Já a seletividade é maximizada com o aumento do pH.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ajustar modelo cinético a partir de ensaios em batelada para diversas concentrações de lactose e permeado de soro, utilizando condições (pH, T, I) a serem escolhidas baseando-se na estabilidade da enzima, atividade enzimática, razão entre as velocidades de síntese e hidrólise (seletividade) e solubilidade da lactose.

Avaliar se o aumento da força iônica, devido aos sais presentes no permeado, é o responsável pelo aumento da seletividade.

Efetuar batelada alimentada e utilizar controle ótimo para otimizar alimentação de permeado do soro e enzima.

Simular diferentes processos (batelada e batelada alimentada) avaliando seletividade, produtividade e consumo de enzima, buscando um processo otimizado.

Utilizar enzimas de outras fontes para avaliar a seletividade na produção de GOS.

Utilizar enzima imobilizada para verificar o rendimento de GOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3A Business Consulting. **Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives**, 2007.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Queijos no Brasil. **ABIQ**. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/nutricao_queijosbrasil_ant.asp>. Acesso em: 06 mar. 2015.

ABREU, LR. **Tecnologia de leite e derivados**. Textos acadêmicos, Editora UFLA/FAEPE, Lavras-MG, p. 215, 1999.

ADAMCZAK, M.; CHARUBIN, D.; BEDNARSKY, W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. **Chemical Papers**, v. 63, n. 2, p. 111-116, 2009.

AEHLE, W. **Enzymes in industry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 144, 2004.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications**. WILEY: New York, 2000.

ALANDER, M.; MATTO, J.; KNEIFEL, W.; JOHANSSON, M.; KOGLER, B.; CRITTENDEN, R.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Effect of galactooligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 817-825, 2001.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidades de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. 1^a ed. Barueri, SP: Manole Editora, 2003.

AYMARD, C.; BELARBI, A. Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 612-618, 2000.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 323-333, 2006.

BARTOLOZZI, A.; SEEBERGER, P. H. New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 587-592, 2001.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: **Biochemical Engineering**. New York: Editora Marcel Dekker, 1997, 716 p.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN DER PADT, A. Modelling and parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 558-567, 1999.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIE, B.; BROUNS, F.; BORNET, F. R. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1658-1664, 2004.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 3, p. 204-209, 1993.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, M. D. S. Resolução RDC nº. 205. **Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano**. Brasília, 2006.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochemical Journal**, v. 19, n. 2, p. 338-339, 1925.

BROUNS, F.; VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 1, p. 22-33, 2000.

BUCKE, C. Oligosaccharide synthesis using glycosidases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 217-220, 1996.

CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; ÁVILA, M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 81-87, 2011.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CAVAILLE, D; COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 22, p. 55-64, 1995.

CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, BH. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.

CHEN, C. S.; WU, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 6, p.1092-1092, 1998.

CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes: Research and Development**. New York: John Wiley & Sons, p. 71, 1978.

CHO, YJ; SHIN, HJ; BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 24, p. 2107-2111, 2003.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology Bioengineering**, 89, p. 434-443, 2005.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation**. 20 ed. Washington, DC, USA, 1999.

COTTA, J. A. O; SALAMI, F. H.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de nitrogênio kjeldahl total. **Revista Analytica**, n. 1, 2007.

CRITTENDEN, R. G; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 353-361, 1996.

CROUT, D.H.; VIC, G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 1, p. 98-111, 1998.

CRUZ, R.; D'ARCADIA CRUZ, V.; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M. D.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. S.; ARDILES, E; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 165-171, 1999.

CUI, F.; WAN, C.; LI, Y.; LIU, Z.; RAJASHEKARA, G. Co-production of lactic acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1278-1286, 2012.

DALLAS, D. C.; WEINBORN, V.; BELL, J. M. L. N. M.; WANG, M.; PARKER, E. A.; GUERRERO, A.; HETTINGA, K. A.; LEBRILLA, C. B.; GERMAN, J. B.; BARILE, D. Comprehensive peptidomic and glycomic evaluation reveals that sweet whey permeate from colostrum is a source of milk protein-derived peptides and Oligosaccharides. **Food Research International**, v. 63, p. 203-209, 2014.

DALLAS, P. O uso de derivados de soro de leite em aplicações em produtos de consumo. **Indústria de Laticínio**, p. 60-61, 1999.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2738-2743, 2013.

DE WIT, J. N. **Lecturer's handbook on whey and whey products**. Brussels: European Whey Products Association, 2001.

DELZENNE, N. M.; ROBERFROID, M. R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1994.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. Longman Group Limited: London, 3^a ed., 1979.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. Springer, India, 2008.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 10, p. 2667-2675, 2009.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer, 5^a ed., p. 454, 2004.

FAI, A. E. C.; SILVA, J. B.; ANDRADE, C. J.; BUTION, M. L, PASTORE, G. M. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 03, n. 4, p. 343-350, 2014.

FAI, A. E. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; GHISELLI, G.; PASTORE, G. M. Sequential optimization approach for prebiotic galactooligosaccharides synthesis by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Food science and technology**, v. 63, p. 1214-1219, 2015.

FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. Prentice Hall: New Jersey, 2^a ed., p. 838, 1992.

FOX, P. F. **Lactose: Chemistry and properties**. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**, Springer: New York, 3rd ed., vol. 3, p. 1-15, 2009.

FOX, P.; GUINEE, T.; COGAN, T.; MCSWEENEY, P. **Fundamentals of Cheese Science**. USA: Aspen Publishers Inc., 2000.

FREITAS, F. F. **Otimização do Processo de Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de Sódio com Gelatina e Glutaraldeído**. Tese - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 220, 2007.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 263-271, 1996.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 426-430, 2006.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275. 2004.

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; TYMCZYSZYN, E. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 374-381, 2013.

GOMEZ, J. L.; BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, A. M.; GÓMEZ, M.; MURCIA, M. D. Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 127, n. 1-3, p. 47-57, 2007.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

GOSLING, A.; ALFTRÉN, J.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Facile Pretreatment of *Bacillus circulans* β -Galactosidase Increases the Yield of Galactosyl Oligosaccharides in Milk and Lactose Reaction Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11570-11574, 2009.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 307-318, 2010.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3366-3372, 2011.

GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. Development of a process for the production and purification of alpha- and beta-galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 648-656, 2007.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUERRERO, C.; VERA, C.; PLOU, F.; ILLANES, A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 206-212, 2011.

HILLIAM, M. A. **The European Dairy Industry**. Leatherhead Food RA, 1990.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, 2003.

HOLSINGER, V. H. Physical and Chemical Properties of Lactose. In: Lactose, water, Salts and Vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v. 3, p. 1-38, 1997.

HUBER, R. E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**, v. 15, p. 1994-2001, 1976.

HUERTA, L. M.; VERA, C.; GUERRERO, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Synthesis of galactooligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 245-252, 2011.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. In: ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. *Enzyme Reactors*. Springer: Netherlands, p. 205-251, 2008.

ILLANES, A. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 1-28, 2011.

IWASAKI, K.; NAKAJIMA, M.; NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 69-76, 1996.

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

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

KIM, J.; LEE, D.; LEE, J. Production of galactooligosaccharide by beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus var lactis* OE-20. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 337-340, 2001.

KLEIN, M. P.; SANT'ANA, V.; HERTZ, P. F.; RODRIGUES, R. C.; NINOW, J. L. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

LABCONCO. **A guide to Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus**, p. 3-10, 1998.

LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus sp. Strain T2*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 241-252, 2002.

LADERO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, B. C.; VIAN, A.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus sp. strain T2*: Comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p.14-24, 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LEE, Y. J.; KIM, C. S.; OH, D. K. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyce lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 787-793, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 1986.

LISBOA, C. R. **Síntese enzimática de galactooligosacarídeos a partir de lactose e soro de leite**. Dissertação [Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos] - Universidade Federal do Rio Grande; 2008.

LÓPEZ-LEIVA, M. H.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 757-762, 1995.

LUDI KHUYZE, L.; OOMS, V.; WEEMAES, C.; HENDRICKX, M. Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from *broccoli (Brassica oleracea L. Cv. Italica)*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1794-1800, 1999.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 305-344, 2008.

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

MANUCCI, F. **Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate**. MSc Thesis. Dublin Institute of Technology, 2009.

MARÍN-NAVARRO, J.; TALENS-PERALES, D.; OUDE-VRIELINK, A; CAÑADA, FJ; POLAINA, J. Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 989-998, 2014.

MARIOTTO, J. R. **Enzimas**. Relatório Técnico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 7, p. 540-544, 2008.

MATEO, C.; MONTI, R.; PESSELA, C. C. B.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUISAN, M. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1259-1262, 2004.

MAUGARD, T.; GAUNT, D.; LEGOY, M. D.; BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galactooligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 8, p. 623-629, 2003.
MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1334-1340, 2006.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v. 50, n. 12, p. 438-446, 1992.

MIZUBUTI, M. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 80-94, 1994.

MOFFAT, G.; WILLIAMS, RA.; WEBB, C.; STIRLING, R. Selective Separations in Environmental and Industrial Processes Using Magnetic Carrier Technology. **Minerals Engineering**, v. 7, n. 8, p. 1039-1056, 1994.

MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. **Modern biotechnology: connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals**, Wiley: New York, 2009.

MOZAFFAR, A.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Food Science**, v. 50, p.1602-1606, 1985.

- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p.587-597, 2007.
- NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1245-1251, 2002.
- NELLES, O. **Nonlinear System Identification**. 1st. ed. Springer, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, ed. 5, 2011.
- NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; DOURADO, F. O. Q.; OLIVEIRA, J. M. B.; CARVALHO JR, L. B.; TEIXEIRA, J. A. Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxanepolyaniline particles. **Reactive and Functional Polymers**, v. 69, n. 4, p. 246-251, 2009.
- NESSMITH, W. B. Jr; NELSEN, J. L.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; BERGSTRÖM, J. R. Effects of substituting deproteinized whey and(or) crystalline lactose for dried whey on weanling pig performance. **Animal Science Journal**, v. 75, n. 12, p. 3222-3228, 1997.
- NIH. **National Institutes of Health (NIH)**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lactose-intolerance#statistics>>. Acesso em: 01 mar. 2016.
- OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I.B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, mar./abr., 2012.
- OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. Livro: Ed. Atheneu. São Paulo, 2009.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4026-4030, 1995.
- ONISHI, N; TANAKA, T. Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmaotmyces elviae* CBS8119, **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p.136-139, 1998.
- ONISHI, N; YOKOZEKI, K. Gluco-oligosaccharide and galactooligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IFO879. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 124-127, 1996.

Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). **Environmental performance of large ruminant supply chains** - Guidelines for assessment, 2015.

OSMAN, A.; TZORTZIS, G.; RASTALL, R.; CHARALAMPOPOULOS, D. A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 140-148, 2010.

OTIENO, D.O. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 471-482, 2010.

PARK, A. R.; OH, D.K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1279-1286, 2010.

PELEG, M.; PENCHINA, C. M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 159-172, 2000.

PESSELA, B. C. C; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n. 2, p.310-315. 2007.

PETROVA, V. Y.; KUJUMDZIEVA, A. V. Thermotolerant yeast strains producers of galacto-oligosaccharides. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 1612-1619, 2010.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis. Part I: State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 9, p. 1019-1025, 1987a.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of Oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process. Part II: experimental. **Biotechnol Bioengineering**, v. 30, n. 9, p. 1026-1031, 1987b.

RENUKA, B.; PRAKASH, M.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharides based low calorie gulab jamun: studies on the texture, microstructure and sensory attributes. **Journal of Texture Studies**, v. 41, p. 594-610, 2010.

- RIBEIRO, E. J. **Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada**. Tese - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1989.
- RIZVI, A. F.; TONG, C. H. A critical review - fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 1-7, 1997.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, 2007.
- RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, v.145, p. 388-394, 2014.
- ROOS, Y. H. **Solid and liquid states of lactose**. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Lactose, water, salts and minor constituents. Springer: New York, v. 3, p. 17-33, 2009.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 717-723, 1987.
- SAKO, T.; MATSUMOTO, K; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.
- SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n.7, p. 558-567, 1998.
- SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 682-689, 2009.
- SANZ VALERO, J. I. **Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation**. Tese [Doutorado em Engenharia Química e Biomolecular] - Ohio State University; 2009.
- SANZ, M. L.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography–mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 56, n. 9-10, p. 617-622, 2002.
- SCOTTA, F.; VERA, C.; CONEJEROS, R. Technical and economic analysis of industrial production of lactose-derived prebiotics with focus on galacto-oligosaccharides. **Lactose-Derived Prebiotics**, p. 261-284, 2016.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. John Wiley and Sons: New York, 1993.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica. **2nd International Workshop|Advances in Cleaner Production**. Key elements for a sustainable world: energy, water and climate change, São Paulo-Brazil, 2009.

SHALINI, G. R.; SHIVHARE, U. S.; BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 147-153, 2008.

SHUKLA, T. P. β -galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem. **Critical Reviews in Food Technology**, v. 5, n. 3, p. 325-356, 1975.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de Leite Bovino em Sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SILVA, P. H. F. Leite. Aspectos de Composição e Propriedades. **Química nova na escola**. São Paulo, n. 6, nov., 1997.

SMITH *et al.*, E. L. **Bioquímica: Aspectos Gerais**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1985.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SYMONS, G. E.; MOREY, B. The Effect of Drying Time on the Determination of Solids in Sewage and Sewage Sludges. **Sewage Works Journal**, v. 13, n. 5, p. 936-939, 1941.

TOMOMATSU, H. Health-effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, n.10, p.61-65, 1994.

TORRES, D. P. M.; GONÇALVES, M. P. F.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454, 2010.

TUFVESSON, P.; FU, W.; JENSEN, J. S.; WOODLEY, J. M. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 3-11, 2010.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. (Ed). **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**. New York: Springer, p. 207-244, 2009.

URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; WILSON, L.; ILLANES, A., PLOU, FJ. Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081-1087, 2013.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Kinetic modeling of food quality: A critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 1, p. 144-158, 2008.

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 3, p.188-194, 2012.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A.; CONEJEROS, R. A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 2270-2279, 2011.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A.; CONEJEROS, R. Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase using optimal control strategy. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 1, p. 59-67, 2014.

VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 4, 8, 25, 2009.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; São Paulo: Universidade de São Paulo, 1976. 780 p.

WEIBULL, W. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics-Transactions of the Asme**, v. 18. n. 3, p. 293-297, 1951.

WHITE, J. S. Sugar, special sugars. In: **Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology**. doi:10.1002/0471238961.1916050323080920.a01, 2000.

WONG, N. P.; LACROIX, D. E.; MCDONOUGH, F. E. Minerals in Whey and Whey Fractions. **Journal Dairy Science**, v. 61, n. 12, p. 1700-1703, 1978.

XUE, R.; WOODLEY, J. M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 183-195, 2012.

YANAHIRA, S.; SUGURI, T.; YAKABE, T.; IKEUCHI, Y., HANAGATA, G., DEYA, E. Formation of oligosaccharides from lactitol of *Aspergillus oryzae* β -D-galactosidase. **Carbohydrate Research**, v. 232, n. 1, p. 151-159, 1992.

YANG, S. T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications**. Elsevier, 2007.

YANG, ST.; OKOS, M. R. Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized β -galactosidase in Plug-Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 33, n. 7, p. 873-885, 1989.

ZHU, Y; KOUTCHMA, T.; WARRINER, K.; SHAO, S.; ZHOU, T. Kinetics of patulin degradation in model solution, apple cider and apple juice by ultraviolet radiation. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 4, p. 291-303, 2013.