

MICROENCAPSULAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES FORMAS POR *SPRAY-DRYING*

RIBEIRO, A. A. P¹; LAFIA, A. T.¹; GUIDINI, C. Z.¹; FALLEIROS, L. N. S. S.¹;
ZOTARELLI, M. F.¹

¹Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Patos de Minas, MG 38700-126, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da enzima β -galactosidase microencapsulada em *spray-dryer*, a partir de β -galactosidase em diferentes formas - livre (extrato enzimático), intracelular e comercial. A fonte da enzima comercial é de *Bacillus licheniformis* e as demais *Kluyveromyces marxianus*. Utilizou-se alginato como material de parede na microencapsulação da β -galactosidase na sua forma livre e comercial. Este estudo teve como foco verificar o impacto causado na atividade enzimática da β -galactosidase devido ao processo de microencapsulação em suas diferentes formas. As enzimas foram avaliadas quanto a sua atividade enzimática antes e após o processo. Realizou-se a fermentação do microrganismo *Kluyveromyces marxianus* para obtenção das células com atividade enzimática e o extrato enzimático clarificado (enzima livre). Para o processo de microencapsulação utilizou-se *spray-dryer* com bico de atomização de 1,2mm, fluxo de entrada de ar de 1,65m³.min⁻¹; temperatura do ar de secagem de 90°C; fluxo da solução de alimentação igual a 0,600L.h⁻¹; taxa de atomização 40L.min⁻¹ e a temperatura de saída de 60±2°C. A atividade da β -galactosidase microencapsulada diminuiu em todos os estudos, a atividade enzimática relativa foi de 28,3; 0,36 e 0% para a enzima microencapsulada intracelular, comercial e livre, respectivamente. Conclui-se que a microencapsulação da célula é uma boa forma de manutenção da atividade enzimática de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*.

Palavras-chave: lactase, alginato; imobilização, enzimas, *Kluyveromyces marxianus*, *Bacillus licheniformis*.

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma enzima de ampla aplicabilidade na indústria de alimentos e farmacêutica. A sua função de maior destaque é a hidrólise da lactose, um dissacarídeo de baixo poder adoçante, abundante no leite e no soro de leite, baixa solubilidade, forte tendência em absorver odores e sabores, higroscópica - o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó (PESSOLA *et al.*, 2003; HARJU *et al.*, 2012). Existem duas grandes restrições associadas ao uso da lactose: grande parte da população mundial apresenta intolerância à absorção da lactose o que leva a uma séria restrição no uso deste açúcar e os problemas no tratamento de

águas residuárias das indústrias de laticínios, responsável pelo aumento de demanda bioquímica de oxigênio, devido à sua baixa biodegradabilidade (SANTOS *et al.*, 1998; PAKIZEH e NAMVAR-MAHBOUB, 2011).

Deste modo, a grande importância da enzima β -galactosidase se deve ao fato de ser capaz de hidrolisar a lactose, por meio da via enzimática, método promissor pois não gera subprodutos negativos, como nos processos químicos. Por meio da hidrólise, é possível desenvolver novos produtos com ausência da lactose em suas composições, acarretando maior disponibilidade de nutrientes aos produtos lácteos e viabilizando o consumo de produtos lácteos por consumidores intolerantes à lactose. Além disso, é possível conferir maior doçura aos produtos com ausência de lactose, pois os açúcares resultantes da hidrólise possuem maior poder adoçante, possibilitando sua utilização como edulcorantes nos xaropes, gelados e outros produtos lácteos bem como em alimentos não lácteos (GÄNZLE, HAASE e GELLEN, 2008).

A enzima β -galactosidase hidrolisa a ligação β (1-4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose. Além disto a β -galactosidase catalisa também a reação de transgalactosilação; dando origem a compostos como lactulose e galacto-oligossacarídeos (GOS) que atuam como prebióticos no organismo (SHEN *et al.*, 2011; SANDER *et al.*, 2016).

A β -galactosidase pode ser obtida de diferentes fontes como microrganismos, plantas e animais. A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta clássicas aplicações na indústria, como produção de biomassa, bioetanol e enzimas, oferecendo vantagens como rendimento, aceitabilidade como microrganismo seguro e alta atividade da enzima β -galactosidase quando comparada com outras leveduras (LANE e MORRISSEY, 2010).

A microencapsulação é uma técnica usada para revestir materiais que estejam na sua forma líquida, sólida ou gasosa. Nesse processo, é utilizado diversos tipos de polímeros como material de revestimento (ou material de parede) do núcleo (material a ser revestido). Esse processo possui inúmeras aplicações em diversas áreas, nas indústrias de alimentos é usada para encapsular aditivos (corantes, adoçantes, óleos essenciais, *flavors*), microrganismos, ácidos graxos, enzimas, entre outros produtos para as mais diversas finalidades (AZEREDO, 2005, GHARSALLAOUI *et al.*, 2007, GHARSALLAOUI *et al.*, 2012, KHAN *et al.*, 2011).

Spray-drying é um método físico de microencapsulação o qual consiste em um processo em que o líquido é disperso em uma corrente de gás aquecido, onde partículas do fluido atomizado em contato com o gás quente secam quase instantaneamente, obtendo-se um produto em pó. O seu uso em produtos termossensíveis é limitado, devido à alta temperatura atingida em seu interior (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). O produto obtido deve possuir boa qualidade, baixa atividade de água, desaglutinação, facilidade de armazenamento e que proteja o material ativo contra reações indesejadas (CARNEIRO, *et al.*, 2013). Uma das vantagens do *spray-drying* é a facilidade de ajuste das características das micropartículas, alterando os parâmetros operacionais do equipamento (YE *et al.*, 2010).

A microencapsulação de enzimas é um método atraente capaz de propiciar maior estabilidade, além de facilitar seu armazenamento e transporte (AMERI, MAA, 2006, NAMALDI, ÇALIK, *et al.*, 2006). Este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto causado na atividade enzimática pelo processo de microencapsulação da enzima β -galactosidase em diferentes formas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e enzima

Para a microencapsulação da β -galactosidase intracelular e livre utilizou-se o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 com atividade de β -galactosidase, levedura proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada.

A Enzima comercial cuja fonte é *Bacillus licheniformis* foi cedida gentilmente pela Cooperativa Central Mineira de Laticínios – Cemil, Patos de Minas.

Substratos

O substrato utilizado no presente trabalho para fermentação do microrganismo foi cedido pela empresa Lactosul Indústria de Laticínios LTDA, Piranhas/GO. O permeado de soro em pó da marca CENTRO OESTE LATICÍNIOS foi utilizado como principal fonte de carbono como lactose na formulação dos meios de cultura para crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537.

Para determinação da atividade catalítica da enzima β -galactosidase utilizou-se solução de lactose (PA) $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ obtido a partir de tampão láctico recomendado pela NOVO NORDISK (1993).

Fermentação

Para o cultivo da levedura *K. marxianus* foram utilizados dois meios a base de permeado de soro de leite com concentrações baseadas em Pinheiro *et al.* (2003) e Santiago *et al.* (2004).

Conforme Falleiros (2016), o meio inóculo foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 5,5. A cultura foi mantida a 30°C , 120rpm por 14h em uma incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE – 421) e o meio de fermentação foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 7,0. A fermentação foi conduzida mantendo a cultura a 30°C , 120 rpm por 24 h em incubadora refrigerada com agitação. Ambos os meios foram esterilizados em autoclave antes de serem utilizados e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto a lactose, que foi proveniente do permeado de soro de leite.

O caldo fermentado foi centrifugado por 10min a 5000rpm, o decantado foi ressuspensionado em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio 0,1M pH 7,0 para obter uma suspensão celular com $75\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (SOUSA, *et al.*, 2021, MANERA, *et al.*, 2008, NUMANOĞLU, SUNGUR, 2004, SOUSA, 2018).

Extração da enzima intracelular (enzima livre)

A extração da enzima intracelular β -galactosidase das células de *K. marxianus* foi realizada utilizando clorofórmio (PA) como solvente, conforme procedimento descrito por Santiago *et al.* (2004). Uma amostra de 80 mL de meio fermentado foi centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos. O decantado foi ressuspensionado com tampão fosfato de sódio 10^{-1}M e pH 6,6, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições. Após a centrifugação, o decantado foi ressuspensionado em 10 mL do mesmo tampão e transferido para um erlenmeyer ao qual era adicionado 2% (v/v) de clorofórmio (PA). Esta mistura foi mantida em incubadora rotativa a 150 rpm, 37°C por 17 horas. Para obtenção do extrato enzimático clarificado (enzima livre), a

suspensão celular obtida, foi centrifugada (6000rpm, 10 minutos) e o sobrenadante utilizado para microencapsulação.

Solução de alimentação do *spray dryer*

Preparou-se uma solução de agente encapsulante a partir de alginato (PA) na concentração de 1% (m/v) a fim de proteger a enzima livre e a enzima comercial conforme Braga (2018) adaptado.

O extrato enzimático clarificado e a enzima comercial foram misturadas separadamente a solução do agente encapsulante na proporção de 1:10 respectivamente para obtenção da solução de alimentação do *spray dryer*.

A suspensão celular obtida após a fermentação com 75g·L⁻¹ (enzima intracelular), foi alimentada no *spray-dryer* sem agente encapsulante.

Microencapsulação da *K. marxianus*

O processo de atomização foi adaptado de Braga (2018), realizado em *spray dryer* (modelo LM MSD 1.0, LABMAQ). Utilizou-se o bico atomizador de 1,2mm; fluxo de entrada de ar de 1,65m³·min⁻¹; temperatura do ar de secagem de 90°C; fluxo da solução de alimentação igual a 0,600L·h⁻¹; taxa de atomização 40L·min⁻¹.

Determinação da concentração celular

A concentração celular foi obtida a partir da absorbância a 650nm, convertida em massa seca de células através da curva padrão de biomassa seca em função da absorbância (FALLEIROS, 2016).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima β-galactosidase foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose realizada em um reator de mistura com um volume de 75mL de uma solução 50g·L⁻¹ de lactose (PA), preparado em tampão láctico pH 6,5, conforme descrito por Santiago *et al.* (2004) e 5mL de solução enzimática. Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional nos tempos 3, 6, 9, 12 e 15min. Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio, o qual foi tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO, KOUMATSU, *et al.*, 2004) utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest. A atividade enzimática, a partir do método das taxas iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, foi obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em duplicata.

A atividade enzimática foi determinada antes e após o processo de secagem. Antes da secagem determinou-se a atividade enzimática do extrato enzimático clarificado (enzima livre), enzima comercial e suspensão celular (enzima intracelular). Após a secagem realizou-se a ressuspensão do pó obtido na concentração 65g·L⁻¹ em solução tampão de fosfato de potássio-hidróxido de sódio 0,1M.

Para o cálculo da concentração de glicose formada foi utilizada a Equação 1, recomendado pelo fabricante:

$$Glicose = \frac{Absorbância\ teste}{Absorbância\ padrão} \times 100\ mg.\ dL^{-1} \quad (1)$$

A unidade de atividade enzimática U foi definida como micromol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), à temperatura de 35°C , pH 6,5, com uma concentração inicial de lactose de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para o cálculo da atividade enzimática foi seguida a Equação 2:

$$AE = \frac{GFM}{0,18} \times V \quad (2)$$

Sendo: AE - atividade enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$); GFM – glicose formada por minuto ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$); 0,18 – Massa molar da glicose ($\text{mg}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) e V – volume total do reator (mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de concentração de biomassa durante a fermentação está representado na Figura 1. As condições de fermentação foram otimizadas por Falleiros (2016).

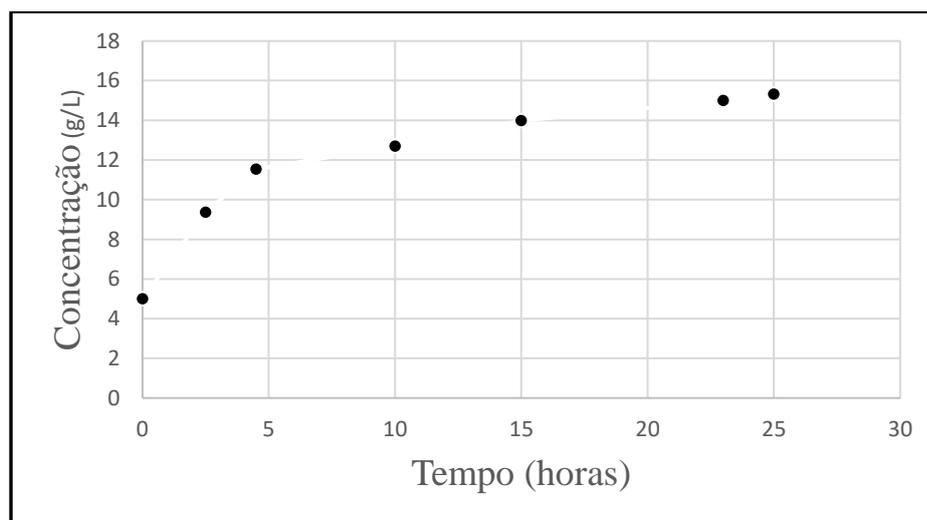


Figura 1. Perfil de concentração de biomassa durante a fermentação da *K. marxianus*.

Nas condições utilizadas os valores obtidos para concentração celular foram de acordo com o esperado conforme Falleiros (2016). A concentração de biomassa nas primeiras duas horas passou de $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $9,36\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e ao término da fermentação no tempo de 25 horas o meio fermentativo apresentou um valor final de $15,32\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A atividade enzimática da β -galactosidase comercial inicial e final foi de $1.099\pm 67\text{ U}$ e 10 ± 4 , respectivamente. A enzima comercial tem sua atividade enzimática padronizada antes de sua comercialização para maior desempenho. Porém a secagem da mesma não é eficiente pois utiliza-se para conferir maior estabilidade coadjuvantes de conservação como o glicerol. Segundo Tapia-Blácido *et al.* (2011) o uso de glicerol contribui para a hidrofiliabilidade, propriedade que descreve o grau de interação com moléculas de água. O processo de secagem em *spray-dryer* não é capaz de realizar a secagem, pois há dificuldade em remover a umidade

da solução de entrada, bem como impossibilidade de evaporação do glicerol, cujo ponto de ebulição é de 290°C.

Na Figura 2 está mostrado os grumos formados dentro do *spray-dryer* após o processo de secagem, devido a ineficiência de secagem.

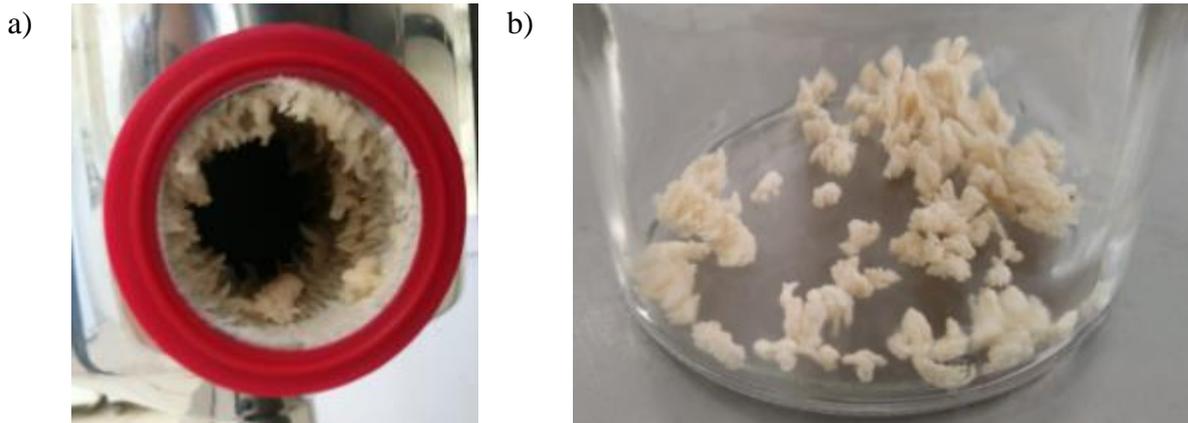


Figura 2. Produto resultante da secagem da enzima comercial; a) entrada do ciclone do *spray-dryer* e b) coletor do produto seco após passagem no ciclone do equipamento.

A atividade enzimática da β -galactosidase livre foi de 27 ± 5 U e 0 U, inicial e final, respectivamente. A enzima obtida pelo processo de extração por clorofórmio apresentou valores próximos ao obtido por Falleiros (2016) para a mesma levedura. Contudo, após o processo de secagem não houve atividade enzimática para as condições de processo utilizadas. Estevinho *et al.* (2014), avaliaram a microencapsulação da β -galactosidase de *Escherichia Coli* com diferentes polímeros em *spray-dryer*, utilizando alginato como revestimento (1% m/v) nas condições avaliadas no estudo (bico atomizador de 0,5mm; fluxo de entrada de ar de $32 \text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$; temperatura do ar de secagem de 115°C; fluxo da solução de alimentação igual a $4 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; temperatura de saída 57°C e pressão do ar 6,5bar) a enzima apresentou 955U e 124U, antes e após a secagem respectivamente. A alta temperatura utilizada no *spray-dryer* pode ocasionar a desnaturação da enzima, resultando na perda de atividade enzimática.

A atividade enzimática da β -galactosidase intracelular foi de 329 ± 19 U e 93 ± 7 U, inicial e final, respectivamente. Assim, houve uma retenção de 28,3% da atividade inicial, e desta forma observa-se que a célula atuou como material protetor da enzima. (KULA e SCHUTTE, 1987; PANDIT *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

Por meio deste estudo foi possível observar que para a enzima intracelular o método de secagem por *spray-drying* nos parâmetros avaliados, apresentou boa conservação da atividade da β -galactosidase.

Devido à alta temperatura da câmara de secagem a enzima livre desnaturou e perdeu sua atividade. Além disso, o alginato não foi capaz de preservar a atividade enzimática da enzima livre, nas condições de secagem.

A enzima comercial não apresentou a característica de pó esperada, e sua condição impactou negativamente na ressuspensão do material para avaliação da atividade enzimática após a secagem, pois não se dissolveu completamente.

REFERÊNCIAS

AMERI, M., MAA, Y.-F. "Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations", **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763–768, 6 jul. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602550600685275>.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of AOAC International. **AOAC**, Washington DC. 21ed. 2019.

AZEREDO, H. M. C. de. "Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos", p. 89–97, 2005.

BAO, J., KOUMATSU, K., FURUMOTO, K., et al. "Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor", **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 1, p. 33–41, 1 dez. 2004. DOI: 10.1016/J.BEJ.2004.08.001.

CARNEIRO, H. C. F., TONON, R. V., GROSSO, C. R. F., et al. "Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials", **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443–451, abr. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412001756>. Acesso em: 4 out. 2021.

ESTEVINHO, B. N., DAMAS, A. M., MARTINS, P., et al. "Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process", **Food Research International**, v. 64, p. 134–140, out. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691400372X>. Acesso em: 8 set. 2021.

FALLEIROS, L. N. S. S. Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537. 2016. 150 f. **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2016.

GÄNZLE, M.G.; HAASE, G.; GELLEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 685-694, 2008.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., BENEY, L., et al. "Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and

water", **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1713–1720, 15 jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.028>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611004092>. Acesso em: 12 out. 2021.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., et al. "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview", **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996907001238>. Acesso em: 3 out. 2021.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects (Review). **International Dairy Journal**, v. 22, p. 104-109, 2012.

KHAN, M. I., ARSHAD, M. S., ANJUM, F. M., et al. "Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages", **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3125–3133, 1 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.033>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911004819>. Acesso em: 12 out. 2021.

KULA, M.R.; SCHUTTE, H. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. *Biotechnology Progress*, v.3, p. 31-42, 1987.

LANE, M.M., MORRISEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 2, p. 1-10, 2010.

MANERA, A. P., ORES, J. da C., RIBEIRO, V. A., et al. "Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082", **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66–72, 1 jan. 2008. Disponível em: <https://doaj.org/article/b8787caaed814e849d87b02e225bb071>. Acesso em: 25 jan. 2022.

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F.G.; LISBOA, C.R.; MARTINS, D.S.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

NAMALDI, A., ÇALIK, P., ULUDAG, Y. "Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders", **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1495–1500, 6 fev. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07373930600961108>. Acesso em: 8 set. 2021.

NOVO NORDISK. Publicação. Enzymes Process Division. **Bioindustrial Group**. . [S.l: s.n.], 1993

NUMANOĞLU, Y., SUNGUR, S. " β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system", **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 705–711, 25 fev. 2004. DOI: [10.1016/S0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00183-3). .

PAKIZEH, M.; NAMVAR-MAHBOUB, M. Experimental study of lactose hydrolysis and separation in continuous stirred tank-ultrafiltration membrane reactor, **Chemical Engineering and Processing**, v. 2, p. 1-4, 2011.

PANDIT, A.B.; HARRISON, S.; FARKADE, V.D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimise the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247-257, 2005.

PESELA, B.C.C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, L.J.; CARRASCOSA, V.A.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decrease product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products, **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p. 199- 205, 2003.

PINHEIRO, R., BELO, I., MOTA, M. "Growth and beta-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure", **Letters in applied microbiology**, v. 37, n. 6, p. 438–442, 2003. DOI: 10.1046/J.1472-765X.2003.01429.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633095/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

SANDER, S.L.; KUIPERS, B.J.H.; DIJKHUIZENA, L.; KAMERLING, J.P. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. **Carbohydrate Research**, v. 425, p. 48-58, 2016.

SANTIAGO, P. A., MARQUEZ, L. D. S., CARDOSO, V. L., et al. "Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*", **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 567–572, dez. 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400015. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/cta/a/3KzKkFnVSbfMQHTFpBXMBCf/?lang=pt>. Acesso em: 25 jan. 2022.

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, p. 558-567, 1998.

SHEN, Q.; YANG, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565-1571, 2011.

SOUSA, C. C. de. Síntese e imobilização em resina de troca iônica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. 2018. **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2018. DOI: 10.14393/UFU.DI.2018.1141. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/22168>. Acesso em: 25 jan. 2022.

TAPIA-BLÁCIDO, D. R., DO AMARAL SOBRAL, P. J., MENEGALLI, F. C. "Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis", **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1731–1738, out. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.004>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643811001290>. Acesso em: 8 set. 2021.

YE, M., KIM, S., PARK, K. "Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles", **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241–260, 1 set. 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.05.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365910003603>. Acesso em: 3 out. 2021.