

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

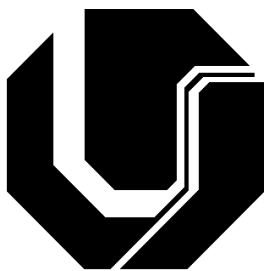
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Otimização do Processo de Imobilização de
 β - Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em
Alginato de sódio com gelatina e
glutaraldeído**

Fernanda Ferreira Freitas

Uberlândia - MG

Outubro 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Otimização do Processo de Imobilização de β -
Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de
sódio com gelatina e glutaraldeído**

Fernanda Ferreira Freitas

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro

Co-Orientador: Vicelma Luis Cardoso

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Uberlândia – MG

2007

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 25/10/2007.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(Orientador - PPG-EQ/UFU)

Prof^a. Dr^a. Vicelma Luís Cardoso
(Co-Orientadora PPG-EQ/UFU)

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(PPG-EQ/UFU)

Prof^a. Dr^a. Miriam Maria de Resende
(PPG-Q/UFU)

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior
(PPGEQ/UFSCar)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Fac. Eng. Alimentos/UNICAMP

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F866o Freitas, Fernanda Ferreira, 1976-
Otimização do processo de imobilização de β - galactosidase de
Aspergillus oryzae em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído/
Fernanda Ferreira Freitas. - 2007.
243 f. : il.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
Co-orientadora: Vicelma Luis Cardoso.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Cardoso, Vicelma Luis.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.15

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Dedico esta tese

Aos meus pais que sempre estiveram presentes e apoiando-me em toda minha vida acadêmica, minhas irmãs e familiares, ao meu “príncipe” e à minha filhinha.

Agradecimentos

A conquista do título de Doutora em Engenharia Química vem acompanhada de muita luta e sacrifícios. Sacrifícios estes que sozinha em muitas das vezes, não conseguiria. Durante estes longos anos de doutorado, conheci várias pessoas importantes que passaram pelo meu caminho. Umás ainda estão perto, e outras, muito distantes. Pessoas estas que sempre me ajudaram tanto na vida pessoal, nos momentos de desânimo com tanta carga de trabalho, como também na execução e elaboração deste trabalho. E é claro que, nesta hora de desfecho de tese, não poderia me esquecer de agradecer e reconhecer o quanto vocês foram importantes para que eu chegasse até aqui. É impossível expressar meus sinceros muito obrigado apenas com palavras, tento então, registrar minha eterna gratidão e o que posso oferecer é uma pequena, mas valorosa lembrança do quanto vocês representam para mim.

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e oportunidade de desenvolvimento intelectual, profissional e pessoal. Aos meus pais e irmãs, pelo apoio incondicional, pelos preciosos conselhos e afeto dedicados sempre. A meu marido, pela compreensão, apoio e pelos valiosos incentivos.

A você, Eloízio Júlio Ribeiro, que ao me ver nascer e me carregar no colo, nunca imaginou que um dia iríamos tornar parceiros de trabalho. Você sempre foi mais um orientador, foi um “paizão” em todos estes anos de doutorado, sempre me ajudando com seus sábios conselhos, entendendo minhas ausências devido a minha vida profissional e pessoal, sempre alegre e brincalhão!!! É uma pessoa que merece todo meu respeito e carinho pela sua simplicidade, competência e afeto dispensado durante toda convivência. A você, meus sinceros agradecimentos pela sua orientação e amizade.

A professora Vicelma Luis Cardoso, pela co-orientação incomum, típica do seu profissionalismo e pelo comprometimento com cada etapa desenvolvida na dissertação.

Aos professores Miriam Maria de Resende e Ubirajara Coutinho Filho, pelas diretrizes necessárias e fundamentais para a condução experimental e análises dos resultados, indispensáveis para o desfecho desta tese.

A todos os professores da FEQUI que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da FEQUI: Anísio, Cleide, José Henrique, Roberta, Silvino, Tiago e Zuleide, sempre dispostos a ajudar de forma cordial.

As amigas de laboratório: Marília Sfredo, Patrícia Angélica, Líbia Diniz, Sandra, que tornaram os árduos dias de laboratório em momentos alegres e descontraídos.

Aos graduandos Gabriela Brandão e Gustavo Ribeiro pela ajuda indispensável na parte experimental deste trabalho, pela amizade adquirida ao longo destes anos, meus sinceros muito obrigado e sucesso na carreira futura.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 -Leite.....	4
2.2 - Lactose.....	6
2.2.1 - Ocorrência.....	6
2.2.2 - Biossíntese da lactose.....	7
2.3 - Hidrólise da lactose do leite	12
2.4 -Enzimas	15
2.5 - Enzima β -galactosidase	17
2.5.1 - Mecanismo de ação da lactase	18
2.5.2 - Atividade de transferase da lactase	19
2.5.3 - Fontes de β -Galactosidase.....	21
2.5.4 - Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	25
2.5.5 - Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas..	27
2.6 - Imobilização de enzimas	32
2.7 - Métodos de imobilização de enzimas	35
2.7.1 – Métodos de imobilização que utilizam suportes insolúveis em água..	36
2.7.2 – Métodos de imobilização sem o uso de suportes	39
2.7.3 – Alginato	42
2.8 - Efeitos de imobilização nas propriedades das enzimas	44
2.9 - Comparação entre os métodos de imobilização	47
2.10 - Imobilização da lactase	49
2.10.1 - Imobilização da lactase de origem fúngica	50
2.10.2 - Imobilização da lactase de origem de levedura	51
2.10.3 Imobilização da lactase de origem bacteriana	53
2.11 - Tipos de biorreatores para enzimas imobilizadas.....	53
2.11.1 Reatores Descontínuos	54
2.11.2 Reatores Contínuos	56
2.11.3 Fatores a considerar na escolha do reator	58
2.11.4 Problemas operacionais de reatores enzimáticos.....	60
2.11.5 - Reatores com lactase imobilizada	60
2.12 - Cinética enzimática	62
2.12.1 – Presença de inibidores no meio reacional.....	63
2.12.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos	66
2.12.3 - Cinética de hidrólise de lactose livre e imobilizada	66
2.13– Influência dos efeitos de transferência de massa na cinética das reações enzimáticas.....	68
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3.1 – Enzima.....	76
3.2 - Unidade Experimental.....	76
3.3 - Determinação da atividade de β -galactosidase livre e imobilizada pelo método das velocidades iniciais	78
3.4 – Estudo da enzima livre.....	79

3.4.1 - Influência do pH e da temperatura na atividade da β -galactosidase....	79
3.4.2 -Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase livre	79
3.4.3 - Estudo da estabilidade da enzima livre com relação ao pH	79
3.4.4 - Estudo da estabilidade térmica da enzima livre	80
3.4.5 - Planejamento Composto Central	81
3.4.6 - Influência da concentração inicial de glicose, galactose e lactose na atividade da enzima livre	86
3.4.7 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima livre	88
3.5 –Avaliação do processo de hidrólise de lactose com enzima imobilizada	90
3.5.1- Estudo preliminar da metodologia de imobilização de β -galactosidase	90
3.5.2 - Otimização do processo de Imobilização da enzima β -galactosidase.	91
3.5.3 – Estudo da influência da concentração de enzima no processo de imobilização	93
3.5.4 - Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada.....	93
3.5.5 – Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada.....	94
3.5.6 – Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada	95
3.5.7 – Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH	96
3.5.8 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada	96
3.5.9 – Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase imobilizada	96
3.5.10 -Estudo da transferência de massa na enzima imobilizada	97
3.5.10.1 - Resolução numérica das equações do modelo	99
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO	102
4.1 – Atividade da β -galactosidase empregada no trabalho	102
4.2- Resultados para a enzima livre	102
4.2.1 – Influência do pH na atividade da β -galactosidase livre	102
4.2.2- Influência da temperatura na atividade da β -galactosidase livre	103
4.2.3 – Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase livre	104
4.2.4– Estudo da estabilidade da enzima livre com relação ao pH	108
4.2.5 – Estudo da estabilidade da térmica da enzima livre	109
4.2.6 – Influência da concentração inicial de glicose, galactose e lactose na atividade da enzima livre	129
4.2.7 - Influência da concentração de galactose na atividade da enzima livre	138
4.3 - Resultados para a avaliação do processo de hidrólise de lactose com enzima imobilizada	142
4.3.1 - Estudo preliminar da metodologia de imobilização de β -galactosidase.....	144
4.3.2 – Otimização do Processo de Imobilização da enzima β -galactosidase.....	145
4.3.3 - Estudo da influência da concentração de enzima no processo de imobilização.....	155
4.3.4 - Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima	

Imobilizada.....	156
4.3.5 - Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada.....	161
4.3.6 - Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	163
4.3.7 - Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH	183
4.3.8 - Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada	184
4.3.9 - Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase imobilizada.....	190
4.3.10 - Estudo da influência da transferência de massa na cinética com a enzima imobilizada.....	191
4.4- Comparação entre resultados da enzima na forma livre e imobilizada.....	193
4.4.1 - Influência do pH na atividade da β -galactosidase livre e imobilizada	193
4.4.2 - Influência da temperatura na atividade da β -galactosidase livre e imobilizada.....	194
4.4.3 - Estudo da estabilidade da enzima livre e imobilizada em relação ao pH	196
4.4.4 - Estudo da estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada	197
4.4.5 - Estudo comparativo da cinética de hidrólise de lactose por Michaelis Menten pela enzima livre e imobilizada	201
4.4.6 - Estudo comparativo da cinética de hidrólise de lactose pela enzima livre e imobilizada	201
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	203
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	205
CAPÍTULO - 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	206
ANEXOS.....	221

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Composição média do leite.....	5
Figura 2.2 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α - lactose.....	8
Figura 2.3- Estrutura molecular da β -lactose.....	8
Figura 2.4 - Reação esquemática da cristalização da lactose.....	9
Figura 2.5 - Mecanismo de reação proposto para a ação da β -galactosidase sobre a lactose. LAC, lactose; GAL, galactose; GAL+, estado de transição da galactose; GLC, glicose; ROH, açúcar receptor; GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeos).....	18
Figura 2.6- Classificação de enzimas imobilizadas.....	35
Figura 2.7 - Preparação da ligação cruzada com uso do glutaraldeído com os componentes diamino.....	40
Figura 2.8 - Estrutura química do alginato – G é o grupo ácido gulurônico e M é o grupo ácido manurônico.....	43
Figura 2.9 - Modelo “egg-box” para o processo de gelação do alginato com íons cálcio.....	43
Figura 2.10 - Diversos tipos de reatores empregados para a hidrólise enzimática.....	55
Figura 2.11 - Fator de efetividade interno (η) em função de Thiele (ϕ) para vários valores de concentração de substrato adimensional ($\beta_s=C_s/K_m$).....	71
Figura 2.12 - Esquema do perfil de concentração de substrato em suporte esférico, contendo enzima imobilizada.....	73
Figura 2.13 - Esquema de um elemento de volume no interior de uma matriz esférica.....	73
Figura 3.1 - Representação esquemática da unidade experimental.....	77
Figura 3.2 - Unidade Experimental.....	77
Figura 3.3 - Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.....	85
Figura 3.4 - Unidade experimental para a confecção das partículas de biocatalisador.	90
Figura 3.5 - Partículas de biocatalisador imobilizada.....	91
Figura 4.1 - Influência do pH na atividade da β -galactosidase livre.....	103
Figura 4.2 - Influência da temperatura atividade da β -galactosidase livre.....	104
Figura 4.3 – Cálculo da energia de ativação térmica.....	105
Figura 4.4 - Influência da concentração de substrato na atividade da β -galactosidase livre.....	106
Figura 4.5 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	107
Figura 4.6 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	107
Figura 4.7 - Estabilidade da enzima livre com relação ao pH.....	108
Figura 4.8 – Atividade relativa (A_t/A_o), em função do tempo, para as temperaturas de 65, 63 e 61°C.....	109
Figura 4.9 – Atividade relativa (A_t/A_o), em função do tempo, para as temperaturas 59, 57, 55 e 53°C.	109
Figura 4.10 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 65°C.....	111
Figura 4.11 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	112
Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	112
Figura 4.13 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.....	113

Figura 4.14- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	114
Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	115
Figura 4.16 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 61°C.....	116
Figura 4.17- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	117
Figura 4.18 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	117
Figura 4.19 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 59°C.....	118
Figura 4.20- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	119
Figura 4.21 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	120
Figura 4.22 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.....	121
Figura 4.23- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo. para a resposta de atividade enzimática.....	122
Figura 4.24–Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	122
Figura 4.25– Perfil da desativação térmica na temperatura de 55°C.....	123
Figura 4.26- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	124
Figura 4.27 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	124
Figura 4.28 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 53°C.....	125
Figura 4.29- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	126
Figura 4.30 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	126
Figura 4.31 – Regressão linear da equação de Arrhenius.....	129
Figura 4.32 – Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	133
Figura 4.33 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.....	134
Figura 4.34 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis lactose e glicose.....	135
Figura 4.35 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis lactose e glicose	135
Figura 4.36 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis lactose e galactose.....	136
Figura 4.37 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis lactose e galactose.....	137
Figura 4.38 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glicose e galactose.....	137
Figura 4.39 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glicose e galactose.....	138
Figura 4.40 – Perfil da influência da concentração de galactose na atividade da enzima livre, pelo modelo de inibição competitiva.....	142
Figura 4.41 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática.....	142
Figura 4.42 - Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima solúvel.....	143
Figura 4.43 - Atividades relativas de β -galactosidase imobilizadas em alginato de sódio, para concentrações de glutaraldeído: 1%, 3% e 5 % (v/v).....	144
Figura 4.44 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	149

Figura 4.45 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	149
Figura 4.46 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e gelatina.....	150
Figura 4.47 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e gelatina.....	150
Figura 4.48 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis gelatina e alginato.....	151
Figura 4.49 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis gelatina e alginato.....	151
Figura 4.50 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e alginato.....	152
Figura 4.51 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e alginato.....	152
Figura 4.52 – Estabilidade enzimática do experimento 10.....	153
Figura 4.53 – Estabilidade enzimática do experimento otimizado pelo PCC.....	154
Figura 4.54 – Atividade relativa em função da concentração de enzima no processo de imobilização.....	155
Figura 4.55 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	158
Figura 4.56 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	159
Figura 4.57 - Superfície de resposta no estudo da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de lactase imobilizada.....	160
Figura 4.58 - Superfície de contorno no estudo da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de lactase imobilizada.....	160
Figura 4.59 – Influência da temperatura na atividade.....	162
Figura 4.60 – Cálculo da energia de ativação térmica.....	163
Figura 4.61 – Atividade relativa (A_t/A_0), em função do tempo, para as temperaturas de 61 a 65°C estudadas.....	164
Figura 4.62 – Atividade relativa (A_t/A_0), em função do tempo, para as temperaturas de 53 a 59°C estudadas.....	164
Figura 4.63 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 65°C.....	166
Figura 4.64 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	167
Figura 4.65 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	167
Figura 4.66 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.....	168
Figura 4.67 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	169
Figura 4.68 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	169
Figura 4.69 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 61°C.....	170
Figura 4.70- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	171
Figura 4.71 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	172
Figura 4.72– Perfil da desativação térmica na temperatura de 59°C.....	173
Figura 4.73 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	174
Figura 4.74 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	174
Figura 4.75 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.....	175
Figura 4.76 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	176
Figura 4.77– Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	176

Figura 4.78 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 55°C.....	177
Figura 4.79- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	178
Figura 4.80 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	178
Figura 4.81 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 53°C.....	179
Figura 4.82- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.....	180
Figura 4.83 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	180
Figura 4.84 – Ajuste dos valores de k_d à Equação de Arrhenius.....	183
Figura 4.85 – Influência do pH na estabilidade enzimática.....	184
Figura 4.86 – Perfil da influência da concentração de galactose na atividade da enzima livre, pelo modelo de inibição competitiva.....	187
Figura 4.87 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática.....	188
Figura 4.88 - Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima imobilizada	189
Figura 4.89 - Influência da concentração de substrato na atividade da β -galactosidase imobilizada.....	191
Figura 4.90 – Concentração de substrato para cada valor de S_0 em função da posição radial na partícula para as concentração de 5 a 60g/L.....	192
Figura 4.91 – Concentração de substrato para cada S_0 em função da posição radial na partícula para as concentração de 70 a 140g/L.....	192
Figura 4.92- Efeito da concentração do substrato no meio reacional em função da efetividade.....	193
Figura 4.93 – Influência da temperatura na atividade enzimática para as formas livre e imobilizada.....	195
Figura 4.94 – Estabilidade enzimática em relação ao pH para as formas livre e imobilizada.....	196
Figura 4.95 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 65°C.....	197
Figura 4.96 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 63°C.	198
Figura 4.97 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 61°C.	198
Figura 4.98 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 59°C.....	199
Figura 4.99 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 57°C.....	199
Figura 4.100 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 55°C.....	200
Figura 4.101 – Dados Experimentais de estabilidade térmica para a enzima em ambas as formas à 53°C.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Solubilidade da lactose em água.....	9
Tabela 2.2 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.....	10
Tabela 2.3 - Propriedades da lactose e da lactose 90% hidrolisada.....	14
Tabela 2.4 - Fontes comerciais de β -galactosidases para hidrólise da lactose.....	22
Tabela 2.5 - Propriedades da enzima microbiana.....	23
Tabela 2.6 - Principais lactases comerciais e suas propriedades.....	24
Tabela 2.7 - Lactases de várias fontes em relação ao pH ótimo para atividade máxima	26
Tabela 2.8 - Comparação das diferentes técnicas de imobilização.....	48
Tabela 2.9 - Comparação entre os métodos de imobilização e suas características.....	48
Tabela 2.10 - Propriedades da lactase de <i>Aspergillus niger</i> imobilizada.....	50
Tabela 2.11- Propriedades da enzima lactase de origem de levedura.....	51
Tabela 2.12 - Classificação dos reatores enzimáticos.....	54
Tabela 3.1 – Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com três variáveis.	82
Tabela 3.2 – Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com duas variáveis.....	83
Tabela 3.3 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da influência dos produtos na atividade enzimática da lactase livre.....	87
Tabela 3.4 – Valores das concentrações de lactose (S) e galactose (I) para determinação do modelo cinético de inibição enzimática.....	88
Tabela 3.5: Matriz do Planejamento Composto Central na otimização do processo de imobilização da enzima lactase.....	92
Tabela 3.6 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da lactase imobilizada.....	94
Tabela 4.1 – Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para a enzima na forma livre.....	105
Tabela 4.2 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 65°C.....	110
Tabela 4.3 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 63°C	113
Tabela 4.4 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 61°C.....	115
Tabela 4.5 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 59°C.....	118
Tabela 4.6 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 57°C.....	120
Tabela 4.7 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55°C.....	123
Tabela 4.8 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 53°C	125
Tabela 4.9 – Tempo de meia vida para cada temperatura.....	127
Tabela 4.10 – Tempo de meia vida para cada temperatura utilizando modelo de primeira ordem de desativação térmica.....	128
Tabela 4.11 – Atividades residuais para os 16 experimentos.....	130
Tabela 4.12 – Análise estatística das variáveis	131
Tabela 4.13 – Análise estatística das variáveis significativas.....	132
Tabela 4.14 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.....	133
Tabela 4.15 - Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações iniciais de galactose (inibidor) e lactose (substrato) no meio reacional.....	139
Tabela 4.16 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de galactose como inibidor	140
Tabela 4.17 – Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima solúvel	143
Tabela 4.18 – Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído.....	146

Tabela 4.19 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC com todos os parâmetros.	147
Tabela 4.20 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC com os parâmetros significativos.....	147
Tabela 4.21 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.....	148
Tabela 4.22 - Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento experimental.	156
Tabela 4.23 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.....	157
Tabela 4.24 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.....	158
Tabela 4.25 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 65°C...	165
Tabela 4.26 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 63°C...	168
Tabela 4.27 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 61°C...	170
Tabela 4.28 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 59°C...	172
Tabela 4.29 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 57°C...	175
Tabela 4.30 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55°C...	177
Tabela 4.31 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 53°C...	179
Tabela 4.32 – Tempo de meia vida para as temperaturas estudadas.....	181
Tabela 4.33 – Tempo de meia vida para cada temperatura utilizando modelo de primeira ordem de desativação térmica para a enzima imobilizada	182
Tabela 4.34 - Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações iniciais de galactose (inibidor, g/cm ³) e lactose (substrato, g/ cm ³) no meio reacional.....	185
Tabela 4.35 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de galactose como inibidor	186
Tabela 4.36 – Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima imobilizada.....	189
Tabela 4.37 – Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para a enzima na forma imobilizada.....	190
Tabela 4.38 - Condições de operação	191
Tabela 4.39 – Comparação entre os valores de kd e tempo de meia vida para cada uma das temperaturas estudadas entre as enzimas na forma livre e imobilizada	201
Tabela 4.40 – Parâmetros cinéticos da inibição competitiva	202

Lista de Símbolos

μm	Micro metro
β	Beta - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α	Alfa - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α/β	Razão entre as solubilidades das formas alfa e beta-lactose
ΔG	energia livre de Gibbs
K_{eq}	constante de equilíbrio
k	constante da taxa da reação na fase de ativação térmica
Z	fator de frequência de colisões favoráveis entre reagentes
E_a	energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima
R	constante da lei dos gases
T	temperatura absoluta
E	concentração de enzima ativa
k_d	constante de desativação térmica
E/E_o	atividade relativa da enzima
$t_{1/2}$	tempo de meia vida $t_{1/2}$
E_1	Estados de enzima na etapa de desativação térmica
E_2	Estados de enzima na etapa de desativação térmica
α_1	razão de atividade específicas
α_2	razão de atividade específicas
k_1	constante de velocidade de desativação térmica – única etapa
k_2	constante de velocidade de desativação térmica – duas etapas
A	atividade relativa total
E_d	energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
k_{d0}	constante de proporcionalidade
V_m	a velocidade máxima de reação
K_m	constante do modelo de Michaelis-Menten
S	substrato
K_i	a constante de inibição
I	Inibidor
σ	fator de constricção
τ	tortuosidade
η	Fator de efetividade interna,
ϕ	módulo de Thiele
R_p	Raio da partícula
D_{ef}	Difusividade efetiva
ρ	Densidade da partícula
β_s	concentração de substrato adimensional
C_s	concentração de substrato
dV	elemento de volume
j	é o fluxo de massa
$r(S)$	taxa de reação
$A _r$	áreas superficiais da esfera na posição respectiva.
$A _{r+dr}$	áreas superficiais da esfera na posição respectiva
S_b	Substrato no seio da solução
S_e	Substrato na camada da enzima

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a influência conjunta das concentrações de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído no processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e a cinética de hidrólise de lactose pela enzima nas formas solúvel e imobilizada. A cinética da enzima na forma livre foi estudada a 35°C, a pH 4,5, verificando que para concentrações de substrato de até 90g/L o modelo de Michaelis-Menten se ajustou aos resultados experimentais, com valores de K_m e V_m iguais a 17,83 g/L (52,13 mM) e 1032,07 $\frac{g_{\text{lactose}}}{L \cdot \text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}}$ respectivamente. A galactose atuou como um inibidor competitivo na cinética da enzima na forma livre, apresentando constantes cinéticas K_i e K_m com valores iguais a 1,015 e 17,61 g/L respectivamente. A enzima apresentou-se estável na faixa de pH de 4,5 a 7 e temperatura de máxima atividade de 55°C, com energia de ativação de 6,9 kcal/mol. A estabilidade térmica da enzima foi estudada na faixa de 53 a 65°C, apresentando meia vida de 7,7 horas a 53°C. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi de 88,14 kcal/mol. Por meio de um planejamento composto central as concentrações de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído que maximizaram a atividade de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* no processo de imobilização foram, respectivamente, 6,60% (p/v), 4,05% (p/v) e 3,64% (v/v). A enzima imobilizada apresentou queda de 20% na atividade após 25 usos. O rendimento de imobilização encontrado foi de 30%. A atividade enzimática para a forma imobilizada foi máxima a pH a 5,0, a 60°C, determinados através de um planejamento composto central. A energia de ativação da reação usando a enzima imobilizada foi 7,74 kcal/mol. O biocatalisador imobilizado apresentou-se estável na faixa de pH de 4,5 a 7. O tempo de meia vida da enzima imobilizada foi 12,8 horas a 53°C apresentando energia de ativação do processo de desativação térmica de 72,03 kcal/mol. A influência da concentração de substrato foi estudada para uma faixa de 5 a 140g/L de lactose e o Modelo de Michaelis-Menten ajustou-se bem aos dados experimentais, com valores de V_m e K_m de 1032,07 $\frac{g_{\text{lactose}}}{\text{min} \cdot \text{m}^3 \text{catalisador}}$ e 20,62 g/L (60,3 mM), respectivamente. Em relação à enzima na forma imobilizada observou-se pequena resistência à transferência de massa de lactose nas partículas do biocatalisador, em função dos altos valores do fator de efetividade. O modelo de inibição competitivo ajustou-se bem aos dados experimentais e os valores de K_m e K_i calculados foram 16,7 e 9,6g/L, respectivamente.

Palavras-chave: lactase, imobilização, alginato de sódio, otimização, cinética enzimática

ABSTRACT

In this work was studied the simultaneous influence of sodium alginate, gelatin and glutaraldehyde concentrations in the immobilization process of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and the kinetic of lactose hydrolysis by the enzyme in the soluble and immobilized forms. The free enzyme was studied at 35°C and in a pH of 4.5, showing that for substrate concentrations up to 90g/L, the Michaelis-Menten model fitted the experimental data, with a K_m and V_m value of 17.83 g/L (52.13 mM) and 1032.07 $\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}$ respectively. Galactose acted as a competitive inhibitor on the free enzyme kinetic, presenting kinetic constants K_i and K_m values of a 1.015 and e 17.61 g/L respectively. The enzyme was stable at pH values ranging from 4.5 to 7.0 and a maximum temperature activity of 55°C, with an activation energy of 6.9 kcal/mol. The thermal stability of the enzyme was studied from 53 to 65°C, presenting a half-life of 7.7 hours at 53°C. The activation energy for the thermal deactivation process was 88.14 kcal/mol. Through a central composite design, the sodium alginate, gelatin and glutaraldehyde concentrations that maximized the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* activity in the inhibition process were, respectively, 6.60%(w/v), 4.05%(w/v) and 3.64%(v/v). The immobilized enzyme presented a 20% drop in activity after 25 uses. The immobilization yield found was 30%. The enzymatic activity for the immobilized form was maximum at pH of 5.0 and 60°C, determined through a central composite design. The reaction activation energy for the immobilized enzyme was 7.74 kcal/mol. The immobilized biocatalyst was stable on pH values ranging from 4.5 to 7.0. The half-life time of the immobilized enzyme was 12.8 hours at 53°C, with a activation energy for the thermal deactivation process value of 72.03 kcal/mol. The substrate concentration influence was studied from 5 to 140 g/L of lactose and the Michaelis-Menten model fitted the experimental data, with V_m and K_m values of 1428.14 $\text{g}_{\text{lactose}}/\text{min}\cdot\text{m}^3\text{catalyst}$ and 20.62 g/L (60.3 mM), respectively. It was observed a small resistance to lactose mass transfer at the biocatalyst particles, in the immobilized enzyme, due to the high effectiveness factor values. The inhibition model fitted the experimental data and the adjusted K_m and K_i values were 16.7 and 9.6g/L, respectively.

Key-words: lactase, imobilization , sodium alginate, optimization, enzyme kinetics

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Atualmente as indústrias de laticínios têm realizado investimentos tanto na renovação de produtos, como no lançamento de outros, tendo todos estes o leite como matéria-prima essencial. O leite é um alimento básico da dieta, especialmente para as crianças. É considerado a primeira fonte de nutrientes para os mamíferos e a maior fonte de cálcio absorvível à disposição do homem. Graças a ele e a seus derivados, obtém-se o aporte mais importante de cálcio para o organismo. O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas, lactose, vitaminas e outros componentes que se encontram suspensos na água.

Grande parte população mundial não pode desfrutar dos benefícios proporcionados pelo leite devido a algum grau de rejeição aos produtos lácteos. A incapacidade do organismo para processar o açúcar que o leite contém, chama-se "intolerância à lactose", ou em outras palavras "alergia ao leite". No aparelho digestivo, a lactose não hidrolisada chega ao intestino grosso onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido lático e gases tais como gás carbônico e hidrogênio (usado nos testes de determinação de intolerância à lactose) (<http://www.vitabrasilnet.com.br/lactaid.htm>). A presença de lactose e destes compostos nas fezes do intestino grosso aumenta a pressão osmótica e drena a água do corpo, causando os sintomas tais como: diarréia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços (WHITE *et al.* 1976). A razão pela qual tais pessoas não conseguem processar a lactose é a falta de uma enzima produzida pelo organismo e que "digere" este açúcar, ou seja, é a incapacidade de aproveitar a lactose. A concentração da lactase nas células intestinais dos humanos é alta quando ele nasce e vai decrescendo com a idade. Esta intolerância pode ser congênita ou se agravar com o avanço da idade. A intolerância à lactose é um problema comum, estimado em 20-25% na população brasileira de acordo com a Escola Paulista de Medicina (<http://www.portaldofranshising.com.br>), apesar de pouco diagnosticada. Nos EUA, um em cada quatro ou cinco adultos pode sofrer de algum grau de intolerância ao leite. Os descendentes brancos de europeus têm uma incidência menor que 25%, enquanto que na população de origem asiática o problema alcança 90%. Nos afro-americanos, nos índios e nos

judeus, bem como nos mexicanos, a intolerância à lactose alcança níveis maiores que 50% dos indivíduos (<http://planeta.terra.com.br/saude/saudedofuturo/lactose.htm>).

A utilização da lactose em produtos alimentícios é limitada por causa de sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e efeito laxativo, se consumida em alta concentração (ROGALSKI *et al.* 1994). Os produtos da hidrólise da lactose (glicose e galactose) são mais solúveis e doces do que a lactose “in natura”, além de apresentar diversas vantagens adicionais que permitem obter novos produtos economicamente atrativos (MARIOTTI, 2000). Nas indústrias de laticínios, a hidrólise proporciona outras vantagens como: a prevenção da cristalização, melhorando as características organolépticas como cor e sabor, em produtos lácteos como doce de leite, leite condensado, leite condensado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes; aumento da facilidade de corte e cremosidade das misturas para sorvete; diminuição do tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar e aumento em cerca de 10% na produção dos queijos Cottage e Quark; e a produção de oligossacarídeos (KARDEL *et al.* 1995; MAHONEY, 1997, GAUR *et al.* 2006). Esta última aplicação é mais recente e está relacionada com a atividade de transgalactosilação da β -galactosidase. Na década de 50, pesquisadores observaram que a hidrólise enzimática da lactose era acompanhada pela transferência de grupos galactosil, para formar outros açúcares denominados oligossacarídeos (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; PRENOSIL *et al.* 1987; ALMEIDA e PASTORE, 2001, GAUR *et al.* 2006).

Uma das alternativas para minimizar os problemas da intolerância à lactose é a sua hidrólise enzimática, produzindo glicose e galactose, além de contornar o problema da baixa solubilidade da lactose, podendo ser também utilizada a ação de β -galactosidase para a formação de galactooligossacarídeos.

A tecnologia enzimática é uma ciência em pleno desenvolvimento e de grande importância no mundo atual. A otimização dos métodos enzimáticos apresenta atualmente importante papel nos processos industriais para a produção de insumos, os mais variados possíveis (MARIOTTI 2000, JURADO *et al.* 2002, RESHMI *et al.* 2007). As principais vantagens de trabalhar com enzimas se deve ao fato de serem altamente específicas ao seu substrato, produzindo substâncias com alto grau de pureza segundo o ponto de vista estereoquímico, o que as torna de grande importância não apenas para a indústria farmacêutica, como também na alimentícia. A sua atoxicidade e a eliminação de etapas de tratamento de efluentes ou mesmo do produto final, tornam a utilização das mesmas bastante atraente. Atualmente, a maioria das enzimas são utilizadas na sua forma livre, dificultando o seu reaproveitamento e a sua recuperação do produto final, sendo esta a principal

desvantagem de se trabalhar com enzimas livres. A imobilização surge então como uma maneira de torná-la mais atrativa e viável de se reaproveitar a enzima (HAIDER e HUSAIN, 2007).

Uma alternativa para as indústrias que se utilizam dos processos enzimáticos é o uso de enzimas na forma imobilizada, uma vez que os custos podem ser reduzidos e a operação do processo ser otimizada, com uma boa tecnologia de imobilização. O processo de imobilização da enzima β -galactosidase ainda não foi otimizado e isto explica o grande número de artigos publicados recentemente sobre o tema. Isto justifica o uso de β -galactosidase na forma livre na indústria láctica em todo o mundo, mesmo sendo um processo de custo elevado (DI SERIO *et al.* 2003; CAO, 2005). Devido a estes fatos, técnicas de imobilização estão sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores na área.

Neste trabalho, utilizou-se um sistema de imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio e gelatina interligada ao glutaraldeído com o objetivo de criar uma malha tridimensional que juntamente com a enzima, aumenta o peso molecular da mesma, podendo evitar assim o seu escape de dentro do pellet. Este procedimento foi baseado nos trabalhos de TANRISEVEN e DOGAN (2002).

Baseado na importância da hidrólise da lactose para a indústria de laticínios, esse trabalho apresenta como objetivo geral estudar a imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por entrelaçamento em gel de alginato de sódio e gelatina, utilizando glutaraldeído como agente reticulante e determinar a cinética da reação de hidrólise de lactose pelo biocatalisador imobilizado. Como objetivos específicos dessa tese, podem ser citados:

- Determinar as melhores concentrações de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído otimizando o processo de imobilização empregando um planejamento composto central;
- Estudar a cinética da ação da enzima β -galactosidase na forma livre;
- Avaliar as influências das variáveis: concentração de glicose, galactose e substrato na atividade enzimática aplicando a técnica de superfície de resposta;
- Estudar a cinética da reação de hidrólise pela enzima imobilizada;
- Analisar a influência da transferência de massa de lactose na cinética da reação catalisada por β -galactosidase imobilizada.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - O leite

O leite, obtido em circunstâncias naturais, é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado, que é secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos durante o período de lactação e destinado à alimentação de seus filhotes. Por apresentar alto valor nutritivo e custo relativamente baixo, o leite freqüentemente é o principal alimento das crianças e complemento indispensável na dieta dos adultos (OLIVEIRA, 1982; WALSTRA e JENNESS, 1984; SCRIBAN, 1985). Segundo dados coletados pela organização LEITE BRASIL o consumo de leite no Brasil em 1999 era de 8,5 bilhões de litros, incluindo longa vida, pasteurizado, leite em pó e informal. Em 2000, a produção mundial total de leite estimada foi de 571 milhões de toneladas, das quais 68% foram destinadas à elaboração de produtos láteos. O consumo per capita mundial leite fluido em 2006 foi de 70,8 kg/pessoa/ano (www.leitebrasil.org.br). No primeiro trimestre de 2003 foram captados 3 bilhões 517 milhões de litros de leite. Isto representa um aumento de 5,88% sobre o primeiro trimestre de 2002 e de 0,16% com relação ao quarto trimestre de 2002. Quanto ao leite industrializado houve aumento de 5,59% com relação ao primeiro trimestre de 2002 e queda de 0,22% com relação ao quarto trimestre de 2002. O início do ano de 2003 foi marcado por chuvas, fato que teria um impacto sobre os pastos e elevando com isto a produção de leite (www.ibge.com.br).

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros componentes sólidos, que se encontram suspensos em água, cuja composição média é apresentada no esquema da Figura 2.1. A gordura e as vitaminas lipossolúveis, A, D, E e K encontram-se em forma de emulsão, ou seja, uma suspensão de pequenos glóbulos que não se misturam com a água. O leite bovino tem em média 5% de lactose anidra, correspondendo a aproximadamente 50% dos sólidos totais da forma desnatada (BOBBIO e ORSATTI, 1992).

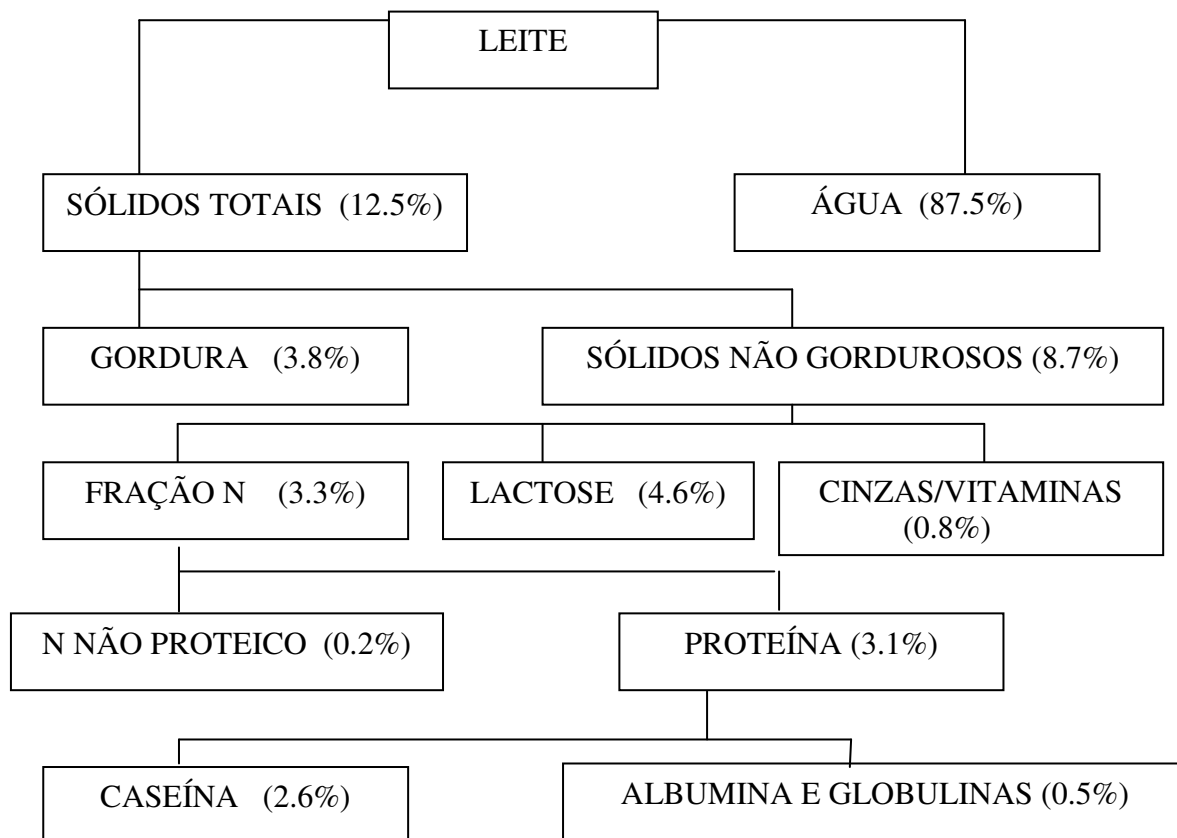


Figura 2.1. Composição média do leite (BLOWEY,1992).

Pequenas quantidades de outros carboidratos são encontradas no leite, parcialmente ligadas a fosfatos, lipídeos e/ou proteínas e parcialmente livres, como por exemplo, os monossacarídeos glicose e galactose a uma concentração de aproximadamente 10 mg/L e os oligossacarídeos a aproximadamente 100 mg/L (RENNER, 1983). A lactose, as proteínas do soro (albumina, imunoglobulinas, hormônios e enzimas), os minerais, as vitaminas hidrossolúveis (complexo B e C) e substâncias nitrogenadas não protéicas (amônia, uréia, ácido úrico, creatina, ácido hipúrico e outras) encontram-se completamente dissolvidas na água do leite, formando uma solução. A principal proteína do leite é a caseína, que apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação de queijos. Apresenta-se na forma de partículas de tamanho muito reduzido (0,05 a 0,5 μm), que se distribuem uniformemente em estado coloidal. Estas partículas são chamadas de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com sais de cálcio, fósforo e outros, e a sua dispersão no leite é conhecida como suspensão coloidal. Cerca de 95% da caseína total do leite encontra-se nesta forma. A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos. A maior parte da gordura do leite é constituída de triglicérides, que são formados por ácidos graxos ligados ao glicerol. A fração de gordura do leite transporta vitaminas, tanto

lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K), como as hidrossolúveis (vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, C). As micelas de caseína, junto com os glóbulos de gordura, são os principais responsáveis pelas características físicas, como estrutura, cor e sabor, do leite e seus derivados. Respondendo por quase 90% da composição do leite bovino, a água provém do sangue da vaca e se origina principalmente da dieta. A composição do leite varia entre as diferentes espécies de mamíferos e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Os fatores que afetam a composição do mesmo podem ser divididos em nutricionais e não-nutricionais. Dentro de uma espécie, a composição depende de muitos fatores como raça, período de lactação, tipo de alimento, manejo da alimentação, frequência de ordenha, entre outros. Assim, é difícil definir uma composição única para o leite. Entretanto, as relações entre os diversos constituintes do leite são muito estáveis e podem ser usadas para indicar se houve qualquer adulteração na sua composição. A composição média do leite é apresentada na Figura 2.1.

O leite é utilizado como matéria-prima para a fabricação de um grande número de derivados lácteos, entre eles o queijo, a coalhada, o iogurte e o sorvete (OLIVEIRA, 1982; SCRIBAN, 1985).

2.2. Lactose

Todos os anos $1,45 \cdot 10^{11}$ toneladas de soro de leite, e $6 \cdot 10^9$ toneladas de lactose são produzidas mundialmente. Infelizmente, nos últimos 50 anos, metade da produção mundial não tem sido transformada em sub-produtos, sendo descartada diretamente no meio ambiente (HAIDER e HUSAIN, 2007). O soro é o principal subproduto da indústria de laticínios, e devido ao seu alto conteúdo em lactose, apresenta alta DBO e quando lançado diretamente aos corpos receptores, causa séria poluição das águas, o que pode ser evitado utilizando o mesmo para geração de produtos de interesse alimentício, farmacêutico e para o setor de agricultura. A lactose é um açúcar higroscópico com forte tendência a absorver sabores e odores (HATZINIKOLAOU *et al.* 2005).

2.2.1. Ocorrência

A lactose é o carboidrato mais importante do leite e conhecida popularmente como “açúcar do leite”. Praticamente o leite e o soro de queijo são as fontes exclusivas de lactose. No leite é encontrada nas proporções (em termos de sólidos totais) de 40% , 52% no leite desnatado e 70% no soro de leite (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>). Além das altas

concentrações de lactose no leite e nas glândulas mamárias, baixas concentrações aparecem no sangue e na urina, especialmente durante a gravidez e amamentação (SPREER, 1975; GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1988; PORTO, 2001).

A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono para microrganismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (WALSTRA e JENNESS, 1984).

2.2.2 - Biossíntese da lactose

Os produtos finais da fermentação do alimento ingerido pela vaca, como aminoácidos, carboidratos e gorduras, são absorvidos no intestino delgado e pela circulação sanguínea chegam à glândula mamária para servirem de base à síntese do leite. Além de se originar diretamente dos alimentos ingeridos, os nutrientes usados para a síntese do leite podem ser retirados de suas reservas corporais. A lactose é o principal carboidrato do leite da maioria dos mamíferos, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue (FREYER, 1972; FERREIRA, 1978).

Segundo JENNES e PATTON (1976), a concentração de lactose no leite situa-se entre 4,4 e 5,2 %, tendo média de 4,8% de lactose anidra. Em relação a outros açúcares, a lactose possui baixo poder adoçante e baixa solubilidade, contudo, seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem alto poder adoçante, além de outras características desejáveis.

A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas α e β , que são responsáveis pelas diferentes propriedades físicas deste açúcar. Na temperatura do corpo do animal, encontra-se em equilíbrio, duas partes de α -lactose para três de β -lactose (FREYER, 1972).

Quimicamente, a lactose é um dissacarídeo redutor constituída por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica β -1 \rightarrow 4. Por apresentar ambas moléculas forma de anel piranosídico, esta deve ser denominada propriamente de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosose (WALSTRA e JENNESS, 1984; HOLSINGER, 1988). A lactose, quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, que influi na sua solubilidade. A α -lactose é o açúcar comum do leite, o qual é obtido na forma de cristais mono-hidratados que perdem a água de cristalização a 120°C e apresenta ponto de fusão entre 201 e 202°C. A β -lactose tem ponto de fusão entre 174-176°C e é mais solúvel em água do

que o anômero α . A estrutura da β -lactose e da α -lactose são apresentadas respectivamente nas Figuras 2.2 e 2.3.

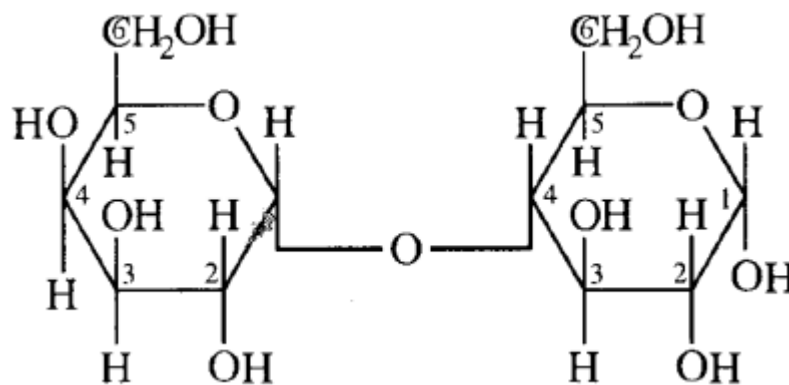


Figura 2.2 – Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose.

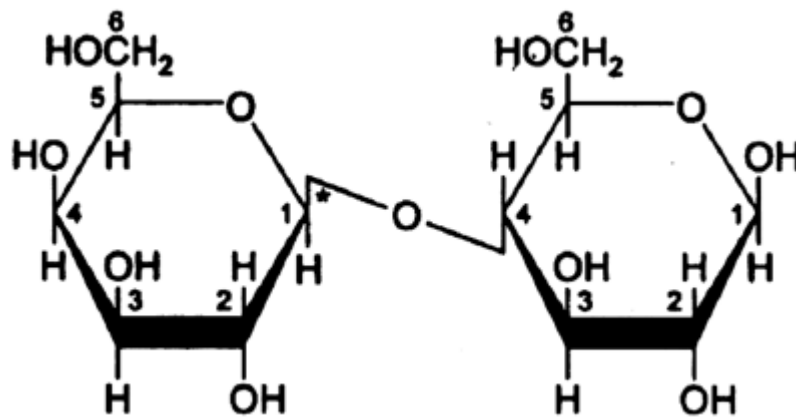


Figura 2.3 – Estrutura molecular da β -lactose

A lactose reage de acordo com as regras gerais da química de carboidratos. As reações podem incluir: (1) a ligação glicosídica entre os constituintes monossacarídeos, (2) o grupo redutor da glicose, (3) grupos hidroxil livres, e (4) ligações carbono-carbono (CLAMP *et al.* 1961; DONER e HICKS, 1982; THELWALL, 1985).

Conforme descreve NICKERSON (1974), a β -lactose dissolve-se em água até que a solução se torne saturada. Devido a mutarrotação a forma β transforma-se gradativamente na α , que é menos solúvel que a β . Assim, à medida que a β se dissolve, a α concentra-se até atingir saturação, quando tem início a formação dos cristais de α -lactose monohidratada, que são duros e pouco solúveis. A Tabela 2.1 descreve o comportamento da lactose em relação a sua solubilidade em água como uma função da temperatura.

Tabela 2.1 - Solubilidade da lactose em água.

T (°C)	α/β	Solubilidade	
		%	(glactose / 100g H ₂ O)
0	1.63	10.6	11.9
10	1.62	13.0	14.9
20	1.59	16.0	19.1
25	1.58	17.9	21.8
30	1.57	19.9	24.8
40	1.55	24.7	32.8
50	1.52	30.3	43.5
60	1.50	36.9	58.4
70	1.48	43.9	78.3
80	1.45	51.1	104.6
90	1.42	58.1	138.6

FONTE – NICKERSON (1974) *apud* Vinhal (2001).

A formação de cristais de dimensões superiores a 10 micrômetros contribui para o aparecimento de uma estrutura arenosa nos produtos lácteos. O processo de cristalização da lactose é condicionado a vários fatores, como a velocidade de mutarrotação das formas α e β , o grau de saturação da solução, viscosidade, pH e a temperatura dos produtos lácteos. A taxa de cristalização da lactose aumenta com o aumento do pH. Como a aceleração pode ser explicada pela mutarrotação, tem sido sugerido que, o pH pode influenciar nas reações de superfície dos cristais (KISKA *et al.* 1973). A taxa de formação de cristais é controlada pela intensidade de agitação, número de núcleos, sólidos totais do produto, temperatura e viscosidade (WEBB *et al.* 1974). A cristalização da lactose pode ser resumida pela equação representada na Figura 2.4.

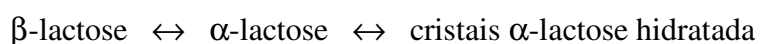


Figura 2.4. Reação esquemática da cristalização da lactose (TWIEG e NICKERSON, 1968).

O resfriamento rápido de uma suspensão concentrada de lactose contribui para a formação de um grande número de núcleos ou centros de cristalização e, o aumento da viscosidade, que dele resulta, diminui a velocidade de deslocamento das moléculas de lactose para os centros de cristalização formados (KISKA *et al.* 1973). A Tabela 2.2 apresenta o poder edulcorante de alguns açúcares e sua solubilidade em função da temperatura.

Tabela 2.2 -Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.

	Poder edulcorante	Solubilidade (massa)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	-	82	87

FONTE: ZADOW, 1984.

Com o objetivo de ampliar a utilização deste carboidrato, uma alternativa é hidrolisar enzimaticamente a lactose a seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Esta conversão por meio da enzima lactase é interessante tanto do ponto de vista tecnológico, com a finalidade de produzir um açúcar mais doce, mais facilmente fermentável e mais solúvel, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose e aumentando o período de estocagem, como do ponto de vista nutricional, possibilitando a obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digestível para pessoas com problemas relacionados à intolerância a lactose (MAHONEY, 1997). A intolerância à lactose é definida como síndrome clínica de desconforto intestinal, diarreia e flatulência, após teste com ingestão de lactose. Este teste consiste em fornecer 0,2 g de lactose por kg de massa corporal ao paciente, ministrada em solução aquosa de 20% p/v e durante as horas seguintes, amostras de sangue indicam os níveis de glicose. Nas pessoas tolerantes à lactose, a concentração de glicose no sangue aumenta, e se for intolerante essa concentração aumenta muito pouco ou não aumenta (TEIXEIRA, 2000; UNIFESP, 2002).

Há três tipos de intolerância à lactose, que são decorrentes de diferentes processos: deficiência congênita da enzima; diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais; deficiência primária ou ontogenética.

O primeiro tipo é uma falha genética muito rara, na qual a criança nasce sem a capacidade de produzir lactase. Como o leite materno possui lactose, a criança é acometida logo após o nascimento. O segundo tipo é bastante comum em crianças no primeiro ano de vida e ocorre devido à diarreia persistente, pois há morte das células da mucosa intestinal (produtoras de lactase). Assim, o indivíduo fica com deficiência temporária de lactase até que estas células sejam repostas. O terceiro tipo consiste na deficiência primária ou ontogenética. Estatisticamente, este tipo é o mais comum na população. Com o avançar da idade, existe a

tendência natural à diminuição da produção da lactase. Esse fato é mais evidente em algumas raças como a negra (até 80% dos adultos têm deficiência) e menos comum em outras, como a cor branca (20% dos adultos). A causa desta deficiência se deve à lactose não digerida continuar dentro do intestino e chegar ao intestino grosso, onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido láctico e gases (gás carbônico e hidrogênio, que é usado nos testes de determinação de intolerância à lactose). A presença de lactose e destes compostos nas fezes no intestino grosso aumenta a pressão osmótica (retenção de água no intestino), causando diarreia ácida e gasosa, flatulência excessiva (excesso de gases), cólicas e aumento do volume abdominal. Os sintomas mais comuns são náusea, dores abdominais, diarreia ácida e abundante, gases e desconforto. A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar. Em muitos casos pode ocorrer somente dor e/ou distensão abdominal, sem diarreia. Os sintomas podem levar de alguns minutos até muitas horas para aparecer. A peristaltase, ou seja o movimento muscular que empurra o alimento ao longo do estômago pode influenciar o tempo para o aparecimento dos sintomas. Apesar dos problemas não serem perigosos, eles podem ser bastante desconfortáveis (<http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm#definicao>; ROY e GUPTA, 2003).

Não há tratamento para aumentar a capacidade de produzir lactase, mas os sintomas podem ser controlados pela dieta. Nos casos em que o leite é essencial, como nos recém-nascidos com as formas congênita ou secundária da doença, a opção é o uso de leite de soja, que não tem lactose. Mas a maioria dos jovens e adultos não precisa evitar a lactose completamente. As pessoas possuem diferentes níveis de intolerância à lactose. O controle da dieta para as pessoas intolerantes depende de se experimentar os limites que cada um suporta, usando a tentativa e erro. Para aquelas pessoas que reagem à pequenas quantidades de lactose, é possível encontrar no mercado leite cuja lactose foi hidrolisada (quebrada) industrialmente. Já existe no mercado brasileiro leite UHT hidrolisado, ou com baixo teor de lactose, sendo produzido por diversas empresas. Este tipo de leite é semelhante ao leite UHT, contendo todos os nutrientes do leite, apesar de ser um pouco mais doce. Já existe também o leite hidrolisado em pó. Curiosamente, os derivados do leite de um modo geral, mesmo quando ingeridos em grande quantidade, não causam sintomas, já que as bactérias presentes nas suas fórmulas (lactobacilos) produzem lactase suficiente para a digestão da lactose. As pessoas com intolerância à lactose não necessitam de uma dieta extremamente rigorosa, basta que se tenha alguns cuidados básicos sobre o que se deve comer. Se os sintomas forem devidos só à não digestão da lactose, a substituição do leite por iogurtes e queijo e/ou a ingestão de

cápsulas de lactase podem ajudar a resolver o problema (<http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm#definicao>).

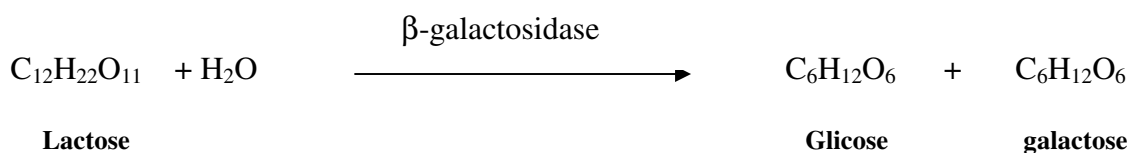
De acordo com O'CONNELL e WALSH (2006) nenhuma das preparações comerciais de lactase na forma de cápsulas, disponíveis no mercado encontram os critérios adequados para suplementação da hidrólise de lactose no trato digestivo humano com lactase como medicamento, pois são instáveis no pH estomacal. Isto justifica a importância da hidrólise antes da ingestão do alimento.

No Brasil, a característica de se buscar nichos de mercado igualmente específicos não foge à regra. Hoje, muitos países possuem uma gama de produtos com baixo teor de lactose, mas o mercado é difícil de ser dimensionado, uma vez que a intolerância à lactose é uma disfunção pouco conhecida. Sua confirmação só pode ser feita pelos médicos e a quantidade de lactose que pode ser ingerida de pessoa para pessoa pode variar muito. A tecnologia necessária para produção de leite com baixo teor de lactose já está disponível há algum tempo. O método preferencialmente utilizado hoje é a hidrólise enzimática pela adição de β -galactosidase microbiana. A lactose pode ser hidrolisada antes do tratamento térmico, ou após, se a enzima for adicionada antes do envase do produto. Ao ser adicionada ao leite, a enzima β -galactosidase efetua a quebra da molécula de lactose tal como a lactase intestinal, o que dá àqueles que possuem a deficiência desta enzima a possibilidade de usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, como a proteína, o cálcio e a vitamina A, sem os inconvenientes que a lactose possa causar. Curiosamente, o leite com lactose reduzida não tem sido preferido apenas por aqueles que possuem intolerância à lactose. A lactose é um açúcar de sabor pouco doce, o que não é o caso da glicose e galactose. A quebra da lactose em glicose e galactose pode atribuir ao leite um sabor mais adocicado, o que acaba atraindo outros consumidores (<http://fapesp.br>, TANRISEVEN e DOGAN, 2002).

2.3. Hidrólise da lactose do leite

O mecanismo de fermentação láctica é composto pela oxidação parcial anaeróbica da lactose e de outros açúcares. Desenvolve-se em várias fases, dando origem a vários produtos finais, dentre os quais destaca-se em grandes quantidades o ácido láctico.

A primeira fase da fermentação láctica consiste na hidrólise enzimática da lactose, conforme esquema a seguir.



Essa hidrólise no processo de fermentação láctica é importante nos produtos lácticos fermentados. Para hidrólise de lactose em leite com destino ao uso “in natura”, para a produção de produtos lácteos, e também para a hidrólise de lactose em soro de queijo, existem os processos catalisados por ácidos e resinas catiônica e o processo enzimático.

Quando se utilizam matérias-primas mais complexas, como no caso do leite, soro e seus permeados, disponíveis em larga escala, as rotas utilizando ácidos ou resina não são economicamente atrativas, devido à ocorrência de reações paralelas complexas (BARET, 1987). A hidrólise ácida caracteriza-se pelo baixo custo por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura (pH = 1-2, T = 100 - 150°C). Devido às suas características, a hidrólise ácida tem aplicação comercial restrita na indústria alimentícia, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de sub-produtos indesejáveis e desnaturação de proteínas (COUGHLIN e NICKERSON, 1975; MAHONEY, 1997, HAIDER e HUSSAIN, 2007).

O método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e α -D-glicose (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas (pH = 3,5 - 8,0; T = 5 - 60°C), reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do processo sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HAIDER e HUSSAIN, 2007).

A aplicação industrial das enzimas deve-se ao fato destas apresentarem alta especificidade entre enzima e substrato e possibilitar o controle de atividade da enzima mediante ajuste das condições da reação (temperatura e pH), interrompendo a reação quando necessário (SEGEL, 1993). A Tabela 2.3 compara as propriedades de soluções de lactose pura e hidrolisada.

Tabela 2.3 - Propriedades da lactose e da lactose 90% hidrolisada.

Propriedades	Lactose	Lactose hidrolisada	Referência
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	17	55	Talley e Hunger (1952)
Viscosidade (cP) de solução a 50% a 25°C	17	105	Hemme <i>et al.</i> (1979)
Fermentabilidade	Limitada	boa	-----
Taxa relativa de escurecimento	1	3.4	Pomeranz <i>et al.</i> (1962)
Doçura relativa à solução de sacarose (%)	30 - 40	65 - 90	Guy e Edmonson (1978) Amerine <i>et al.</i> (1965)
Propriedades umectantes	----	Comparável à sacarose	Shah e Nickerson (1978c)

FONTE: VINHAL, 2001.

De acordo com LOURESMA (1978), a hidrólise ocasiona modificações nas características físicas e químicas dos produtos lácteos, afetando principalmente as seguintes propriedades destes:

a) solubilidade: a lactose pura apresenta solubilidade máxima de 18% em água, a 25°C. A esta temperatura, a solubilidade da D-glicose e da D-galactose é, respectivamente, de 50% e 32%;

b) poder adoçante: a lactose é um açúcar de baixo poder adoçante quando comparada à sacarose. Já a mistura de glicose e galactose é 2 a 3 vezes mais doce que a lactose;

c) viscosidade: o produto de hidrólise da lactose mostra uma alta viscosidade, o que permite uma alta concentração de sólidos sem problema de cristalização. É possível, por exemplo, concentrar o soro ou o leite em até 70-75% de sólidos, quando normalmente 50-55% seria o limite;

d) digestibilidade: a lactose não é digerível para grande número de indivíduos. A hidrólise da lactose torna os produtos mais digeríveis, até mesmo para pessoas intolerantes a esse açúcar;

e) corpo, textura e paladar: estas propriedades são modificadas, por causa da liberação

da galactose, resultante da hidrólise. O sabor do produto fica mais acentuado;

f) **escurecimento e caramelização**: a temperaturas elevadas, e em meios com pH acima de 5, a glicose e a galactose são mais reativas que a lactose, em relação à proteínas, de 2,5 e 5 vezes mais, respectivamente.

2.4 - Enzimas

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente reações que, devido à sua grande complexidade, deveriam ser muito lentas nas temperaturas em que estas reações se processam (ao redor de 37°C). No entanto, essas reações são muito rápidas, o que leva à conclusão de que existem nas células vivas substâncias catalisadoras que diferem dos catalisadores inorgânicos pelo fato de serem substâncias muito mais complexas, produzidas pelo organismo vivo. Elas são denominadas enzimas e podem ser definidas de um modo geral como substâncias orgânicas, formadas no interior das células vivas, mas capazes de agir também fora das células. São fatores importantes na tecnologia de alimentos pelo papel que desempenham no seu processamento e deterioração (BOBBIO e BOBBIO, 1989). São catalisadores biológicos, consistindo de proteínas, as quais participam de muitas reações químicas que ocorrem no dia-a-dia. Ao contrário dos catalisadores químicos ordinários, as enzimas possuem a habilidade de catalisar uma reação sob condições brandas em soluções aquosas neutras sob temperaturas e pressões normais, e com alto grau de especificidade (CHIBATA, 1978). Como qualquer outro catalisador, uma enzima leva a reação catalisada à sua posição de equilíbrio mais rapidamente que ocorreria sem o catalisador, acelerando uma reação termodinamicamente possível sem alterar a energia livre de Gibbs (ΔG) nem a constante de equilíbrio (K_{eq}).

As enzimas tem sido objeto de intensos estudos acadêmicos por longas décadas por ser considerada um importante catalisador industrial (RESHMI *et al.* 2007). Quimicamente as enzimas são proteínas com uma estrutura tridimensional contendo um centro ativo e algumas vezes um grupo não protéico denominado grupo prostético (cofator ou coenzima). À molécula toda (apoenzima e grupo prostético) é dado o nome de holoenzima. As enzimas são substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez seja a propriedade mais importante desses compostos em relação à tecnologia de alimentos (BAILEY, 1986, EMREGUL *et al.* 2006)

Com o rápido crescimento de produtos industrializados e o desenvolvimento tecnológico, novas prioridades estão sendo estabelecidas para promover o aumento na qualidade e no tempo de conservação dos alimentos. Nos últimos anos, o uso comercial de enzimas tem expandido, de um papel insignificante, para um importante aspecto do processamento de alimentos. Neste contexto, a Indústria Alimentícia passou a introduzir novas técnicas em sua linha de fabricação, utilizando a catálise biológica, envolvendo enzimas e outros compostos que fossem capazes de conferir aos alimentos, algumas propriedades importantes do ponto de vista comercial, tais como antioxidantes, aromatizantes, e adoçantes (REED e NAGODAWITHANA, 1993; MARIOTTI, 2000).

A adição de enzimas aos produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de rações contribui modificando matérias-primas ou obtendo produtos específicos, destacando-se os usos em panificação, na modificação de materiais amiláceos, na fabricação de sucos de fruta, na modificação de proteínas, na fabricação de bebidas alcoólicas e de laticínios (VITOLLO, 2001). As enzimas são proteínas altamente especializadas, atuando como catalisadores de sistemas biológicos muito potentes e eficazes. As enzimas vêm se tornando uma poderosa ferramenta catalítica em uma vasta variedade de processos químicos (PEREIRA *et al.* 2003). A principal característica de uma enzima é a sua elevada especificidade, fato este relacionado à sua complexa conformação tridimensional. Devido a isto, sua estrutura favorece processos envolvendo oxidações, condensações, hidroxilações ou hidrólises muito específicas (MARIOTTI, 2000). Cada enzima tem um sítio catalítico ou sítio de ligação, na qual uma parte ou toda a molécula do reagente pode se ligar. Quando o substrato se fixa ao sítio catalítico, forma-se uma combinação temporária chamada de complexo enzima-substrato. Quando o substrato se liga à enzima, ele fica exposto ao sítio ativo da mesma, onde os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima agem sobre a molécula do substrato, enfraquecendo as ligações e assim favorecendo a ruptura e formação de novas ligações, transformando-a em produto (BAILEY, 1986). A reação é catalisada pelo “ataque” destas cadeias laterais da enzima numa ligação da molécula de substrato.

Uma enzima de bastante aplicação da indústria de alimentos é a β -galactosidase (lactase), muito utilizada, tanto no processamento de leite, como de seus derivados lácteos. O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase, é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as β -galactosidases são

também galacto-transferases, enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos, constituindo assim, importantes pesquisas na última década (REUTER *et al.* 1999; ALMEIDA e PASTORE, 2001, JURADO *et al.* 2002).

2.5 – Enzima β -galactosidase

Popularmente conhecida como lactase ou formalmente como β -D-galactosideo-galactohidrolase, é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; MAHONEY, 1997; DASHEVSKY, 1998; BRENA *et al.* 2001; JURADO *et al.* 2002; DI SERIO *et al.* 2003; JURADO *et al.* 2004). A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc) para formar glicose e galactose, dois monossacarídeos que são mais doces, mais solúveis e mais digestivos do que a lactose (TANRISEVEN e DOGAN, 2002), menos propícios à cristalização e possuindo uma melhoria em suas propriedades umectantes, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactooligossacarídeos (MAHONEY, 1997; MARQUEZ *et al.* 2003). Enquanto todas as lactases são β -galactosidases, o inverso não é verdadeiro, uma vez que muitas β -galactosidases de células de plantas e órgãos de mamíferos, que não o intestino, têm pouca, ou até mesmo nenhuma atividade sobre a lactose, que não é o seu substrato específico (VINHAL, 2001).

A lactose é um carboidrato abundante em leites, a única fonte natural significativa deste açúcar. A hidrólise enzimática da lactose é um importante processo biotecnológico na indústria alimentícia, devido ao seu efeito benéfico em alimentos que contém lactose, como também as vantagens tecnológica e ambientais de aplicação industrial como (JURADO *et al.* 2002):

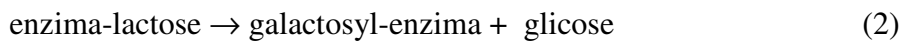
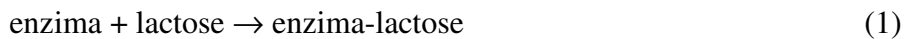
- Eliminação da intolerância à lactose (3 a 70% da população dependendo do grupo populacional) incentivando a utilização da lactose como fonte de energia, tanto quanto a assimilação cálcio e magnésio a partir do leite;
- Formação de galacto-oligossacarídeos durante a hidrólise da lactose, que favorece o crescimento bacteriano da microflora intestinal. A presença destes componentes é considerada desejável em alimentos;
- Melhoria das características tecnológicas e sensoriais dos alimentos contendo lactose hidrolisada à partir do soro ou do leite, tais como: aumento da solubilidade (evitando

a cristalização da lactose e o granulamento dos sorvetes e produtos condensados ou pulverizados); melhor poder adoçante e ainda redução do conteúdo calórico dos produtos, maior facilidade na produção de iogurtes, diminuição do ponto de congelamento de sorvetes, aumento da maciez e cremosidade.

- Melhor biodegradabilidade do soro no qual a lactose foi hidrolizada.

2.5.1. Mecanismo de ação da lactase

Embora estejam disponíveis na literatura vários trabalhos sobre a cinética de várias fontes de lactase, sobre o seu mecanismo de ação pouco se sabe. A ação da β -galactosidase pode ser descrita por um esquema mecanístico geral, envolvendo um mínimo de três etapas, as quais envolvem tanto reações de hidrólise, como reações de transferência do grupo galactosil, esquematizados da seguinte maneira (MAHONEY, 1997):



A Figura 2.5 apresenta um esquema do mecanismo de ação da lactase de natureza transgalactosídica.

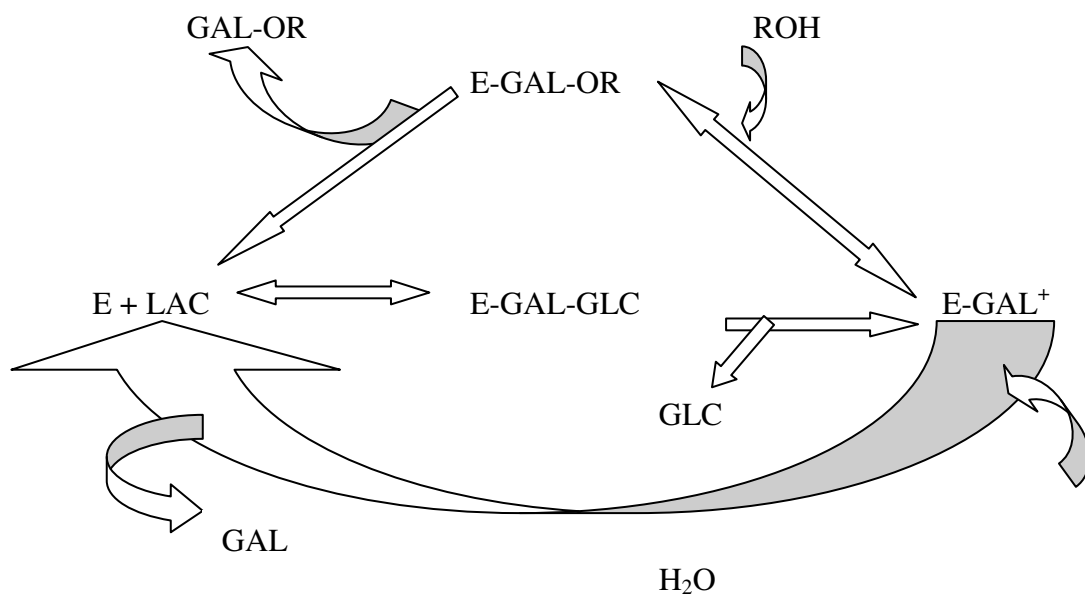


Figura 2.5- Mecanismo de reação proposto para a ação da β -galactosidase sobre a lactose. LAC, lactose; GAL, galactose; GAL+, estado de transição da galactose; GLC, glicose; ROH, açúcar receptor; GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeos).
FONTE: MAHONEY, 1998.

Se o acceptor é a água, ocorre a formação de galactose por hidrólise. Quando o acceptor é um açúcar, o resultado é a formação de galactosil-oligossacarídeo. Observa-se pelo mecanismo que a enzima transfere galactose a aceptores nucleofílicos contendo um grupo hidroxil. A transferência para a água produz galactose; a transferência para outro açúcar produz di, tri e galactosil-sacarídeos superiores, termos coletivamente denominados oligossacarídeos. Esses por sua vez se torna substrato para a enzima e são hidrolisados lentamente. Na Figura 2.5, a transferência do grupo galactosil é uma reação geral e a hidrólise pode ser vista como um exemplo especial de transferência do grupo galactosil para água. Na maioria das condições, a hidrólise predomina devido a alta concentração de água e a produção de oligossacarídeos é baixa. O rendimento de oligossacarídeos pode ser aumentado pelo uso de altas concentrações de substrato (acceptor) e/ou pelo decréscimo do conteúdo de água (MAHONEY, 1997).

Portanto, a lactase ou β -D-galactosidase não é ativa apenas com seu substrato natural, a lactose, mas também com outros substratos que contenham a ligação β -D-galactosídica. A lactase enquanto promove a hidrólise da lactose, pode ao mesmo tempo realizar uma reação de transferência. Nesse caso, em vez da água, é outra molécula de açúcar que se liga à β -D-galactose. Este princípio de transferência é o responsável pelos oligossacarídeos presentes durante e após a hidrólise (BOUVY, 1974). A formação de oligossacarídeos é mais acentuada nas concentrações maiores de lactose e a habilidade para a lactase atuar dependerá da ligação formada (Informativo HA-LA BIOTEC, 1995a).

A concentração de oligossacarídeos depende da sua velocidade relativa de formação e decomposição por hidrólise. Conseqüentemente, os níveis variam com as mudanças do grau de hidrólise da lactose que ocorrem durante a reação, em conseqüência dos diferentes níveis de receptores.

A enzima funciona de modo análogo a lisosima, ou seja, há um grupo o qual atua como um ácido geral e, portanto doa um próton ao oxigênio glicosídico e um outro grupo, negativamente carregado, que atua estabilizando um intermediário galactosil-enzima, carregado positivamente, para a reação com a água (SINNOTT, 1978).

2.5.2 – Atividade de transferase da lactase

O mecanismo da ação da enzima descrito na Figura 2.5 indica que a mesma pode transferir galactose aos receptores nucleofílicos contendo um grupo hidroxila. Quando o

receptor é a água, o resultado é galactose; quando o receptor é um outro açúcar, o resultado é di-, tri- e sacarídeos maiores chamados de forma coletiva de oligossacarídeos. Uma vez que todos os açúcares presentes podem atuar como receptores, o resultado é uma mistura complexa (MAHONEY, 1998).

Trabalhos indicam que β -galactosidases de diferentes fontes resultam em diferentes quantidades e natureza dos oligossacarídeos. Outros parâmetros principais que influenciam na formação de oligossacarídeos são o tempo de reação, a concentração e a natureza do substrato. No caso da enzima de *Escherichia coli*, ela também é afetada pelo pH, concentração de Mg^{2+} e configuração anomérica da lactose (HUBER *et al.*, 1976). A quantidade de oligossacarídeos foi maior utilizando soluções de lactose tamponada, para acompanhamento da reação de hidrólise, quando comparado com a produzida com leite utilizado como meio reacional (KWOK e JEON, 1986; ZARATE e LOPEZ-LEIVA, 1990).

Em geral, a quantidade total de oligossacarídeos formados varia de 1 a 45% dos açúcares totais presentes (PRENOSIL *et al.* 1987; ZARATE e LOPEZ-LEIVA, 1990). Entre as enzimas de interesse comercial, a β -galactosidase de *Aspergillus niger* produz menos oligossacarídeos que a originada do *Aspergillus oryzae* e a de *Kluyveromyces lactis* produz menos do que a de *Kluyveromyces fragilis* (SMART, 1990).

Segundo trabalhos de ROBERTS e PETTINATI (1957); HUBER *et al.* (1976) e BURVALL *et al.* (1979), para uma dada lactase, o nível de oligossacarídeos aumenta com a concentração do substrato lactose. A uma concentração inicial de lactose em torno de 15-30%, encontrou-se um nível máximo de oligossacarídeos em torno de 40% dos açúcares totais presentes (PRENOSIL *et al.* 1987).

Em baixos níveis de lactose, tal como no leite e no soro, a atividade transferase é reduzida, mas níveis máximos de oligossacarídeos podem ainda atingir 25% dos açúcares totais com lactases a pH-neutro (GREENBERG e MAHONEY, 1983). Valores menores de oligossacarídeos, aproximadamente 5% têm sido encontrados na literatura, onde somente tri e sacarídeos maiores foram detectados (BURVALL *et al.* 1979).

Além dos aspectos teóricos citados acima, existe um grande número de conseqüências práticas da formação de oligossacarídeos. A baixa solubilidade dos oligossacarídeos pode causar problemas de cristalização durante a estocagem de xaropes concentrados obtidos pela hidrólise de soluções concentradas de lactose, tal como o permeado do soro, com enzimas a pH-neutro (VINHAL, 2001; GAUR *et al.* 2006).

GREENBERG e MAHONEY (1983), realizando hidrólise da lactose no leite a 37°C com β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus*, obtiveram as conclusões descritas a seguir. Os níveis de oligossacarídeos são maiores quando o grau de hidrólise da lactose está na faixa de 50-90%, que geralmente é uma faixa de interesse para as indústrias de laticínios. A eliminação completa dos oligossacarídeos somente pode ser atingida através do prolongamento do tempo de reação, quase o mesmo tempo gasto para hidrolisar 90% da lactose, o que aumenta o custo de processamento. Conclusões similares são descritas por JEON e MANTHA (1985), utilizando β -galactosidase de leveduras. Em processos batelada, isso pode ser facilmente feito, contudo, em processos contínuos usando enzimas imobilizadas, isso é uma desvantagem em comparação ao uso de lactases livres em solução.

Portanto, na atualidade, a maior desvantagem da hidrólise enzimática da lactose é, além do custo relativamente alto da enzima, a produção de oligossacarídeos pela atividade transferase. Isso pode ser minimizado pela escolha apropriada da enzima e das condições de processo (VINHAL, 2001).

2.5.3 - Fontes de β -Galactosidase

As β -galactosidases são encontradas em seres animais (em órgãos como intestino, cérebro, testículos, placenta), em microrganismos (como fungos filamentosos, bactérias e leveduras) e em vegetais (amêndoas, pêssego, damasco, maçã) sendo suas características e condições operacionais de temperatura e pH variáveis conforme a sua origem. Quando obtida de leveduras, como por exemplo, *Kluyromyces marxianus*, *Kluyromyces fragilis* e *Kluyromyces lactis*, são intracelulares, e suas sínteses são induzidas por lactose e galactose e reprimidas pela glicose, sendo produzidas na sua maioria por fermentação em cultura submersa. As possíveis fontes de lactases microbianas mais conhecidas, segundo GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985, são:

Leveduras: *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cândida pseudotropicalis*, *Brettanomyces anomalis* e *Wingea roberstii*.

Fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenus*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Alternaria palmi*, *Curvalaria anaegualis*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria alternata*.

Bactérias: *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Thermus aquaticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus sp.* e *Lactobacillus sporogenes*.

Em 1990, CASTILLO identificou a levedura *Kluyveromyces lactis* como fonte de lactase para a hidrólise enzimática da lactose presente no soro de queijo (BECERRA *et al.* 2001). As preparações comerciais de lactases de origem microbiana são as fontes mais aceitáveis para produção e aplicação industrial. Produzidas por fermentação, tiveram expansão significativa, pois permitiram facilidade de obtenção, flexibilidade e controle das condições dos processos de produção (concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e de células), além de baixo custo, curto ciclo reprodutivo e manipulação genética, favorecendo a obtenção de enzimas com maior especificidade (ALMEIDA e PASTORE, 2001; CASTRO BRAVO *et al.* 2000). As lactases apresentam diferenças marcantes em várias de suas propriedades, tanto químicas como cinéticas, como resultado das diferentes fontes. Como exemplo das diferenças das enzimas de diferentes microrganismos, pode-se citar as lactases produzidas pela bactéria *Escherichia coli*, cujo peso molecular varia entre 520.000 a 850.000 Daltons, quando comparado aos 201.000 e 90.000 Daltons da *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Muitos estudos têm sido feitos com β -galactosidase obtida de *Escherichia coli*, apesar de seu uso não ser viável para produtos com fins de consumo humano, pois possuem fatores de toxidade associados com coliformes, tornando improvável o uso do isolado bruto desta enzima em processos alimentícios (JURADO *et al.* 2002; MARIOTTI, 2000). A Tabela 2.4 ilustra algumas fontes comerciais de lactase, juntamente com seus respectivos fornecedores.

Tabela 2.4 - Fontes comerciais de β -galactosidasas para hidrólise da lactose.

Organismo	Nome comercial	Fornecedor
<i>Bacillus spp.</i>	Novozym 231	Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Denmark
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact	Gist-Brocades, Delft, The Netherlands
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactozyme	Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Denmark
<i>ou marxianus</i>	Hydrolact	Jonh Sturge, Selby, UK

Continuação da Tabela 2.4

<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral lactase	Pfizer, Milwaukee, USA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Prozyn® Lactase	Prozyn Ind. E Com. Ltda, Brasil
<i>Aspergillus niger</i>	Lactose niger	Rapidase, Seclin, France
	Fungal lactase	Enzyme Development Corporation, New York, USA
<i>Aspergillus oryzae</i>	Biolactase	Biocon (US) Inc., Lexington, MA, USA
	Lactase 2214C	Rohm, Darmstaar, Germany

FONTE: VINHAL, 2001.

Convém salientar que embora uma extensiva tecnologia tenha sido desenvolvida usando essas enzimas, existe ainda uma grande procura por enzimas com propriedades superiores, tais como melhor estabilidade térmica a pH neutro, ou boa atividade a baixas temperaturas. Algumas fontes, originadas de microrganismos termófilos são muito interessantes em relação a termoestabilidade da enzima. Enzimas termoestáveis, capazes de permanecer com sua atividade a temperaturas maiores ou iguais a 60°C por prolongados períodos, têm as vantagens de maiores conversões, ou menores tempos de residência para uma dada taxa de conversão, além de serem menos susceptíveis a contaminação microbiológica (VINHAL, 2001; HAIDER e HUSAIN, 2007). Os microrganismos podem ser freqüentemente induzidos para atingir alta produção e são as fontes preferidas para grande parte das enzimas. Bactérias, fungos e leveduras são boas fontes de lactase, entretanto, as propriedades da enzima microbiana variam consideravelmente conforme a Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Propriedades da enzima microbiana

FONTE	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Peso molecular (Da)
<i>Aspergillus niger</i>	3 – 4	2,5 – 8	Nenhum	55 - 60	124000
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	3,5 – 8	Nenhum	50 – 55	90000
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5 – 7,5	Mn ⁺² , K ⁺	37	201000
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	7 – 7,5	Mn ⁺² , Na ⁺	35	135000
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6 – 8	Na ⁺ , K ⁺	40	540000

Continuação da Tabela 2.5

<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	n.d	n.d	55	540000
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	n.d	Nenhum	60	n.d

FONTE: GREENBERG, MAHONEY, 1981; modificado de GEKÁS e LOPES-LEIVA, 1985. (n.d = não disponível).

As β -galactosidases provenientes das leveduras *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* são intracelulares, induzidas por lactose e galactose e produzidas na sua maioria por fermentação em cultura submersa. Com o pH ótimo concentrado na região neutra, elas são bem adaptadas para hidrólise da lactose do leite. Entretanto, ambas as enzimas são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio no leite e pequenas concentrações de sódio. São também inibidas pela galactose (REED e NAGODAWITHANA, 1993; NUNES *et al.* 1993; LADERO *et al.* 2000). As enzimas de leveduras podem ser obtidas em grandes quantidades pela fermentação do soro de queijo e são relativamente baratas e apresentam temperatura ótima de atividade na faixa de 30 a 40°C, sendo uma desvantagem, pois, facilita a contaminação microbiana, sendo aconselhável, assim, um período curto de hidrólise, de 2 a 3 horas (MAHONEY, 1997).

Enquanto as preparações enzimáticas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces sp.* são usadas em processos alimentícios e, portanto, consideradas como organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA, a lactase bacteriana produzida de *Escherichia coli*, embora, bastante pesquisada, apresenta problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes. As β galactosidases de *Aspergillus* são preferidas para a hidrólise da lactose do soro de leite devido ao seu pH ótimo ácido e alta estabilidade térmica (HATZINIKOLAOU *et al.* 2005). Na Tabela 2.6 são apresentadas as principais β -galactosidases (lactases) encontradas no mercado, seus nomes comerciais, a fonte de extração, o pH e temperatura ótima para sua utilização e a atividade enzimática de cada enzima.

Tabela 2.6 - Principais lactases comerciais e suas propriedades

Lactase (nomes comerciais)	fonte	substrato	pH ótimo	Temp.	Unidades de atividade*
Enzeco fungal lactase	<i>A. oryzae</i>	lactose	4,5-5,0	55	100.000 FCC/g
Enzeco lactase	immobilized <i>A. oryzae</i>	-	4,5-5,0	50	2.000 ILU/g

Continuação da Tabela 2.6

Yeast lactase L 50.000	<i>K. lactis</i>	Lactose	6,0	45	50.000 ONPG units/g
Funga lactase L 100.000	<i>A. oryzae</i>	Lactose	4,5-5,0	50-55	100.000 FCC/g
Lactozyme 3000 L	<i>K. marxianus</i>	Lactose	6,5	37	3.000 LAU/ml
Lactase F	<i>A. oryzae</i>	Lactose	4,5	55	14.000 FCC/g
Neutral lactase	<i>K.. lactis</i>	Lactose	6,0	45	8.000 ONPG units/g
Biolactase	<i>A. oryzae</i>	-	4,5-5,0	55-60	30.000 FCC/g
Maxilact L2000	<i>K.. lactis</i>	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	2.000 NLU/g
Maxilact LX5000	<i>K.. lactis</i>	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	5.000 NLU/g
Neutral lactase	<i>K.. lactis</i>	-	6,5	37	3.100 ONPG units/g

• FCC, Federal Chemistry Codex Lactase Units; ILU, Internacioanl Lactase Units; NLU, Neutral Lactase Units; LAU, Lactase Activity Units.

FONTE: PIVARNIK *et al.*, 1995.

2.5.4 - Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas

O pH também exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Os vários aminoácidos que compõem a proteína possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são frequentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim a enzima para estar cataliticamente ativa só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. A taxa da reação aumenta com pH até um valor ótimo a partir do qual a taxa decresce, ou devido à desnaturação ou a existência de estados de ionização inadequados (SEGEL, 1993; DIXON e WEBB, 1979, ZHOU e CHEN, 2001, DAVID *et al.* 2006). O efeito do pH nas reações enzimáticas se deve à ionização do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas. Esses efeitos, são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudanças no equilíbrio da reação (REED, 1993).

O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como a temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração de substrato, cofatores e concentração de enzimas. Em muitos casos o substrato pode induzir à mudança conformacional da enzima para uma forma que é mais resistente ou menos resistente ao pH e à temperatura de desnaturação. Os sítios ativos das enzimas são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis que se encontram numa forma iônica adequada para ligar ao substrato ou catalisar a reação. Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. A queda na atividade das enzimas pode ser devido à constituição de formas iônicas impróprias do substrato ou da enzima, ou ambos, ou como conseqüência da desativação das enzimas ou combinação desses efeitos (SEGEL, 1993).

A ação catalítica de uma enzima numa reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. No entanto, se uma enzima atua sobre mais de um substrato, os valores de pH ótimo variam. Valores extremos de pH, em geral, desnaturam as proteínas, inativando-as (BOBBIO e BOBBIO, 1989). A faixa de pH de maior atividade das lactases pode variar de 2,0 até 10,0 e muitas atuam em pH próximo do neutro, como no caso da lactase de *Kluyveromyces fragilis*. A mesma enzima isolada de fontes diferentes, pode exibir valores diferentes de pH ótimos, provavelmente refletindo a necessidade fisiológica do organismo de onde a enzima foi isolada (REED, 1993). Além disso, a técnica pela qual as preparações enzimáticas comerciais são elaboradas, como exemplo o tampão utilizado, podem influenciar diretamente em suas propriedades. Um resumo geral das propriedades das lactases em relação ao pH é mostrado na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Lactases de várias fontes em relação ao pH ótimo e temperatura para atividade máxima.

Tipo de Lactase	pH ótimo
<i>Bacillus spp (stearothermophilus)</i>	pH neutro
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,5 < pH < 7,0 a 40-45°C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,6 < pH < 6,8 a 35°C
<i>Aspergillus niger</i>	4,0 < pH < 5,0 a 35°C
<i>Aspergillus oryzae</i>	2,5 < pH < 4,5 a 35°C

FONTE: REED, 1993.

2.5.5 - Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

Na maioria das reações químicas ocorre o aumento da sua velocidade com a elevação da temperatura. Um aumento na temperatura implica maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas se comportam, até certo ponto, de forma semelhante às outras reações (ZHOU e CHEN, 2001).

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com a temperatura, até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Sob condições específicas, a temperatura ótima para cada reação pode ser determinada. O efeito da temperatura é muito complexo e pode ser devido a várias causas. Inicialmente, com o aumento de temperatura, a atividade molecular é aumentada, contribuindo conseqüentemente para a formação do complexo enzimático; no entanto, com o aumento contínuo da temperatura, poderá haver uma inativação gradativa da enzima, até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor (BOBBIO e BOBBIO, 1989; BAILEY, 1986; RIBEIRO, 1989, ZHOU e CHEN, 2001).

As enzimas são moléculas protéicas complexas, cuja atividade catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estereo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. Se a molécula absorve muita energia, a estrutura terciária rompe-se e a enzima ficará desnaturada, isto é, perde a atividade catalítica. Logo, à medida que a temperatura cresce, o aumento esperado na taxa de reação pode, às vezes, não ocorrer devido à desnaturação da enzima. A temperatura ótima depende do tempo escolhido para a realização das medidas (VINHAL, 2001; HAIDER e HUSSAIN, 2007).

Segundo ROOS e KAREL (1991), a desnaturação térmica é uma das causas da perda da atividade enzimática. A forma nativa (ativa) tem uma estrutura enovelada, na qual os sítios hidrofóbicos estão localizados dentro da molécula da proteína, e a desnaturação é uma fase de transição de primeira ordem durante a qual a estrutura nativa da proteína é alterada.

A melhor temperatura de operação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo. Essa temperatura pode ser facilmente estabelecida pela pré-incubação da enzima em várias temperaturas, determinando-se posteriormente a atividade residual em condições padrão. A temperatura de melhor operação da enzima depende de outros fatores como pH, força iônica do meio e presença ou ausência de ligantes (SEGEL, 1993).

A relação entre a constante de velocidade de reação e a temperatura é descrita pelo modelo de Arrhenius, representado pela Equação 2.1. O intervalo de validade do referido modelo é limitado, pois qualquer temperatura significativamente superior àquela do ambiente biológico natural, pode desnaturar a enzima (BAILEY, 1986).

$$k = Z \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right) \quad (2.1)$$

Onde: k = constante da taxa da reação na fase de ativação térmica
 Z = fator de frequência de colisões favoráveis entre reagentes
 E_a = energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima
 T = temperatura absoluta
 R = constante da lei dos gases

Para muitas proteínas, a desnaturação começa a ocorrer entre 45°C e 50°C. O mecanismo físico para este fenômeno é assim explicado: quando a temperatura aumenta, os átomos da molécula de enzima possuem muita energia e alta tendência a se mover. Eventualmente, elas atingem energia suficiente para sobrepor às fracas interações da estrutura globular da proteína e ocorre a desativação. O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. A estabilidade das enzimas é um dos fatores primordiais na determinação da possibilidade de sua aplicação em muitos processos biotecnológicos (COLAÇO *et al.* 1992). Normalmente a cinética de desativação térmica de primeira ordem é suficiente para descrever o comportamento da atividade com o tempo de operação (HENLEY e SADANA, 1985). A estabilidade térmica de enzimas é importante para definir condições práticas para suas aplicações em biotecnologia e processamento de alimentos (SCHEBOR *et al.* 1997). Na maioria dos estudos de desativação térmica de enzimas, considera-se cinética de primeira ordem para relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura (RIBEIRO, 1989). Supondo desativação de primeira ordem, utiliza-se dos modelos propostos pela Equação 2.2

$$\frac{-dE}{dt} = k_d \cdot E \quad \text{ou} \quad \frac{-1}{E} \cdot \frac{dE}{dt} = k_d \quad (2.2)$$

Onde E é a concentração de enzima ativa (ou atividade) e k_d é a constante de desativação térmica (ou taxa específica de desativação térmica). Integrando-se a Equação 2.2, sujeita à condição $t = 0, E = E_0$, obtém-se a equação 2.3:

$$-\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = k_d \cdot t \quad \text{ou} \quad E = E_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (2.3)$$

Um conceito comum em cinética química e enzimática é o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que a atividade relativa da enzima (E/E_0), da Equação 2.3, seja igual a 0,5, ou seja, o tempo necessário, a uma temperatura T , sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. O tempo de meia vida $t_{1/2}$, expresso na Equação 2.4 pode ser relacionado com a constante de desativação k_d , pela Equação 2.4:

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.4)$$

HENLEY e SADAN (1985), através de uma revisão na literatura disponível, verificaram que a taxa de decréscimo em atividade não é sempre constante. Esses autores classificaram as curvas de desativação em dois casos. Num deles, a atividade é sempre menor que a inicial e no outro, a atividade pode ser maior que a inicial num período de tempo e propõem uma cinética de desativação em série e agrupam os casos de desativação em diferentes categorias. O modelo de desativação térmica em série está representado nas Equações 2.5 e 2.6:



$$-\frac{dE}{dt} = k_1 \cdot E \quad \text{ou} \quad E = E_0 \cdot \exp(-k_1 \cdot t)$$

$$\frac{-dE_1}{dt} = k_2 E_1 - k_1 \cdot E \quad (2.6)$$

Substituindo-se a Equação 2.5 em 2.6, obtém-se a Equação 2.7

$$\frac{-dE_1}{dt} = k_2 E_1 - k_1 E_0 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (2.7)$$

Integrando-se a Equação 2.7, com a condição inicial $t=0$ e $E_1=0$, obtém-se a Equação 2.8.

$$E_1 = \frac{k_1 \cdot E_0}{k_2 - k_1} \cdot [\exp(-k_1 \cdot t) - \exp(-k_2 \cdot t)] \quad (2.8)$$

E ainda

$$E_2 = E_0 - E - E_1 \quad (2.9)$$

e substituindo as Equações 2.2 e 2.8 em 2.9, obtém-se a Equação 2.10

$$E_2 = E_0 \left[1 - \exp(-k_1 t) - \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot \exp(-k_2 t) \right] \quad (2.10)$$

A atividade total resultante num determinado tempo, pode ser proveniente das três diferentes formas da enzima E, E₁ e E₂, que são estados da enzima com diferentes atividades específicas. A atividade relativa total A pode ser escrita na forma da Equação 2.11:

$$A = \frac{E + \alpha_1 E_1 + \alpha_2 E_2}{E_0} \quad (2.11)$$

sendo α_1 e α_2 as razões de atividade específicas, $\frac{E_1}{E}$ e $\frac{E_2}{E}$ respectivamente; k_1 e k_2 são constantes de velocidade da taxa de desativação de primeira ordem. Substituindo-se as Equações 2.2, 2.8 e 2.10 em 2.11, obtém-se a Equação 2.12, que representa a forma geral da atividade relativa em relação ao tempo:

$$A = \left[1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_1}{k_2 - k_1} \right) (\alpha_1 - \alpha_2) \exp(-k_2 t) + \alpha_2 \quad (2.12)$$

O estado intermediário E₁ e o estado final E₂ são ambos homogêneos. Este modelo considera duas etapas de primeira ordem irreversíveis na presença da enzima ativa (E), tanto quanto as espécies modificadas (E₁ e E₂), sendo estas com atividades específicas diferentes da enzima na sua forma nativa (JURADO *et al.* 2004). BRENA *et al.* (2003), estudaram a estabilidade térmica de β -galactosidases de *E. coli* e *K. lactis* e utilizaram o modelo de cinética de segunda ordem. Da Equação 2.12, se $\alpha_2 > 1$, pode-se obter atividade superior à inicial num determinado período de tempo. Se α_1 e α_2 forem nulos, o modelo será de primeira ordem. Caso k_2 seja igual a zero, a Equação 2.12 se reduz à 2.13, denominada modelo de desativação de uma única etapa:

$$A = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t) + \alpha_1 \quad (2.13)$$

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que se encontra a enzima, se está imobilizada e/ou complexada a outro componente e ainda pode ser influenciada pela própria concentração do substrato.

A forma de Arrhenius para a desativação térmica é interessante do ponto de vista de interpolação de dados de k_d , na faixa de temperatura de suas determinações, e ainda para avaliar dados de k_d para temperaturas inferiores, visto que, para baixas temperaturas, o procedimento experimental é de difícil obtenção (AYMARD e BELARBI, 2000). A constante de desativação térmica k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.14.

$$k_d = k_{d0} \cdot \exp\left(\frac{-E_d}{R \cdot T}\right) \quad (2.14)$$

A Equação 2.14 na forma linearizada pode ser representada pela da Equação 2.15, na qual é possível determinar a energia de ativação do fenômeno de desativação térmica da enzima estudada.

$$\ln(k_d) = \ln(k_{d0}) - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.15)$$

Onde: k_d = constante da taxa da reação de desativação térmica à temperatura T;
 k_{d0} = constante de proporcionalidade;
 E_d = energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima;
T = temperatura absoluta;
R = constante da lei dos gases.

Seguindo a lei de Arrhenius, CHANG e JUANG (2005) determinaram a desativação térmica das enzimas α -amilase, β -amilase e glucoamilase, na forma imobilizada e na livre por uma descrição da equação cinética de pseudo-primeira-ordem.

Em uma reação enzimática o aumento da temperatura leva a um aumento da taxa de reação até atingir um máximo correspondente à “temperatura ótima”, depois decresce rapidamente devido à desnaturação da enzima. Na determinação desta temperatura ótima deve-se tomar cuidado para que a atividade da enzima seja constante pelo menos durante a realização do experimento, pois caso contrário tem-se dois efeitos, o aumento da taxa da reação e a desnaturação da enzima (SEGEL, 1979).

A estabilidade térmica da enzima depende do meio em que ela se encontra e depende do pH, concentração de substrato, presença de estabilizadores e também se está na forma livre ou imobilizada (BAILEY, 1986).

2.6 – Imobilização de enzimas

Apesar das inúmeras vantagens das enzimas como catalisadores, o uso das mesmas em aplicações industriais na forma livre tem sido limitado, porque a maioria das enzimas são relativamente instáveis, seu custo é alto e a recuperação da enzima ativa no processo final é difícil. As principais desvantagens da aplicação das enzimas livres em processos industriais são devidas (MARIOTTI, 2000, DAVID *et al.* 2006):

- À baixa estabilidade nas condições de operação;
- Ao elevado custo de obtenção e,
- À dificuldade de separação da mesma do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos).

Nos processos com enzima livre, a mesma deixa o reator juntamente com o produto, não sendo possível a sua reutilização, sendo necessário adicionar mais enzima para uma outra batelada de processo, contribuindo assim para aumentar seu custo. O uso de enzimas em processos industriais é relativamente baixo, o que se deve ao seu alto custo, à dificuldade de recuperação da mesma no final do processo e ainda à sua instabilidade (KENNEDY e CABRAL, 1987, ÖZDURAL *et al.* 2003, RESHMI *et al.* 2007).

O desenvolvimento e conhecimento de proteínas e avançadas técnicas de imobilização tem aumentado o uso de enzimas em reações particulares, principalmente, devido à possibilidade de recuperação das mesmas (DAVID *et al.* 2004). Uma das maneiras de torná-las mais ativas e estáveis é a imobilização (LOURENÇO e MAUGERI FILHO, 2003).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzimas data do início do século XX, quando NELSON e GRIFFIN (1916) adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose, embora o objetivo destes pesquisadores fosse a purificação da enzima.

CHIBATA (1978) define enzimas imobilizadas como: “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. De acordo com esta definição, enzimas modificadas para uma forma insolúvel em água por uma técnica adequada

satisfaz a definição de enzimas imobilizadas. O termo enzima imobilizada foi adotado na 1ª conferência de Engenharia Enzimática, realizada em Henniker, New Hampshire, USA, em 1971.

Durante as últimas décadas tem surgido grande interesse na tecnologia de imobilização das enzimas, que permite uma maior utilização (reuso) em muitos processos biológicos caros comparados com a enzima em solução, dando a chance de operar em um sistema contínuo pelo fato de operar em colunas empacotadas. A viabilidade comercial dos processos que utilizam enzimas imobilizadas tem sido avaliada levando em consideração o custo e a eficiência. O baixo custo do material de suporte combinado com uma boa retenção da atividade enzimática e um longo período de trabalho, são fatores relevantes na determinação da viabilidade do sistema (RUBIOLO e CARRARA, 1997).

Com o objetivo de se aproveitar as vantagens da catálise biológica em relação aos catalisadores inorgânicos e principalmente superar as deficiências mencionadas quanto a utilização das enzimas em processos industriais, foram desenvolvidos métodos com o intuito de fixar a enzima a suportes sólidos, tornando-as insolúveis no meio reacional. Estas pesquisas resultaram nas enzimas imobilizadas, altamente específicas para determinado substrato, mais estáveis e facilmente separáveis do produto ao final do processo, simplificando as etapas de purificação e proporcionando vantagens econômicas. As principais vantagens da utilização das enzimas imobilizadas com relação às solúveis, são (MARIOTTI, 2000, BERGAMASCO *et al.* 2000; AKGOL *et al.* 2001; GÜRSEL *et al.* 2003; GÓMEZ *et al.* 2005; SZYMANSKA *et al.* 2007), tais como:

- Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por serem facilmente controlados;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparada ao uso de enzimas livres;
- Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- Em alguns casos a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;
- Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa;
- Redução de gasto com enzima;
- A enzima não contamina o produto;
- Em muitas situações a enzima torna-se mais estável.

As principais desvantagens da imobilização são: a possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização e os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada (RIBEIRO, 1989; BAYRAMOGLU *et al.* 2003).

As principais desvantagens da imobilização são (BAYRAMOGLU *et al.* 2003)

- Custo de imobilização,
- Inativação da enzima em alguns casos,
- Limitações da transferência de massa.

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas com a finalidade de melhorar suas propriedades catalíticas só ocorreram no início da década de sessenta, quando extensivos estudos foram realizados em novas técnicas de imobilização, com vários suportes, obtendo preparações com altos teores de enzimas imobilizadas e características de estabilidade melhoradas (CHIBATA, 1978; AHMAD *et al.* 2001; DAVID *et al.* 2004).

Em 1969, CHIBATA (1978) instalou o primeiro processo industrial bem sucedido com enzimas imobilizadas, operando de modo contínuo, usando aminoacilase fúngica imobilizada em DEAE-Sephadex, para resolução de misturas racêmicas de aminoácidos.

Embora na década de 70 um grande número de trabalhos sobre enzimas imobilizadas tenha sido publicado, eles em sua maioria, restringiam o processo a pequenas escalas, sendo viável apenas para produtos de alto valor agregado. Contrariando essa expectativa surgiu em 1975 nos Estados Unidos um processo de produção em larga escala de um produto de baixo valor agregado, o xarope de glicose isomerizado (VICENTE, 2000).

Além de aplicações médicas, os biocatalisadores imobilizados têm sido amplamente usados em escala industrial, particularmente em biomateriais, bioseparadores e biosensores, por imobilização em vários suportes (CHEN *et al.* 2000; AKGOL *et al.* 2001; BAYRAMOGLU *et al.* 2003). A principal aplicação em larga escala de enzimas imobilizadas é na área de alimentos, como na produção de xarope de alto teor de frutose (“high fructose syrups”) usando glicose isomerase e na indústria farmacêutica, na produção de ácido 6-aminopenicilânico usando penicilina amidase imobilizada (GODFREY, 2001, *apud* TOMOTANI e VITOLO, 2006; DAVID *et al.* 2004).

O uso de enzimas imobilizadas na área de alimentos cresce a cada dia, pois o controle dos custos do processo é muito rígido devido ao baixo valor agregado dos produtos (DAVID *et al.* 2004; SANJAY e SUGUNAN, 2005; OSMAN *et al.* 2005).

Uma outra área em potencial é a construção de órgãos artificiais como o uso da urease imobilizada em rins artificiais que removem a uréia do sangue para uma desintoxicação extracorporal (HEARN e NEUFELD, 2000).

O custo da enzima é um dos parâmetros mais importantes. Se a enzima tem um alto custo ou se ela não pode estar presente no produto final, a solução talvez possa ser a imobilização desta, pois neste caso a enzima poderá ser reusada sem ter a necessidade de se recuperar com métodos de separação (GAUR *et al.* 2006, RESHMI *et al.* 2007)

Embora a imobilização das enzimas seja uma alternativa para usos das mesmas, tem-se o problema das limitações de transferência de massa e inativação da enzima durante o processo de imobilização, que podem diminuir a taxa de reação obtida com as enzimas ou biocatalisadores imobilizados, todavia, algumas condições operacionais podem ser escolhidas a fim de minimizar estes efeitos (BÓDALO *et al.* 1991).

2.7 - Métodos de imobilização de enzimas

Uma classificação para enzimas imobilizadas é ilustrada na Figura 2.6.

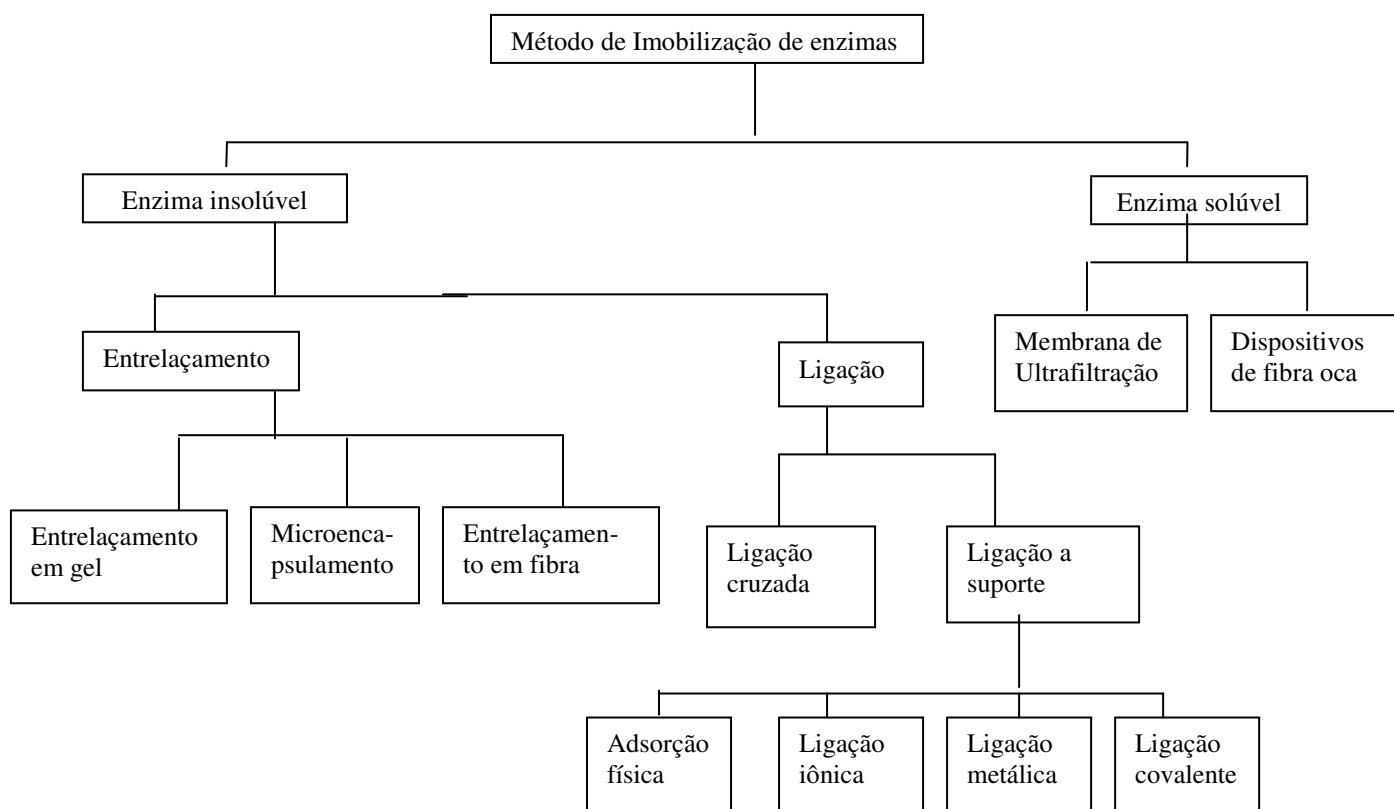


Figura 2.6 - Classificação de enzimas imobilizadas (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Inicialmente, os métodos de imobilização de enzimas podem ser agrupados naqueles que utilizam suportes sólidos insolúveis em água e aqueles que não usam tais suportes, porém é comum na maioria dos casos, uma combinação de métodos.

2.7.1 – Métodos de imobilização que utilizam suportes insolúveis em água

- **Adsorção física:** é o método mais antigo para imobilização de enzimas. É o procedimento mais fácil para se preparar um sistema imobilizado, baseado na adsorção das moléculas de enzimas sobre a superfície de matrizes sólidas. Consiste na exposição da solução enzimática ao suporte sob condições apropriadas, tais como, pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura, separando a enzima imobilizada por centrifugação ou filtração. É um processo de fácil preparação e possibilita o reuso do suporte (KENNEDY e CABRAL, 1987, CABRAL, 2001; OSMAN *et al.* 2005). Dentre as vantagens do método de adsorção pode ser apontado a simplicidade e a manutenção da conformação da enzima e do seu sítio, por não haver envolvimento de ligação química entre o suporte e a enzima. Obtém-se um sistema imobilizado com atividade específica semelhante à da enzima livre (CHIBATA, 1978). O método possui, por outro lado, a desvantagem da adsorção ser dependente de fatores como pH, natureza do solvente, meio utilizado para imobilização, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura. Assim, é necessário um controle rigoroso dessas variáveis durante a utilização da enzima imobilizada, para que as fracas interações entre a proteína e o adsorvente (pontes de hidrogênio, força de Van de Waals, interações hidrofóbicas, etc) sejam mantidas. Além disso, a adsorção na superfície não é específica, podendo incluir outras proteínas e/ou substâncias presentes na solução, que poderão interferir na utilização do imobilizado. Basicamente o que ocorre na adsorção é uma interação eletrostática entre a proteína carregada e a carga oposta do íon da resina (TOMOTANI e VITOLO, 2006). O processo de imobilização por adsorção é muitas vezes complementado com o uso de reagentes reticulantes, especialmente o glutaraldeído. Existem muitas possibilidades no uso do mesmo na imobilização de proteínas: como suporte previamente ativado ou no tratamento do mesmo com uma previa adsorção da proteína no suporte com os grupos amina primários. Sob o ponto de vista de imobilização, ambos procedimentos parecem seguir um mecanismo similar, ocorrendo inicialmente uma rápida adsorção da proteína por troca iônica, seguida por uma ligação covalente. Porém a primeira estratégia reduz a modificação química da enzima apenas no grupo onde a enzima é envolvida

na imobilização, enquanto que no segundo caso toda a superfície da proteína pode ser modificada (GUISÁN *et al.* 2005). Glutaraldeído é então um excelente agente reticulante que tem sido vastamente utilizado em imobilizações tanto de células quanto de enzimas (HAMERSKA-DUDRA *et al.* 2005).

- Ligação iônica: Este método de imobilização é baseado na ligação iônica entre a enzima e o suporte. Pode ocorrer a imobilização por adsorção juntamente com a iônica, a qual se diferencia apenas pela intensidade da interação enzima-suporte, mais forte no caso da iônica. Apesar de ser mais forte, os procedimentos de imobilização são os mesmos, cujas condições são brandas, em comparação com os métodos que envolvem as ligações covalentes e as mudanças de conformação produzidas são pequenas, implicando em uma atividade elevada em comparação à solúvel (ALMEIDA *et al.* 2005)

Como desvantagem deste método também há a possibilidade de desprendimento da enzima do suporte, quando houver variação no pH e na força iônica do meio. As vantagens apresentadas são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes e obtenção de enzimas imobilizadas com alta atividade (WEETALL, 1975; MARQUEZ, 2007).

Os suportes utilizados podem ser inorgânicos ou orgânicos, destacando-se as resinas de troca iônica, preparadas principalmente a partir de matrizes orgânicas, com grupos trocadores de íons. De acordo com o tipo de trocadores eles são classificados como aniônicos ou catiônicos (KENNEDY e CABRAL, 1987).

- Ligação metálica: Baseia-se em imobilizar enzimas empregando compostos de metais de transição ou óxidos metálicos precipitados a partir de seus sais, para ativar a superfície de suportes orgânicos ou inorgânicos (VICENTE, 2000). Esse método é baseado na propriedade de quelação dos metais de transição, que podem ser usados para ligar enzimas. Embora o tipo de ligação seja parcialmente covalente, observa-se o desprendimento da enzima do suporte em operações de longa duração (CABRAL, 1989; KENNEDY e CABRAL, 1987). Os sais metálicos mais utilizados nos processos são: $TiCl_3$, $TiCl_4$, $Ti_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, $ZnCl_4$, $SnCl_4$, $SnCl_2$ e VCl_3 . A técnica consiste em umedecer o suporte com uma solução metálica, secá-lo, lavá-lo para remover o excesso de sal e colocá-lo em contato com a solução de enzimas, normalmente no pH ótimo da enzima (VICENTE, 2000). Contudo as estabilidades conseguidas com tais catalisadores têm sido baixas devido à perda de enzimas para a solução (FLYNN, 1978).

Suportes orgânicos como papel de filtro, serragem, quitina, celulose e inorgânicos como celite, lã de vidro, alumina e sílica têm sido utilizados neste processo de imobilização (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Devido à não reprodutibilidade dos resultados obtidos quando se usa o suporte inorgânico nesse método de imobilização, além das baixas estabilidades operacionais obtidas, várias modificações do mesmo têm sido propostas, como o uso de agentes de ligação cruzada, tais como glutaraldeído e ácido tânico (CABRAL, 1989; RIBEIRO, 1989).

• Ligação covalente a um suporte sólido: numa primeira etapa o suporte é tratado com reagente que ativa alguns grupos funcionais e, na segunda etapa, o suporte ativado é misturado com a enzima e então ocorre a ligação. Alguns dos reagentes usados para a ativação dos suportes contém o grupo hidroxil ou amino. O glutaraldeído é um reagente freqüentemente usado na imobilização de enzimas nos processos industriais, efetuando uma ligação covalente entre um radical ativo do suporte com a molécula da enzima. É o método mais difundido e investigado de imobilização e as condições de reação normalmente não são brandas. A ligação enzima-suporte é mais forte, de tal forma que não há perda de enzima para a solução, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica. A ligação da enzima deve envolver qualquer grupo químico que não seja essencial à atividade catalítica, o que significa que o sítio ativo não deve ser afetado pela imobilização (KENNEDY e CABRAL, 1987). A grande variedade de reações de ligação e de matrizes com grupos químicos capazes de participar diretamente ou de serem ativados para formar as ligações faz com que esse método seja de aplicação quase geral. Infelizmente, na maioria dos casos, a estrutura da enzima não é conhecida, de forma que fica difícil estabelecer regras gerais para a imobilização. Os três principais fatores considerados para a imobilização de uma enzima por processo covalente, usando um método específico de reação, são: (CABRAL, 2001):

- i) o grupo funcional da proteína adequado para a ligação covalente em condições brandas de reação - levando-se em consideração a reatividade dos grupos e a estabilidade da ligação formada, os resíduos de aminoácidos mais convenientes para se ligar a suportes são, em ordem decrescente: L-lisina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-arginina, L-triptofano, L-serina, L-treonina e L-metionina.
- ii) Reações de acoplamento enzima – suporte - a reação é normalmente feita submetendo-se o suporte, previamente ativado, a uma solução de enzima, em condições brandas. As principais classes de reações de acoplamento são: diatomização, formação de amida e formação de Base de Schiff.

iii) Escolha de um suporte adequado para ligação covalente**2.7.2 – Métodos de imobilização sem o uso de suportes**

- Ligação cruzada: esse método é baseado na formação de ligações covalentes entre as moléculas de enzimas por ação de reagentes multifuncionais, conduzindo a agregados enzimáticos tridimensionais insolúveis no meio aquoso, sem utilizar suportes insolúveis em água (RIBEIRO, 1989; TANRISEVEN e DOGAN, 2002, EMREGUL *et al.* 2006, HAIDER e HUSSAIN, 2007). A principal vantagem do método de ligações cruzadas é a preparação de enzimas imobilizadas que são proteínas quase puras, em diferentes forma tais como géis enzimáticos, membranas enzimáticas e derivados adsorvidos em monocamadas, ligados a polímeros. As principais desvantagens do método são a freqüente e inevitável inativação da enzima, causada por modificação química e a natureza gelatinosa desses derivados enzimáticos. Frequentemente a ligação cruzada é usada em combinação com outros métodos de imobilização, por exemplo, para estabilizar preparações de enzimas imobilizadas por adsorção física, por entrelaçamento e outras combinações de métodos. Dentre vários reagentes multifuncionais, o mais comum é o glutaraldeído. A reação entre ele e a enzima é altamente dependente das concentrações da enzima e do agente reticulante, do pH, da força iônica da solução, da temperatura e do tempo de reação. As condições de reação são relativamente severas, afetando em alguns casos a conformação do sítio ativo da enzima, levando a significantes perdas de atividade (RIBEIRO, 1989, HAIDER e HUSSAIN, 2007). O glutaraldeído é comumente usado como reagente de ligação cruzada com combinações de outros compostos como, por exemplo, a gelatina. A alteração do micro ambiente molecular da enzima pode ser usada para aumentar a estabilidade da enzima. Na imobilização por ligação covalente, esta alteração pode ser devida ao uso de reagentes que ligam com a molécula da enzima e com o suporte. Tais reagentes podem ser classificados em dois grupos: os de moléculas menores (como por exemplo aminoácidos ou outras amins) e macromoléculas (albumina bovina, gelatina e polietilenoglicol (CAO, 2005, GUIBAN *et al.* 2005)

Gelatina é interligada com glutaraldeído sob condições brandas, formando uma ligação aldimina, envolvendo somente os resíduos lisina da proteína. O substrato por transferência de massa penetra dentro desta malha ocorrendo então a reação de hidrólise. A Figura 2.7 abaixo ilustra a reação de glutaraldeído com molécula de proteína.

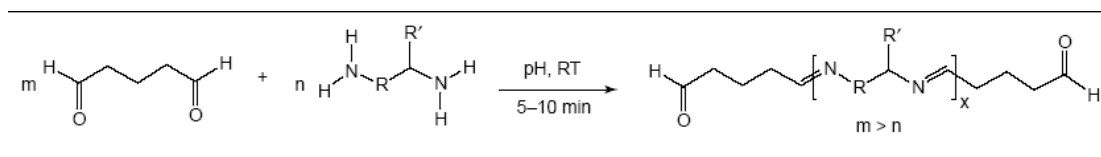


Figura 2.7 – Preparação da ligação cruzada com uso do glutaraldeído com os componentes diamino (CAO, 2005).

A gelatina é uma proteína utilizada juntamente com o glutaraldeído para imobilização de células e enzimas. Ela é ligada ao glutaraldeído por ligação cruzada sobre condições brandas e esta reação acompanha uma alteração de cor devido a formação de ligações de aldimina, envolvendo apenas os resíduos lisina da proteína. Este conjunto alginato, gelatina e glutaraldeído forma uma estrutura insolúvel, onde o tratamento com glutaraldeído estabiliza o gel de alginato, dificultando a saída da enzima da matriz (TANRISEVEN e DOGAN, 2002). Além disso, é um polímero natural no qual é um produto da hidrólise parcial de colágeno (EMREGUL *et al.* 2006).

- Enzimas em meio orgânico (micelas): a maior vantagem desta técnica comparada com o uso de reações em meio aquoso é o aumento da conversão de substâncias hidrofóbicas, devido ao aumento da solubilidade do substrato. Um caminho prático de preparação de enzimas para uso em meio orgânico é a técnica de imobilização em um suporte sólido. A enzima é adsorvida em um suporte ou simplesmente depositada pela secagem de uma mistura do suporte e uma solução aquosa de enzima. Essas preparações podem ser usadas como catalisadores em solventes orgânicos: pequena quantidade de água (menor que 1% do total do volume do reator) são necessárias para ativar a enzima. Já que as enzimas são insolúveis em quase todo o solvente orgânico o risco da enzima desprender do suporte é normalmente desprezível. Vários suportes tem sido usados tais como celite, vidro e outros (REED, 1993, GAUR, *et al.* 2006).
- Entrelaçamento: nesse método nenhuma reação ocorre, sendo um processo de retenção física de proteínas. O importante é reter as enzimas e permitir que as moléculas de substratos e produtos de pesos moleculares adequados possam se difundir através e dentro da rede polimérica (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987; ISIK *et al.* 2003).

Como não há nenhuma ligação entre a enzima e a estrutura do suporte, este método pode ser aplicado para qualquer tipo de enzima ou mesmo a células e organelas. É um processo muito simples e as enzimas não sofrem modificações químicas (VICENTE, 2000). Diferentes formas de confinamento são possíveis:

i-) Microencapsulamento: a enzima é aprisionada em membranas poliméricas semipermeáveis, com alta área de contato/unidade de volume. É um sistema limitado para substratos com baixo peso molecular, pois este tem que atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Há a possibilidade de inativação do catalisador durante a imobilização e de haver incorporação da enzima na parede da membrana.

ii-) Entrelaçamento em fibras: a enzima é envolvida nas microcavidades de fibras sintéticas; seu uso também é limitado para substratos de baixo peso molecular;

iii-) Entrelaçamento em gel: O método do entrelaçamento em gel envolve a retenção da enzima dentro dos espaços intersticiais de géis de polímeros entrecruzados insolúveis em água. A cadeia polimérica pode ser obtida a partir de monômeros, oligômeros ou polímeros, alterando a solubilidade pela ação de solventes, temperatura força iônica, pH, levando em conta as reações de ligação cruzadas. O grau de ligação do polímero deve ser controlado para permitir uma distribuição do tamanho de poros adequada (KENNEDY e CABRAL, 1987). Em geral, a estabilidade do método de entrelaçamento aumenta a estabilidade devido ao confinamento (CAO, 2005). Este método contribui também para aumentar o fator de efetividade desde que se trabalhe com partículas pequenas (WATANABE *et al.* 2001). De acordo com GAUR *et al.* (2006), entrelaçamento pode ser aplicado a apenas substrato e produtos de baixo peso molecular devido às limitações difusionais.

- Imobilização em membranas: membranas podem ser usadas para reter enzimas no reator enquanto permite a remoção dos produtos. Muitos tipos de membrana têm sido usados em reações enzimáticas como membranas lisas e fibras ocas.
- Imobilização em sistemas com duas fases: a enzima pode ser retida em uma das fases e o produto pode ser removido do reator com a outra fase. A enzima fica na fase aquosa e o produto e o substrato ficam principalmente na fase orgânica. A desnaturação da enzima pode ocorrer na interface, especialmente se as fases são misturadas vigorosamente para alcançar efetiva transferência de massa.

A escolha do método de imobilização das enzimas depende de fatores essenciais do processo, como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. O principal fator é selecionar um suporte adequado, o que é definido como uma parte não-catalítica da imobilização de enzimas, na qual a parte catalítica é construída. Assim o método escolhido deve atender as duas necessidades a catalítica, expressa em produtividade, rendimento,

estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004; CAO, 2005).

A imobilização pode afetar a estabilidade, o pH e a temperatura ótima, as constantes cinéticas e a máxima velocidade de reação catalisada pela enzima (DANISMAN *et al.* 2004; ERGINER *et al.*, 2000). A imobilização pode conferir uma estabilidade adicional para uma variedade de enzimas, sendo que essa estabilidade é influenciada pelo número de ligações formados entre a enzima e o suporte, a natureza das ligações (covalentes, não-covalentes), o grau de aprisionamento das moléculas de enzima na matriz e as condições de imobilização (DANISMAN *et al.*, 2004; CAO, 2005).

Nos últimos anos houve um crescimento do uso de técnicas de imobilização e cada método possui sua vantagem, sendo necessário definir o método mais adequado, e se necessário, combiná-los, a fim de obter melhores resultados. Na prática não existe um método de imobilização que possa ser considerado geral ou ideal para uma dada enzima, por isso novidades continuam a aparecer (PEREIRA *et al.* 2003; ATES e MEHMETOGLU, 1997; CAO, 2005).

Os suportes para imobilização de enzimas devem apresentar como principais características (RIBEIRO, 1989, EMREGUL *et al.* 2006, CUBAS *et al.* 2007):

- a) Grande área superficial;
- b) Permeabilidade a substratos e produtos;
- c) Estabilidade química, mecânica e térmica;
- d) Rigidez mecânica;
- e) Insolubilidade em água;
- f) Tamanho e forma de partícula adequados;
- g) Inerte ao ataque microbiano;
- h) Regenerabilidade;
- i) Manter a forma e tamanho de partícula durante o uso;
- j) Apresentar pouca compactação em operações de leito fixo com altas taxas de escoamento.

2.7.3 – Alginato

O alginato de sódio é um hidrogel vastamente utilizado na indústria de alimentos como um espessador e em aplicações biotecnológicas, incluindo encapsulamento de células e

proteínas. É um dos materiais mais utilizados para a imobilização de células e de enzimas. O alginato é um polissacarídeo linear obtido a partir de algas e de várias bactérias e consiste dos resíduos de ligação 1,4- de β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G). A composição química e a seqüência dos resíduos M e G dependem da fonte da qual o alginato foi extraído (LEONARD *et al.* 2004). Possui como benefício ser não tóxico para imobilização de células e é aceito como aditivo alimentício (LEE e HEO, 2000). A molécula de alginato pode ser representada na Figura 2.8.

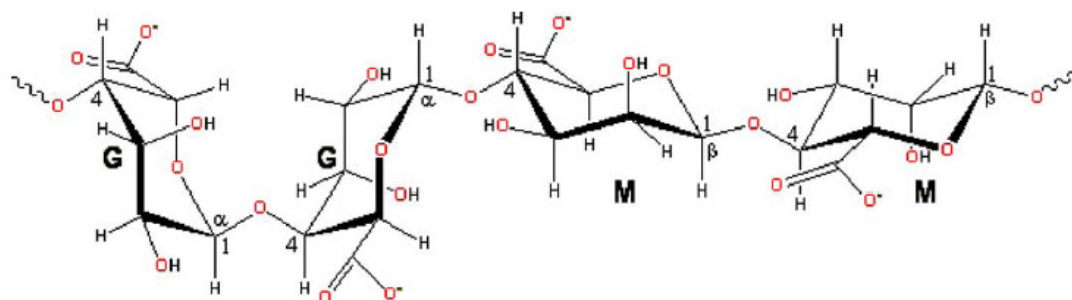


Figura 2.8 – Estrutura química do alginato – G é o grupo ácido gulurônico e M é o grupo ácido manurônico (LEONARD *et al.* 2004).

A gelificação do alginato é principalmente alcançada pela troca dos íons sódio por cátions divalentes tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . A formação e as propriedades do gel de alginato de cálcio têm sido extensivamente estudadas. Existe uma vasta concordância que a rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} pela cadeia de segmentos do grupo G, formem junções estáveis (uma rede tridimensional) consistindo dos principais dímeros, formando assim o modelo conhecido como “egg-box” (CERF *et al.* 2004), conforme ilustrado na Figura 2.9.

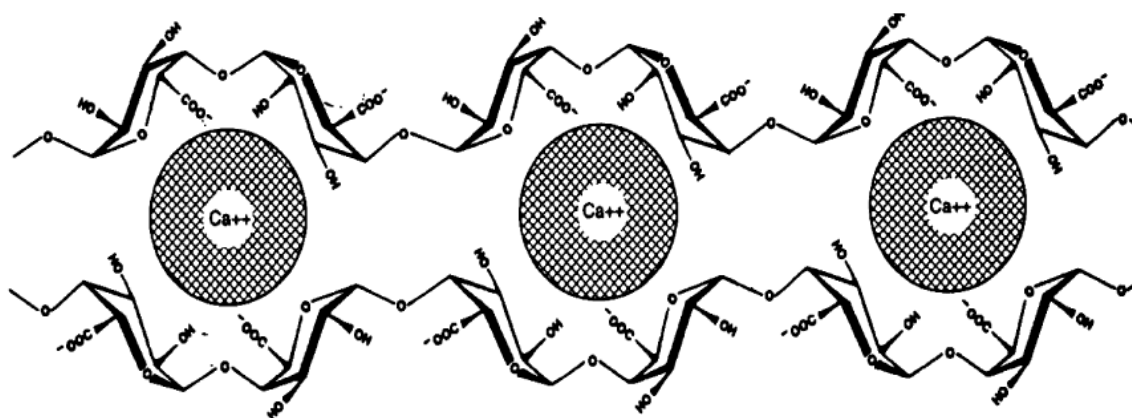


Figura 2.9 – Modelo “egg-box” para o processo de gelação do alginato com íons cálcio (CERF *et al.* 2004, BAJPAI e SHARMA, 2004)

Isto pode ser explicado pelo fato do alginato ser o mais comum sistema na formação de gel, uma vez que solução de alginato em contato com um polícatión (Ca^{+2}), imediatamente se transforma em gel devido à ligação entre os blocos ácidos do alginato e íon Ca^{+2} (NAKAJIMA *et al.* 2005).

As características do gel podem ser resumidas em sua porosidade e resistência mecânica necessárias ao processo. A porosidade está intimamente ligada à capacidade do gel reter a enzima desejada e de alterar a difusividade efetiva do substrato (CABRAL, 1989). Imobilização de enzimas utilizando entrelaçamento em gel de alginato de cálcio é um dos métodos mais simples de imobilização, porém existe algumas limitações, tais como baixa estabilidade e alta porosidade do gel, implicando em um possível escape da enzima do gel. Conseqüentemente existe um interesse em obter formas alternativas de imobilização de enzimas com boas características físico-químicas, produzindo biocatalisadores adequados para uso em vários tipos de reatores (ATES e MEMETOGLU, 1996). Vários trabalhos utilizando alginato são citados na literatura (LEVY *et al.* 2005, MITTAL, *et al.* 2005, KONSOLA e KYRIAKIDES, 2005, HAIDER e HUSSAIN, 2007), que citam estudos com o intuito de aperfeiçoar e otimizar a utilização deste composto em imobilização tanto de células quanto de enzimas.

2.8 – Efeitos da imobilização nas propriedades das enzimas

Como já mencionado, as enzimas imobilizadas apresentam várias vantagens na sua aplicação, quando comparadas às enzimas livres, porém algumas alterações podem ocorrer nas suas propriedades físicas e químicas após a imobilização, implicando em mudanças na atividade, estabilidade e cinética da enzima imobilizada. Normalmente as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem específicas de temperatura e pH. A estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas geralmente é superior à das livres, mas depende do método de imobilização, do suporte e da solução a ser estocada (CHIBATA, 1978; BAGAL e KARVE, 2006).

A alteração no perfil de temperatura pode ser observada entre as enzimas livres e imobilizadas, o que pode ser causado pelos efeitos difusionais, mudanças conformacionais e efeitos estereoquímicos. Essas podem refletir em um aumento ou diminuição da temperatura ótima alcançada pela enzima imobilizada em relação à solúvel (RIBEIRO, 1989, EMREGUL *et al.* 2006).

Considera-se que as alterações nas propriedades enzimáticas são causadas por dois fatores. Um é devido a mudanças na enzima em si e outro deve-se às propriedades físicas e químicas dos suportes usados na imobilização, como descreve-se a seguir:

- **Inativação durante a imobilização** – pode ocorrer devido às altas temperaturas ou outras condições adversas durante o procedimento de imobilização. Em métodos de imobilização onde ocorre a ligação química, há o risco de que um grupo funcional pertencente ao sítio ativo da enzima faça parte da reação, o que normalmente resulta em perda de atividade (REED, 1993, EMREGUL *et al.* 2006).

- **Efeitos da transferência de massa** – A taxa de uma reação química é influenciada pela cinética química e pelo efeito de transferência de massa. Quando as enzimas solúveis são usadas como catalisadores, as limitações de transferência de massa são normalmente negligenciáveis, exceto quando o substrato está presente principalmente em outra fase, gasosa ou sólida. Todavia, quando enzimas são ligadas a suporte sólido, limitações de transferência de massa ocorrem frequentemente. A concentração de substrato na superfície da partícula de enzima imobilizada é normalmente diferente da concentração de substrato no seio da solução. Próximo à superfície está um filme líquido estagnante, ou uma camada limite, através do qual substratos e produtos são transportados por difusão. As diferentes concentrações através do filme estagnante são devido às forças de difusão (REED, 1993). Na imobilização em partículas porosas tem-se limitações à transferência de massa externa e interna à partícula. Estes efeitos de resistência à transferência de massa de substrato e produto, dependendo de sua extensão podem constituir a etapa dominante do processo. Os parâmetros cinéticos determinados sem levar em consideração tais efeitos difusionais são normalmente denominados de aparentes, e via de regra, são diferentes daqueles determinados para a enzima na forma livre. Os parâmetros cinéticos aparentes são válidos apenas para a situação experimental na qual foram determinados. Os parâmetros cinéticos determinados na ausência de limitações difusionais são denominados intrínsecos (KHORASHEH *et al.* 2002, OZDURAL *et al.* 2003)

- **Alterações no valor do pH** - Quando uma enzima é imobilizada, o pH ótimo pode ou não se alterar. As alterações no pH ótimo e na curva atividade - pH dependem da carga da molécula da enzima e/ou do suporte. Se o suporte é carregado, o comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir daquela da enzima livre, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esse comportamento modificado pode ser atribuído ao fato de que as concentrações de espécies carregadas, tais como substrato, íons hidrogênio ou hidroxila e outros no microambiente da enzima imobilizada, serem diferentes daqueles da solução

externa, devido a interações eletrostáticas com cargas fixas no suporte. Essas diferenças de concentração de espécies carregadas podem ser descritas pelo coeficiente de partição (RIBEIRO, 1989; ZHOU e CHEN, 2001, TANRISEVEN e DOGAN, 2002)

- **Alterações da temperatura** - Na imobilização de enzimas, alterações na temperatura ótima de reação ocorrem em alguns casos. Essa pode ser maior que a da enzima livre, em alguns casos, devido a efeitos difusionais, tal como no caso de oclusão e ligação a suportes porosos, que protege a enzima contra desnaturação térmica, uma vez que a temperatura no microambiente da enzima imobilizada é menor que na solução. Alterações conformacionais e efeitos estereoquímicos podem desempenhar um papel importante na tolerância da enzima à desnaturação térmica (KOBAYASHI e MOO-YOUNG, 1973). Temperaturas ótimas da enzima imobilizada menores e iguais a da enzima nativa também tem sido verificadas (CHIBATA, 1978). A alteração no perfil de temperatura pode ser observada entre as enzimas livres e imobilizadas, o que pode ser causado pelos efeitos difusionais, mudanças conformacionais e efeitos estereoquímicos. Essas podem refletir em um aumento ou diminuição da temperatura ótima alcançada pela enzima imobilizada em relação à solúvel (RIBEIRO, 1989, ZHOU e CHEN, 2001, TANRISEVEN e DOGAN, 2002, HAIDER e HUSSAIN, 2007)

- **Especificidade em relação ao substrato** - Quando a enzima é imobilizada, sua atividade freqüentemente decresce e a especificidade da mesma em relação ao substrato algumas vezes se altera, principalmente quando se trata de substratos de alto peso molecular, devido a alterações conformacionais na enzima e a efeitos estereoquímicos (CHIBATA, 1978; JURADO *et al.* 2002).

- **Energia de ativação** - A partir dos dados usados para obter o perfil atividade – temperatura, é possível calcular a energia de ativação da reação catalisada pela enzima, livre ou imobilizada conforme a Equação 2.1. Os efeitos de transferência de massa aumentam menos com o aumento da temperatura, que a constante da taxa de reação que cresce exponencialmente com a mesma (RIBEIRO, 1989). Portanto, a etapa determinante do processo é o transporte de massa por difusão, e assim, a energia de ativação aparente será menor que a verdadeira (LEVENSPIEL, 1972). Por outro lado, a baixas temperaturas, a difusão será rápida comparada com a taxa de reação química e limitações difusionais na taxa de reação não serão observadas.

Nas enzimas imobilizadas por métodos de ligação a suportes porosos ou por oclusão em géis e fibras, suas energias de ativação deveriam ser, teoricamente, menores do que as das correspondentes enzimas livres. Segundo KENNEDY e CABRAL (1987), há na literatura

várias citações onde as energias de ativação das enzimas imobilizadas foram praticamente as mesmas das enzimas livres, havendo também algumas citações de aumento das mesmas.

2.9 – Comparação entre os métodos de imobilização

Nenhum método de imobilização pode ser considerado ideal, pois cada enzima possui suas particularidades de estrutura e de composição, além de que cada processo industrial tem limitações características. Para encontrar o melhor método de imobilização para uma situação específica é preciso que resulte numa boa atividade, apresente custo baixo e apresente um alta estabilidade operacional (CABRAL, 1989, KENNEDY e CABRAL, 1987; RIBEIRO, 1989; VICENTE, 2000, DI SERIO *et al.* 2003). Embora várias técnicas de imobilização possam ser usadas para uma mesma enzima, nenhuma delas pode ser considerada como um método geral, devido à diversidade estrutural das enzimas, substratos e produtos (MARIOTTI, 2000).

A imobilização por métodos químicos (ligações covalentes) envolve modificações na estrutura da enzima e pode causar desativação parcial quando o sítio ativo participa da ligação. Assim, a imobilização por esses métodos deve ser feita nas condições mais brandas possíveis, de forma a minimizar este problema. A ligação enzima-suporte é muito forte, dando uma alta estabilidade operacional. A recuperação dos suportes é difícil ou impossível, principalmente no caso de serem orgânicos e utilizar processos covalentes de imobilização (MARIOTTI, 2000; GAUR *et al.* 2006).

A imobilização pelos outros métodos (adsorção física, ligação iônica e metálica) pode ser feita facilmente em condições brandas, com ligações fracas enzima-suporte. A estabilidade operacional da enzima imobilizada é baixa, podendo ocorrer desprendimento da mesma. Como não há modificações na estrutura química da enzima, a retenção da atividade é boa. Outra vantagem desses métodos é que o suporte pode ser recuperado toda vez que a atividade retida diminua a níveis acentuados. A Tabela 2.8 ilustra as vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de imobilização e na Tabela 2.9 é apresentada uma comparação entre os métodos de imobilização com suas respectivas características.

Tabela 2.8 - Comparação das diferentes técnicas de imobilização (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

TÉCNICA	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Adsorção	Simples, barato, sem necessidade de reagentes químicos, aplicação apropriada em alimentos, enzima não é facilmente desnaturada.	Desorção devido às fracas ligações, matriz tende a absorver outras espécies como leite ou proteínas do soro.
Adsorção + ligação cruzada	Não apresenta as desvantagens da adsorção simples.	Não é tão simples quanto uma simples adsorção. Reagentes químicos são utilizados.
Ligação covalente	Ligação entre enzima e suporte forte, evitando perda da enzima.	Uso de reagentes normalmente não permitidos na indústria de alimentos, suportes caros.
Entrelaçamento em gel	Pouca alteração nas propriedades catalíticas, adequado para células e enzimas, não adição de reagentes químicos	Efeitos difusionais limita o processo a substratos de baixos pesos moleculares.
Entrelaçamento em fibra	Enzima extremamente estável	Baixo rendimento de atividade, difusão nos poros controla o fenômeno.
Retenção por membrana	Mantém as características originais da enzima (pH e temperatura ótimos e estrutura)	Escape e adsorção na superfície da membrana

Tabela 2.9 – Comparação entre os métodos de imobilização e suas características (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987).

Características	Ligações Cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediária	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da Ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediária
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do Suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediária	Alto	Intermediária
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Intermediária	Alta	Baixa
Aplicabilidade Geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção Microbiana	Intermediária	Não	Não	Não	Não	Sim

2.10 - Imobilização de lactase

Durante as últimas décadas a lactase tem sido imobilizada por uma variedade de procedimentos incluindo adsorção física, encapsulamento em gel e ligações covalentes (DI SERIO *et al.* 2003; EMREGUL *et al.* 2006). A escolha do suporte é determinada pelas condições com que a enzima será usada e pelo método de ligação envolvido. Um grande número de suportes tem sido usado e novos suportes continuam a surgir, provavelmente devido ao fato de nenhum deles ser ideal para a prática. As enzimas comerciais utilizadas para a hidrólise de lactose (β -galactosidase) possuem diversas origens. Enzimas de origem fúngica e de levedura possuem um maior interesse comercial. Muitos estudos com relação às enzimas de origem bacteriana como a derivada de *E. coli* vem sendo realizados, porém seu uso não é viável para produtos com intenções alimentícias de seres humanos (JURADO *et al.* 2002). OBÓN *et al.* (2000) estudaram a imobilização da β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* em AMBERLITE IRC-50 para hidrólise da lactose do leite. TANRISEVEN e DOGAN (2002) utilizaram β -galactosidase derivada de *Aspergillus oryzae* para imobilização em alginato de sódio com gelatina endirecidas com glutaraldeído. A imobilização resultou num rendimento de 56% e a atividade relativa retida por 35 dias sem decréscimo. DI SERIO *et al.* (2003) utilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* para estudar os efeitos cinéticos e da influência de três tipos de suportes na imobilização. SHELDON *et al.* (1998) imobilizaram β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces fragilis* por adsorção em resina fenol-formaldeído denominada Duolite. ATES e MEHMETOGLU (1996) desenvolveram um novo método de imobilização por entrelaçamento da enzima em alginato de cobalto. BRENA *et al.* (2001) imobilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Escherichia coli* por ligação a glutaraldeído e agarose através dos grupos amino. LADERO *et al.* (2000) imobilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em sílica-alumina e um modelo cinético da hidrólise foi determinado. MAUGARD *et al.* (2003), utilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* livre e imobilizada na síntese de oligossacarídeos usando irradiação de microondas ou aquecimento convencional.

Verifica-se então que o procedimento de imobilização de β -galactosidase ainda não foi otimizado, o que justifica o grande número de estudos publicados recentemente sobre o assunto (DI SERIO *et al.* 2003).

2.10.1 – Imobilização de lactase de origem fúngica

Nem todas as fontes de lactase são aceitáveis ou reconhecidas como seguras quando se trata de aplicações em processos alimentícios. No caso de lactase de fungos, as principais fontes são de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Isto se deve ao fato de serem adequadas para uso em meio ácido e disponíveis comercialmente. Algumas propriedades de lactase de *Aspergillus Niger* são ilustradas na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 – Propriedades da lactase de *Aspergillus niger* imobilizada.

Suporte	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Tempo de meia vida (dias)
Qitosana	3	60	>156, solução de lactose, 40°C; ~50, lactose de soro, 40°C
Duolite ES-762	4	55	120, soro ultrafiltrado 40°C
Duolite S-30	4	60	> 30, lactose, 45°C
Continuação da Tabela 2.10			
Alumina	3	60	>80, lactose
Polivinilpirrolidona	4	55	>12, lactose, 50°C

FONTE: MARIOTTI, 2000.

Tanto a adsorção, quanto a ligação covalente envolvendo grupos amino no suporte levam a um pequeno decréscimo no valor do pH ótimo, ocasionando uma pequena alteração no valor da atividade. Além do mais, estes métodos, como esperado, não alteraram em nada o valor do K_m da lactase. A atividade por grama de suporte é o primeiro índice de capacidade catalítica e tem relação com a economia do processo, especialmente quando o custo do suporte é elevado. O custo do suporte varia bastante e os dados não são disponíveis em todos os casos. Em geral, materiais orgânicos naturais (qitosana, colágeno) apresentam menor custo, seguido de polímeros orgânicos sintéticos, em contrapartida ainda são mais baratos do que os suportes inorgânicos como o vidro (GREENBERG e MAHONEY, 1981). O tempo de

meia-vida para as enzimas imobilizadas depende do tipo de reator e das condições operacionais utilizadas, especialmente a temperatura. Tempo de meia vida ótimo é obtido usualmente por corridas a temperaturas inferiores à ótima, podendo por consequência, diminuir a porcentagem de conversão da lactose e aumentar o risco de crescimento microbiano. A obtenção do melhor tempo de meia vida é obtido com solução pura de lactose.

A lactase de *Aspergillus Oryzae* (origem fúngica) que foi utilizada neste trabalho tem uma história de uso seguro e foi submetida a numerosos testes (PARIZIA, 1983, *apud* MARIOTTI, 2000). ATES e MEHMETOGLU (1997), desenvolveram um método de imobilização por entrelaçamento da enzima lactase em esferas de alginato de cobalto em um reator *plug-flow*, obtendo um rendimento de imobilização de 83%, a maior já reportada na literatura para imobilização de β -galactosidase imobilizada. DASHEVSKY, (1998) estudou a perda da proteína na microencapsulação de β -galactosidase em esferas de alginato de sódio. Esta perda foi em torno de 36% e durante as etapas das ligações por entrelaçamento (*crosslinking*), ocorreu o fenômeno da sinerese o que ocasionou a diminuição dos pesos das esferas. A perda de água foi de 44% quando foi utilizado 1% de alginato de sódio. TANRISEVEN e DOGAN (2002) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus Oryzae* em fibras compostas de alginato e gelatina e as partículas foram endurecidas com glutaraldeído. A imobilização resultou em um rendimento de imobilização de 56%, e durante 35 dias de usos não apresentou decréscimo da atividade. DUAN *et al.* (1998), imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Aspergillus Oryzae* utilizando como suporte quitosana e glutaraldeído produzindo oligossacarídeos em um reator *plug-flow*.

2.10.2 – Imobilização de lactase de origem de levedura

As lactases de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* são usadas para hidrólise de lactose em leite e soro doce. Algumas das propriedades destas enzimas estão ilustrados na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 - Propriedades da enzima lactase de origem de levedura

Suporte	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Tempo de meia vida (dias)
Fibra de nitrato de celulose	6,5	35	> 100, lactose, 25°C

Continuação da Tabela 2.11

Colágeno ^a	6,4	~30	> 5, lactose 20°C
Resina de troca iônica ^b	6,5 – 7,0	40	> 7, lactose, 50°C

a - lactase de *K. Lactis*; b – lactase de *K fragilis*.

FONTE – MARIOTTI, 2000.

BRENA *et al.* (2001), estudaram o processo de imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyce lactis* e *Escherichia coli*, por ligação agarose–glutaraldeído (glut-agarose) de amino grupos e agarose-tiolsulfonato (TSI-agarose) através dos grupos tiol. Em geral, grupos TSI-agarose exibiram maiores rendimentos (60 a 85%) do que o outro grupo (36-40%). MAMMARELLA e RUBIOLO (2003) estudaram a eficiência de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* encapsulada em gel de alginato de cálcio e K-carragena e sua estabilidade operacional nas matrizes formadas, determinando a atividade do biocatalisador. A desativação térmica e as perdas de proteína devido ao aumento de tamanho da partícula do gel foram avaliados e levados em consideração na equação da taxa de reação. Os resultados mostraram que a quantidade de enzima encapsulada no gel foi reduzida devido à perda de proteína, causada pelo aumento de tamanho da partícula do gel.

MAUGARD *et al.* (2003) estudaram a síntese de oligossacarídeos a partir de β -galactosidase de *Kluyveromyce lactis* imobilizada e livre utilizando irradiação de microondas ou aquecimento convencional. O suporte utilizado para a imobilização foi a resina Duolite A-568 que aumentou a síntese dos oligossacarídeos (GOS). Foi examinado a vantagem de irradiação por microondas na formação dos GOS, que obteve como resultado um aumento na síntese dos mesmos.

RUBIOLO e CARRARA (1997) desenvolveram um modelo que ajustou o comportamento de um reator *plug flow* com β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em esferas de quitosana, assumindo cinética de Michaelis–Menten e inibição competitiva dos produtos da reação. Os resultados experimentais ilustraram que sob condições especiais, o modelo se ajusta bem para os cálculos dos parâmetros cinéticos em uma faixa de diferentes vazões e diferentes concentrações de substrato.

JURADO *et al.* (2002) propuseram em novo modelo cinético para a hidrólise de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* na sua forma livre. As variáveis analisadas foram temperatura (25-40°C), concentração de enzima (0,1– 0,3g/l), concentração de lactose (0,0278 – 0,208 M) e concentração inicial de galactose (0,0347M). O modelo proposto obedeceu uma

cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, com revelações sobre a afinidade similar de substrato e produto pelo sítio ativo da enzima.

LADERO *et al.* (2000) propuseram um modelo de hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em sílica-alumina comercial. As variáveis analisadas foram temperatura, concentração de substrato e produtos e concentração de enzimas, sendo as mesmas submetidas a uma vasta variação de valores experimentais. Foi estudado o efeito do pH e da temperatura na estabilidade e atividade da enzima estudada. O pH ótimo para a atividade enzimática foi 7. A enzima imobilizada foi mais estável do que a livre para valores ácidos de pH, e a livre foi mais estável para valores básicos de pH. A máxima temperatura usada foi 40°C, portanto a inativação enzimática durante as corridas cinéticas foi evitada. A agitação, a concentração da enzima e tamanho da partícula foram selecionados para garantir a mesma taxa global no meio reacional. Foram propostos ajustes experimentais para o modelo cinético de primeira ordem e outros mais complexos, de forma que o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pela galactose foi selecionado.

2.10.3 – Imobilização de lactase de origem Bacteriana

A maioria dos trabalhos publicados sobre imobilização de lactase de origem bacteriana utilizam a enzima produzida por *Escherichia coli* devido à sua fácil disponibilidade. Muitos trabalhos pioneiros de imobilização da lactase empregaram esta enzima e os resultados tem sido estendidos para outras. Mesmo sendo pouco usada nas indústrias de alimentos, conforme já mencionado, tem sido utilizada como modelo para imobilização da lactase e de outras enzimas.

2.11 - Tipos de biorreatores para enzimas imobilizadas

Das várias aplicações para enzimas imobilizadas a mais importante é sua aplicação industrial, por isso o assunto é tão discutido. Em processos industriais, as enzimas imobilizadas são empregadas em reatores químicos, normalmente similares aos utilizados em catálise química (CHIBATA, 1978; CAO, 2005; BULCHHOLZ *et al.* 2005).

Uma característica geral de qualquer sistema com biocatalisadores imobilizados é que o transporte de substrato e produtos ocorre por mecanismos difusionais. Nos casos de biorreatores imobilizados com enzimas, é comum observar um aumento de sua estabilidade e

sua resistência à desnaturação quando se encontram imobilizadas (CASABLANCA *et al.* 1998)

Os reatores enzimáticos são classificados em homogêneos e heterogêneos, dependendo do número de fases presentes no processo, sendo que no processo homogêneo ocorre apenas uma fase, enquanto no heterogêneo há duas ou mais fases. Um exemplo de heterogêneo é a solução de substrato sendo a fase líquida e a enzima imobilizada a fase sólida. Outra classificação baseia-se na forma de operação, descontínuo (batelada) ou contínuo, ao grau de mistura: perfeita ou de escoamento tubular. O perfil de concentração dentro dos reatores pode variar apreciavelmente (RIBEIRO, 1989; CHIBATA, 1978; CAO, 2005; BULCHHOLZ *et al.* 2005). Enzimas imobilizadas possibilitam uma catálise heterogênea com ótimas vantagens: é possível utilizar um único lote de enzimas repetidas vezes e parar a reação apenas removendo fisicamente as enzimas imobilizadas da solução, além disso, inclui a facilidade de determinação analítica de uma mistura complexa em um volume pequeno (ERGINER *et al.*, 2000).

Uma classificação de reatores levando-se em consideração o tipo de operação e as características hidrodinâmicas é apresentado na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 – Classificação dos reatores enzimáticos.

Modo de operação	Características Hidrodinâmicas	Tipo de reator
Descontínuo	Mistura ideal	Reator descontínuo com agitação
	Tipo tubular	Reator descontínuo com recirculação
	Mistura ideal	Reator contínuo com agitação
		Reator contínuo com agitação e com uma membrana de ultrafiltração
Contínuo	Tipo tubular	Reator de leito fixo
		Reator de leito fixo fluidizado
		Reator tubular
		Reator de fibras

FONTE - ZANIN, 1989 *apud* MARIOTTI, 2000.

2.11.1 - Reatores descontínuos

• BATELADA

A princípio, quando se dispunha apenas de enzima na forma livre e solúvel, o único tipo de reator utilizável era o batelada. Contudo com o advento das enzimas imobilizadas surgiu a possibilidade de se utilizar outros tipos de reatores. Este tipo de reator pode ser usado em processos onde, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura

final com relativa facilidade (filtração, decantação, por exemplo). Normalmente a enzima é introduzida junto com o substrato no reator, sendo que o seu conteúdo é descarregado quando alcança-se o grau de conversão desejado (MARIOTTI, 2000). As principais desvantagens do reator descontínuo, são:

- mudanças das condições no decorrer da reação;
- na ampliação de escala do reator é difícil se manter um bom grau de mistura, devido à impossibilidade de se assegurar entrada proporcional de potência à medida que o reator aumenta de tamanho;
- variação da qualidade do produto de uma batelada para outra;
- tempo morto entre as bateladas
- impossibilidade de reutilizar a enzima, ou ainda a tendência de se perder enzima durante a recuperação entre as bateladas. Estas desvantagens restringem o uso deste tipo de reator em larga escala (ZANIN, 1989 *apud* MARIOTTI, 2000).

A principal vantagem do reator tipo batelada é a eficiente transferência de calor e de massa devido à boa agitação do sistema. A Figura 2.10 ilustra os diversos tipos de reatores empregados para a hidrólise enzimática.

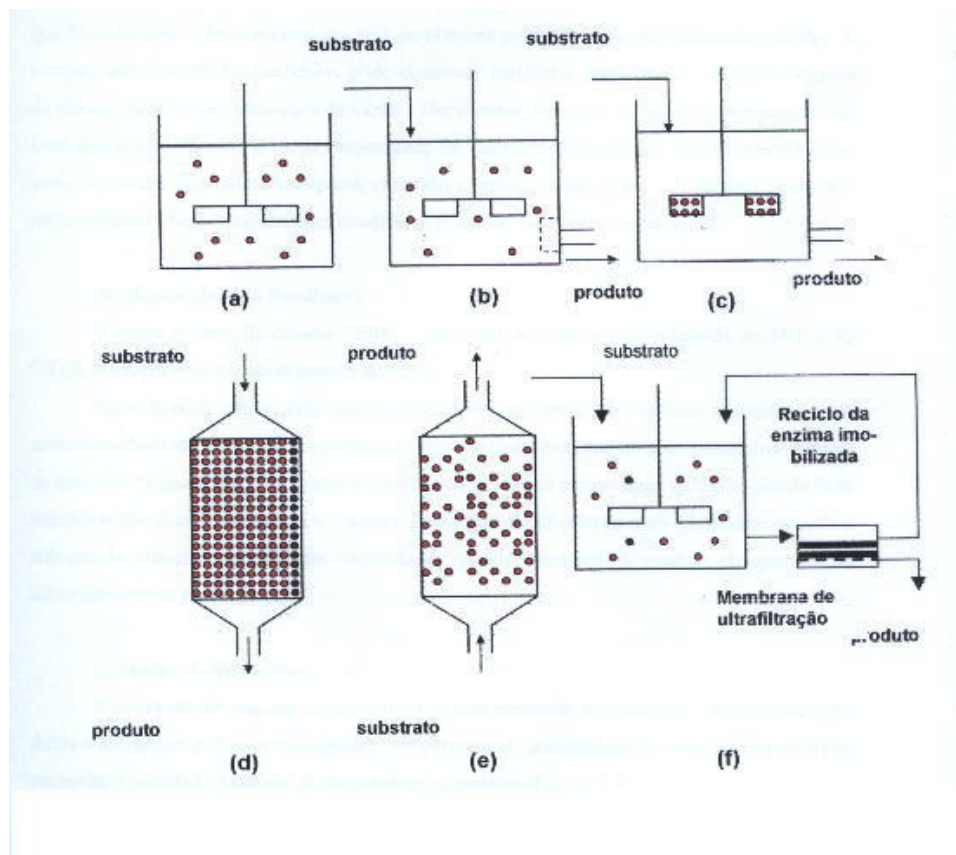


Figura 2.10 - Diversos tipos de reatores empregados para a hidrólise enzimática (MARIOTTI, 2000).

- **REATOR BATELADA TIPO TANQUE AGITADO (“BSTR”)**

Este tipo de reator é constituído por um tanque e de um sistema de agitação mecânico, permitindo um bom grau de mistura. Em casos em que utilizam enzimas imobilizadas, as mesmas são separadas do produto final numa etapa subsequente (Figura 2.10a). Os processos de recuperação, por filtração ou centrifugação, geralmente provocam perdas de partículas do catalisador, bem como a desativação parcial da enzima. Existem suportes menos resistentes que se quebram na presença do agitador. Para superar estes problemas, foram projetados outros modelos de reatores descontínuos. Um desses, é o reator com agitação provido de um cesto (“basket reactor”) que retém a enzima imobilizada, impedindo sua perda por atrito com o agitador ou por processo de separação do produto (Figura 2.10c).

2.11.2 - Reatores Contínuos

Os processos contínuos, quando comparados com os de batelada, apresentam-se superiores, principalmente por facilitarem o controle automático, serem mais fáceis de operar e favorecerem o controle de qualidade do produto obtido (PRËNOSIL *et al*, 1987). Os reatores contínuos podem ser divididos em dois tipos básicos:

- i) Reatores contínuos tipo tanque agitado (CSTR)

Pode ser subdividido em dois tipos: contínuo de tanque agitado com mistura completa (CSTR); tubular – mistura ocorre radialmente.

O reator tubular ideal é caracterizado por uma variação das concentrações dos componentes da entrada até a saída. O fluido escoar através de um tubo ou de uma coluna promovendo o chamado fluxo empistonado, o que significa que não há variação da velocidade no sentido axial da seção transversal. Entretanto, ocorre uma mistura radial completa. No caso do CSTR ideal, as concentrações de substrato e produto no seu interior são idênticas às presentes na saída, enquanto que no reator tubular as condições variam continuamente, da entrada à saída (WANG *et al*. 1979). No contínuo de tanque agitado (Figura 2.10b), há entrada e saída contínua de fluido em um reator com agitação. Eventualmente uma certa quantidade de enzima pode ser arrastada no efluente, devendo-se por isso, acoplar na saída um sistema que permita recuperá-la. Neste tipo de reator não existem gradientes de temperatura ou de concentração, devido à eficiente agitação, que promove um contato íntimo

entre a enzima e o meio de reação (Figura 2.10b). O reator CSTR possui alguns tipos de configurações diferenciados e especiais. Numa delas, na sua forma mais simples, o substrato é adicionado ao tanque contendo a enzima imobilizada, que fica em suspensão na mistura de reação. O produto e o substrato remanescente são retirados continuamente do tanque. Um filtro colocado na saída impede que a enzima seja retirada do sistema. Uma outra forma alternativa consiste em reter a enzima imobilizada nas pás do eixo de agitação (Figura 2.10c) ou nas chicanas, com o intuito de minimizar a resistência à transferência de massa entre a fase líquida e o biocatalisador e, principalmente, reduzir a quebra e o desgaste das partículas por atrito.

ii) Reatores tubulares

Os reatores tubulares utilizados com enzimas imobilizadas são os de leito fixo, de leito fluidizado e de membrana:

a) **Reator de leito fixo**

O reator de leito fixo (PBR – *packed bed reactor*) é o mais utilizado na catálise enzimática heterogênea. Neste tipo de reator a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dela (Figura 2.10d) (PRADELLA, 2001). A alimentação contínua do substrato pode ser feita tanto no sentido ascendente, com o auxílio de bombas, como descendente, aproveitando a força da gravidade. Em alguns casos o fluxo descendente pode causar compactação do leito, promovendo a colmatação do sistema, o que faz com que o fluxo ascendente seja geralmente preferido para aplicações industriais. A compactação natural das partículas pode ocasionar caminhos preferenciais do fluido através da coluna, assim como variações de vazões. Geralmente, este tipo de reator caracteriza-se por uma significativa perda de carga, dependendo da vazão de alimentação, viscosidade do substrato, forma das partículas do suporte, extensão e geometria da coluna. A escolha de um suporte adequado facilita estabelecer condições de melhor equilíbrio operacional (ILLANES *et al.* 1998, MARIOTTI, 2000; OZDURAL *et al.* 2003, MUFTAH *et al.* 2005).

b) **Reator de leito fluidizado**

O reator de leito fluidizado (FBR – *fluidized bed reactor*) é um híbrido do PBR e do CSTR, em termos do comportamento do fluido. A enzima imobilizada neste caso encontra-se

em suspensão no interior do reator, sendo a solução de substrato bombeada através dela. A velocidade de escoamento da solução de substrato é tal que impede a deposição das partículas no fundo do reator, e é fraca o suficiente para evitar que as mesmas sejam arrastadas no efluente (PRADELLA, 2001; ROY *et al.* 2003). Neste tipo de reator, cuja forma geométrica também é uma coluna, as partículas de enzima imobilizada ficam em suspensão, evitando riscos de colmatção, inerentes aos reatores de leito fixo (Figura 2.10e). Os custos energéticos necessários para manter a fluidização do leito limitam o uso desses reatores. Os reatores de leito fluidizado são os mais adequados quando a solução de substrato tem elevada viscosidade, quando substrato ou produto são gasosos ou os substratos contêm partículas.

c) **Reator de membrana**

A operação de reatores de membrana é fundamentada na separação de enzimas, produtos e substratos por uma membrana semi-permeável, que estabelece uma barreira seletiva permitindo apenas a passagem do substrato e/ou produto (Figura 2.10f). Os reatores de membrana são divididos em duas categorias: aqueles que operam com substratos de baixo peso molecular, tanto produtos como substratos permeiam a membrana; e aqueles que convertem substratos macromoleculares, somente os produtos permeiam a membrana (PORTACCIO *et al.* 1998, HATZINIKOLAU *et al.* 2005).

2.11.3 – Fatores a considerar na escolha do reator

De acordo com MESSING (1978), BAILEY (1986), CAO (2005) e BULCHHOLZ *et al.* (2005) a seleção do tipo de reator a ser utilizado em um processo com enzimas imobilizadas depende de fatores como:

➤ Forma da enzima imobilizada

Uma enzima imobilizada pode se apresentar em diversas formas tais como: partículas, membranas, fibras.

Um reator tipo “CSTR” é aconselhado para partículas bem resistentes ao atrito, pois pode ocorrer redução do diâmetro médio das partículas do biocatalisador, que pode sair do reator, contaminando o produto final. A opção do reator tipo cesta reduz muito a intensidade dessa abrasão.

Partículas com diâmetro reduzido ($<300\mu\text{m}$) não devem ser utilizadas em reatores de leito fixo, pois acarretam um aumento na queda de pressão ao longo do leito catalítico. Assim, a melhor opção para empregar enzimas imobilizadas deformáveis e de diâmetro reduzido é a utilização de leito fluidizado, o qual evita a queda de pressão e problemas de entupimento (VICENTE, 2000).

Enzimas na forma de membranas ou em fibras são mais adequadas ao uso em leito fixo e em alguns casos quando estão divididas em pedaços pequenos, pode utilizar reator tipo “CSTR”.

➤ Natureza do substrato

Substratos que contém sólidos em suspensão, natureza coloidal ou apresentam alta viscosidade são suscetíveis de bloquear reatores de leito fixo, conduzindo a elevadas quedas da pressão. Por isso, neste caso o mais utilizado é o reator tipo “CSTR” que pode processar substratos coloidais e até insolúveis, desde que o grau de agitação seja intenso.

Para soluções de substratos que contenham impurezas insolúveis, as mesmas devem ser filtradas na entrada para ser possível a utilização em leito fixo.

➤ Requisitos operacionais de reação

Para sistemas que requerem controle de pH e temperatura, os reatores mais adequados são do tipo “CSTR”.

➤ Cinética da reação

As enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten, em que a velocidade da reação é menor em baixas concentrações de substrato, são menos produtivas em reatores tipo CSTR do que em leito fixo. Então quando se deseja um alto grau de conversão e apresenta gradientes de concentração de substrato no interior do reator o mais adequado é o de leito fixo.

➤ Teor de enzima no suporte

A concentração de biocatalisador (massa de suporte/volume de reator) é pequena em “CSTR”, mediana em leito fluidizado e alta em leito fixo. Logo se a capacidade do suporte em reter a enzima for baixa, a utilização de reatores tipo “CSTR” e leito fluidizado pode necessitar de um elevado tempo de residência ou operações em vários reatores em série, o que pode acarretar problemas de viabilidade econômica do processo.

➤ Características de transferência de massa

A possibilidade de utilização de partículas biocatalíticas de pequeno diâmetro (da ordem de $10\mu\text{m}$), e a decorrente acessibilidade do substrato a estas nos reatores de leito fluidizado, conduzem à diminuição dos problemas de transferência de massa e de calor neste

tipo de reator comparativamente ao de leito fixo, sem causar o problema de abrasão existente nos reatores do tipo “CSTR”.

- Facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração

Quando há a necessidade de manipulação do biocatalisador no interior do reator para manutenção da atividade catalítica, ou seja, operações de retirada contínua ou periódica de enzimas imobilizadas, os reatores de leito fluidizado e tipo “CSTR” são as melhores opções.

- Facilidade de construção do reator e custo do mesmo

O reator tipo tanque contínuo agitado “CSTR” é o de concepção mais simples e, portanto, o mais simples de construir. Entretanto, os custos operacionais deste e do leito fluidizado são mais elevados que o de leito fixo, devido à necessidade de uma potência alta de agitação e de fluidização do conteúdo do reator.

2.11.4 – Problemas Operacionais de Reatores Enzimáticos

Além dos problemas de natureza física, como entupimento, abrasão de partículas, dificuldades de fluidização, pode-se citar outros que contribuem para a desativação e queda de conversão, como o excesso de agitação, variações de temperatura por falha do controle termostático, variações de composição na corrente de alimentação e, principalmente, contaminação microbiana. Em reatores submetidos a longos períodos de operação contínua, a contaminação pode se tornar um problema muito sério. Uma alternativa é um tratamento periódico do reator com agentes bacterostáticos ou fungicidas, não prejudiciais ao biocatalisador ou a esterilização do substrato na alimentação do reator (CHEETHAM, 1985). Outra opção seria a operação em temperaturas elevadas, mas depende do limite da estabilidade da enzima.

2.11.5 - Reatores com lactase imobilizada

PASTORE e PARK, (1981), descreveram o processo com lactase de *Scopulariopsis sp* imobilizada em Duolite. Este sistema não perdeu atividade com o tratamento a 55°C e perdeu 45% após 52 horas a 60°C. Depois de 1284 horas de operação, a resina reteve 94% de sua atividade original. PRENOSIL *et al.* (1987), examinaram a hidrólise do permeado de lactose em reator de leito fixo com lactase de *Aspergillus Níger*, operando a 30°C. COUGHLIN *et al.*, (1975), examinaram a hidrólise do soro ácido usando leito fluidizado

contendo lactase de *Aspergillus niger* imobilizada em alumina. Uma redução da atividade lenta e constante foi observada no tratamento do soro, provavelmente devido à adsorção de sólidos no sítio-ativo da enzima. ZHONG-CHENG-HU *et al.* (1993) estudaram lactase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em espuma de poliuretano em reator de leito dinâmico, em pH 7,3 e temperatura de 37°C. A lactase ficou estável nas condições operacionais durante aproximadamente 15 horas. RUBIOLO e CARRARA, (1997), estudaram a lactase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em quitosana, operando em reator de leito fixo com solução de lactose variando de 2,5 a 10%. OBÓN *et al.*, (2000) imobilizaram a lactase de *Kluyveromyces lactis* em resina Amberlite IRC – 50 para a hidrólise do leite em um reator de leito empacotado operando continuamente. Os resultados foram comparados com os obtidos em um reator batelada com a enzima em sua forma livre. Um modelo matemático foi ajustado e comparado com os valores experimentais. ATES e MEHMETOGLU (1997), estudaram o comportamento da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre e imobilizada em esferas de alginato de cobalto tratadas com solução de glutaraldeído a 1%. Um reator tipo *plug-flow* foi utilizado com as enzimas na forma imobilizada e estudou-se o efeito do tempo de residência na produção de glicose. MARIOTTI (2000), estudou a operação de um reator de leito fixo com enzima β -galactosidase imobilizada em sílica de porosidade controlada, quantificando inicialmente a relação entre temperatura de operação, vazão e conversão na saída do reator, para determinada quantidade de enzima imobilizada. Estes dados permitiram definir as condições para os ensaios de estabilidade operacional da β -galactosidase imobilizada, inicialmente com lactose como substrato. A estabilidade operacional foi estudada em três temperaturas (40, 45 e 55°C) trabalhando-se com 2 vazões para cada temperatura (0,5 mL/min e 5mL/min). Foi acompanhado a concentração de glicose na saída do reator, de forma a avaliar a taxa de inativação da enzima determinando assim o tempo de meia vida operacional em cada caso. Os resultados mostraram que à 55°C a uma vazão de 5,0mL/min a atividade inicial do reator foi 450U/g com uma diminuição de 66% da atividade em 11 dias, sendo o tempo de meia vida de 7 dias; a 45°C a atividade inicial foi de 410U/g e o reator operou durante 100 dias, perdendo 53% da atividade, sendo o tempo de meia vida de 100 dias; a 40°C a atividade inicial foi de 400U/g, mas com maior estabilidade pois o reator operou com 130 dias, perdendo 32% da atividade, sendo o tempo de meia vida estimado em 1 ano. SHEU *et al.* (1998), estudaram a formação de galactooligossacarídeos (GOS) em um reator *plug-flow* com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada tratada com glutaraldeído em esferas de quitosana. Os máximos rendimentos alcançados foram 18, 21 e

26% com concentrações de lactose de 100, 200 e 300g/L respectivamente. Obteve-se menores rendimentos de GOS no sistema imobilizado do que no sistema da enzima livre. No sistema contínuo de reação, não se obteve perda significativa de atividade depois de 30 dias de operação. DI SERIO *et al.* (2003), estudaram o comportamento cinético da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* imobilizada em diferentes suportes óxidos tais como alumina, sílica e silicato de alumina. Observaram uma forte dependência entre a atividade da enzima imobilizada com a natureza química e a estrutura física do suporte, em especial o tamanho da partícula. O suporte sílica apresentou uma melhor performance do que a alumina para estruturas porosas similares. Já o silicato de alumina apresentou resultados comparativos com os obtidos em sílica confirmando a importância da natureza química do suporte. A atividade enzimática decresceu com o aumento do tamanho da partícula. Um estudo cinético de pellets esféricos de sílica (0,25 – 0,50 mm) em um reator de leito fixo foi realizado. O modelo cinético que mais se ajustou foi de Michaelis-Menten com inibição pelos produtos.

2.12 - Cinética enzimática

Cinética enzimática é definida como o estudo da velocidade da reação enzimática e como ela é alterada devido às mudanças nas condições experimentais, principalmente em respeito à concentração da enzima, concentração de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura.

De acordo com SEGEL (1993) a análise correta destas mudanças das condições experimentais possibilita caracterizar a reação enzimática:

- Variando-se a concentração de substrato e produto é possível deduzir-se um mecanismo cinético da reação;
- O estudo dos efeitos da variação do pH e da temperatura nas constantes cinéticas pode fornecer informação em relação aos grupamentos dos sítios ativos;
- A análise cinética pode levar a um modelo para a reação enzimática e, reciprocamente, os princípios da cinética enzimática podem ser usados para escrever a equação da velocidade para um modelo proposto, o qual poderá então ser testado experimentalmente.

A taxa de reação catalisada por enzima depende diretamente da concentração desta. Uma técnica experimental muito utilizada em cinética enzimática é a determinação das taxas

iniciais de reação. A taxa de formação de produto ou de consumo de substrato deve ser constante em toda a faixa de tempo de estudo para se medir a verdadeira taxa inicial. Assim, é preciso estabelecer o limite de linearidade para utilizar o procedimento de taxas iniciais, antes que a concentração de produtos (P) em função do tempo (t) e velocidade (v) em função da concentração de enzimas (E_t) se tornem não lineares.

Na reação catalisada por enzimas, sabe-se que esta combina com o substrato de maneira muito específica. Dentre as várias maneiras que tentam explicar a especificidade da enzima e sua atividade, o conceito de sítio ativo e complexo enzima-substrato são universalmente aceitos e são a base para os diversos modelos de equações propostos (CARBERRY, 1976; SEGEL, 1993).

Com relação ao efeito da concentração do substrato, para situações onde efeitos inibitórios de substrato e de produto são desprezíveis, o modelo cinético mais utilizado é o de Michaelis-Menten, Equação 2.16 (BAILEY, 1986).

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (2.16)$$

O parâmetro V_m indica a velocidade limitante de uma reação catalisada por enzima nas condições de saturação, sendo denominado velocidade máxima da reação (ou taxa máxima de reação), e K_m a constante do modelo de Michaelis-Menten.

A equação de Michaelis-Menten é muito utilizada para modelar diversas reações enzimáticas, mas sabe-se que para ser aplicada com sucesso a concentração da enzima deve ser pequena se comparada àquela do substrato e ainda a concentração de produto deve ser desprezível, ou seja, nos instantes iniciais da reação. Para situações onde as concentrações de enzimas e substratos são comparáveis, a equação de Michaelis-Menten pode ser inapropriada, como ocorre nos finais dos processos enzimáticos conduzidos em batelada. Para situações de processos industriais, em presença de altas concentrações de substrato ou de produtos e em presença de inibidores presentes no meio reacional, deve-se utilizar modelos cinéticos mais elaborados, porém a maioria destes tem como ponto de partida a equação de Michaelis-Menten, na qual são inseridos termos de correção, para levar em conta inibidores, ativadores e múltiplos substratos (RIBEIRO, 1989; BULCHHOLZ *et al.* 2005).

2.12.1 – Presença de Inibidores no Meio Reacional

A determinação da cinética enzimática de reações na presença de inibidores pelo modelo de Michaelis-Menten, consideradas as devidas modificações é relativamente simples e

possível. Porém, à medida que os sistemas vão se tornando mais complexos, a determinação cinética requer um tratamento mais detalhado e rigoroso. A seguir são apresentados alguns modelos cinéticos que consideram inibição pelo substrato ou pelos produtos da reação, todos derivados do modelo clássico de Michaelis-Menten, muito utilizados em processos com reações envolvendo um substrato, ou dois substratos, com um deles em excesso, como é comum nas reações de hidrólise (RIBEIRO, 1989).

Quando uma alta concentração de substrato está presente, esta pode inibir a taxa de reação. A velocidade da reação atinge um máximo conforme vai aumentando a concentração de substrato e após este ponto, um acréscimo de substrato inibe a reação. É assumido um mecanismo onde a segunda molécula de substrato se liga ao complexo ES, formando um complexo ESS. A Equação 2.17 representa este efeito inibitório, conhecida como modelo de inibição pelo substrato:

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.17)$$

Sendo: K_i é a constante de inibição pelo substrato.

Além da inibição pelo substrato, na literatura é apresentado grande número de modelos de inibição enzimática, tanto pelos produtos da reação, como por componentes do meio reacional, sendo os modelos mais comuns: inibição competitiva, não-competitiva, acompetitiva, mista linear e parcialmente não-competitiva, os quais são representadas pelas Equações 2.18, 2.19, 2.20, 2.21 e 2.22, respectivamente (SEGEL, 1993):

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.18)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2.19)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.20)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (2.21)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.22)$$

A inibição competitiva caracteriza-se pela competição entre o inibidor e o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto este agente se mantém ligado à enzima não ocorre reação, pois impede a formação do complexo enzima-substrato. Esse agente pode ser um análogo não metabolizável ou um derivado de substrato verdadeiro ou um produto da reação. Neste tipo de inibição o valor de K_m aumenta e V_m permanece constante.

Na inibição não-competitiva o inibidor se liga ao um sítio diferente ao que o substrato iria se ligar, formando o complexo EI e o ESI, impedindo que o substrato se aloje perfeitamente em seu sítio ativo, diminuindo a velocidade de formação de produto. Esta inibição irá produzir redução em V_m , mas a afinidade da enzima pelo substrato não sofrerá alteração, ou seja, não haverá alteração no K_m .

A inibição incompetitiva caracteriza-se pela formação de um complexo ESI inativo. Assim, qualquer que seja a concentração de substrato haverá sempre uma forma improdutiva (complexo ESI), reduzindo-se a velocidade máxima da reação. O valor do parâmetro K_m também diminui, pois parte do complexo produtivo ES é consumido no processo de formação do complexo improdutivo. Na inibição mista linear a presença do inibidor **I** na enzima modifica a constante do modelo de Michaelis-Menten de K_m para $K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)$. E na inibição parcialmente não competitiva o inibidor **I** modifica diretamente a velocidade máxima e o valor de K_i .

Um inibidor comum presente em várias reações é a concentração do substrato, por isso é importante estudar a concentração ideal de substrato que não oferece risco de inibição.

2.12.2 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Cada sistema enzima-substrato apresenta valores característicos dos parâmetros cinéticos para cada modelo cinético considerado, para condições específicas de pH, temperatura e concentração de substrato. Para cinéticas com enzimas imobilizadas, os parâmetros cinéticos podem sofrer alteração em relação às livres. DANISMAN *et al.* (2004), sugeriram o aumento de K_m e a redução de V_m na imobilização de enzimas em polímeros.

GÜRSEL *et al.* (2003) estudaram os parâmetros cinéticos K_m e V_m para invertase livre e imobilizada em temperatura e pH constantes, enquanto variava a concentração de substrato. O perfil da atividade enzimática seguiu a cinética de Michaelis e Menten, e os parâmetros K_m e V_m foram obtidos pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, indicando diminuição para o valor de V_m e aumento de K_m para enzima imobilizada em relação à livre.

Os parâmetros cinéticos de invertase imobilizada e livre foram determinados por BAYRAMOGLU *et al.* (2003). O valor da constante de Michaelis K_m mostrou um significativo crescimento de 2,7 vezes quando a enzima estava imobilizada enquanto o V_m diminuiu.

CHANG e JUANG (2005) estudaram a cinética da reação enzimática de três enzimas: α -amilase, β -amilase e glucoamilase. Os valores encontrados de K_m e V_m das três enzimas foram maiores quando estas estavam imobilizadas, com exceção da glucoamilase que obteve o V_m maior quando o ensaio era com a enzima livre.

BORA *et al.* (2005) determinaram os valores de K_m e V_m igual a 45,12mM e 362,31 U/mg, respectivamente, para a invertase imobilizada. Para a enzima livre encontrou-se $K_m=25,91$ mM e $V_m=416,67$ U/mg. Pode ser observado que o valor de K_m para a invertase imobilizada foi de 1,7 vezes à livre.

2.12.3 - Cinética de hidrólise de lactose livre e imobilizada

TOMÁS, (1998), estudou a cinética da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre e imobilizada em dois tipos de suportes, sílica de porosidade controlada e resina de troca iônica de nome comercial Duolite. Em ambas situações, o modelo cinético encontrado foi de Michaelis-Menten. Para a enzima na forma livre ocorreu inibição pelo produto (galactose) e os valores dos parâmetros encontrados foram K_m igual a 17,04 g/L e K_i igual a 54,26 g/L. Neste mesmo estudo, o pH de maior estabilidade da enzima imobilizada

foi 6,5, sendo este também o pH ótimo e 40°C sendo a temperatura ótima. A atividade enzimática foi crescente de 10 a 110g/L, estabilizando-se a partir deste ponto. O estudo da estabilidade térmica na forma livre determinou que o tempo de meia vida da enzima a 40°C foi de 682,2 min e a 55°C foi de 1,12 min. Já na forma imobilizada, a atividade catalítica máxima para o suporte sílica foi de 1,49g/(g.L.min) e em Duolite foi de 0,84g/(g.L.min).

TANRISEVEN e DOGAN, (2002), trabalharam com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre e imobilizada em fibras de alginato com gelatina tratadas com glutaraldeído que age como agente ligante. O valor do parâmetro K_m foi de 42 e 51 mM para as formas livre e imobilizada, respectivamente, e o valor de V_m foi de 1,30 e 0,73 mg glicose/min por grama de enzima para V_m . Para ambas as formas, a temperatura ótima obtida foi de 50°C e o pH ótimo foi de 4,5. A forma imobilizada apresentou uma maior estabilidade a altas temperaturas e faixas de pH. O rendimento de imobilização foi alto (56%) e a enzima ficou ativa por 35 dias sem perder atividade, sugerindo que este método possa ser usado para a hidrólise da lactose industrialmente. MAUGARD *et al.*, (2003), estudaram a síntese de galactooligossacarídeos (GOS) a partir de lactose utilizando a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre e imobilizada em resina catiônica Duolite A-568. O modelo de Michaelis-Menten foi ajustado em ambas as formas e os valores de K_m 4,1 mM e 26,6 mM foram obtidos para as formas livres e imobilizadas respectivamente. A estabilidade foi estudada a 40°C, indicando uma meia vida para as formas livre e imobilizada de 2 horas e 15 horas respectivamente sem lactose, e 20 horas e 40 horas com lactose a 50g/L. A irradiação por microondas (15 horas; 12W e 40°C) não afetou a atividade na forma imobilizada, visto que na forma livre quando submetida ao mesmo tratamento teve queda de atividade. RUBIOLO e CARRARA (1997), desenvolveram um método para avaliar a hidrólise da lactose num reator de leito fixo com β -galactosidase imobilizada em quitosana. O modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto foi o que melhor se ajustou. CHEN e QUINN, 2001, estudaram β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre e imobilizada em superfície de eletrodos de grafite usando glutaraldeído como agente ligante (cross-linking). O rendimento específico de atividade foi de 17% e 25%, enquanto que uma carga de enzima de 1,8 e 1,1 U/cm² na área de superfície externa do grafite foi utilizada. O rendimento de atividade diminuiu com o aumento da carga de enzima. O modelo de Michaelis-Menten foi ajustado pelo gráfico de Lineweaver-Burk foram determinados os valores dos parâmetros cinéticos. A enzima imobilizada apresentou-se estável e ativa nas condições operacionais, com considerável conversão de lactose, ilustrando esse processo

como sendo um possível método de aplicação industrial. JURADO *et al.* 2002, estudaram a hidrólise enzimática da lactose através de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* na forma livre. As variáveis analisadas foram temperatura (25 – 40°C), concentração de enzima (0,1 – 3,0 g/L), concentração de lactose (0,0278 – 0,208M) e concentração inicial de galactose (0,0347 M). Foi proposto um modelo de Michaelis-Menten, com inibição competitiva pela galactose. Foi verificado uma afinidade entre produto e substrato pela ocupação do sítio ativo da enzima, fazendo com que as constantes de equilíbrio possuíssem valores iguais e formuladas de acordo com a temperatura: $K_m = K_i \cdot 1,44 \cdot 10^{-2} \exp\left(-\frac{5920}{RT}\right)$. LADERO *et al.* (2000), desenvolveram um modelo cinético para a hidrólise de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em sílica-alumina em um reator batelada. As principais variáveis do modelo foram: temperatura, concentração de substrato e produto e concentração de enzima. O efeito do pH e da temperatura ótima foram estudados, sendo o pH ótimo igual a 7 e a máxima temperatura empregada de 40°C. O modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pela galactose foi utilizado. Este modelo foi capaz de ajustar corretamente uma vasta área de experimentos estudados.

2.13– Influência dos efeitos de transferência de massa na cinética das reações enzimáticas

As alterações das propriedades cinéticas na enzima imobilizada são ocasionadas pelas interações entre vários efeitos como pH, temperatura, concentração de substrato e inibidores. Admite-se a existência de parâmetros cinéticos diferenciados, de acordo com o efeito que efetivamente controla o comportamento cinético da enzima imobilizada.

ENGASSER e HORVATH (1976) apresentam as seguintes definições:

- a) Parâmetros cinéticos intrínsecos – parâmetros relativos a uma enzima imobilizada em particular, sendo diferentes dos da correspondente enzima solúvel, devido a efeitos conformacionais e estereoquímicos;
- b) Parâmetros cinéticos inerentes – parâmetros observados na ausência de efeitos difusionais, diferindo dos intrínsecos devido a efeitos de partição;
- c) Parâmetros cinéticos efetivos ou reais – parâmetros obtidos na presença de efeitos difusionais, de partição, conformacionais e estereoquímicos;

Outras definições são encontradas na literatura, como por exemplo, GOLDSTEIN (1976), parâmetros efetivos são relativos a uma enzima imobilizada, quando limitações difusionais são significantes.

Na literatura relativa a catálise heterogênea, o termo taxa de reação química intrínseca refere-se a dados cinéticos obtidos na ausência de efeitos de transferência de massa externos e internos. Parâmetros obtidos na presença de tais efeitos, são normalmente denominados de aparentes. Assim, constante de taxas de reação intrínsecas são relacionadas com a cinética química em si, não sendo mascaradas pela transferência de massa e são válidas para qualquer geometria de catalisador e tipo de reator que se use (BAILEY, 1986; HILL, 1977).

O fato que em catálise heterogênea os reagentes e catalisadores estão em fases diferentes, significa que a taxa de conversão também pode ser determinada pela taxa de transporte de reagentes de uma fase para a outra. Se a superfície catalítica é externa, pode haver somente resistência à difusão externa. Se a superfície cataliticamente ativa está também situada no interior da partícula do catalisador a taxa de reação pode ser limitada por uma resistência à difusão externa, interna ou ambas (FROWS, 1976).

A cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre a enzima e o substrato, mas pode estar sendo limitada pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte, ou internamente, por entre os poros do suporte. Nesse caso, a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que a que haveria caso reagente e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo), conseqüentemente, a velocidade de reação do sistema contendo enzima imobilizada (velocidade real) é menor do que a velocidade do sistema livre.

Efeitos difusivos externos surgem quando a velocidade de difusão do substrato na camada estagnada que envolve a partícula porosa onde está imobilizada a enzima é comparável à velocidade intrínseca da reação. Esse efeito pode ser minimizado aumentando-se a velocidade do fluído de modo a diminuir a espessura dessa camada, e, conseqüentemente, o tempo de difusão. Quando o catalisador está imobilizado na área interna de uma partícula porosa, podem surgir também efeitos difusionais intrapartícula, em função da necessidade do substrato de se difundir no interior desses poros para encontrar a enzima imobilizada e só então reagir (GALVÃO, 2004).

Na difusão interna apenas a fração do catalisador ocupada pelo fluído que preenche os poros está disponível para difusão, fração quantificada pela porosidade do suporte (ϵ_p); a

geometria do poro é complexa e não uniforme, aumentando o caminho a ser percorrido (fator de tortuosidade - τ); as moléculas de substrato e o poro do catalisador podem ter tamanhos similares, o que causa restrição da difusão, diminuindo a velocidade de difusão em relação à molecular, que ocorre na camada estagnada. Tais efeitos são incorporados na difusividade efetiva (D_{ef}), dado pela Equação 2.23:

$$D_{ef} = D_A \cdot \frac{\varepsilon_p \cdot \sigma}{\tau} \quad (2.23)$$

onde σ é o fator de constricção: depende da razão entre a maior e a menor área do poro; τ é a tortuosidade: razão entre o caminho real que uma molécula percorre entre dois pontos no interior do poro e o menor caminho entre esses dois pontos e D_A é a difusividade mássica do componente A em solução.

Na difusão externa, difusão e reação são fenômenos que ocorrem em série; já na difusão interna, difusão e a reação ocorrem simultaneamente no interior da partícula, com a velocidade de reação sendo função do diâmetro da partícula. Assim, a velocidade global aparente é uma velocidade média obtida pela integração da velocidade ao longo do raio do suporte (GALVÃO, 2004).

Uma forma de avaliar se o processo enzimático é regido ou não por efeitos difusivos intrapartícula refere-se ao cálculo da efetividade interna (η), que relaciona a velocidade da reação (com a enzima imobilizada) com aquela que deveria ser obtida na ausência de efeitos difusivos, ou seja, como se a enzima estivesse livre. Assim, para valores de efetividade interna (η) bem menores que um, tem-se que a velocidade real do sistema é muito menor que a velocidade teórica; logo, há resistência difusional limitando a reação aumentando o valor de k_m .

A estimativa de η pode ser feita usando correlações experimentais entre η e o adimensional ϕ (módulo de Thiele), visto que $\eta = f(\phi)$ de acordo com a Figura 2.11.

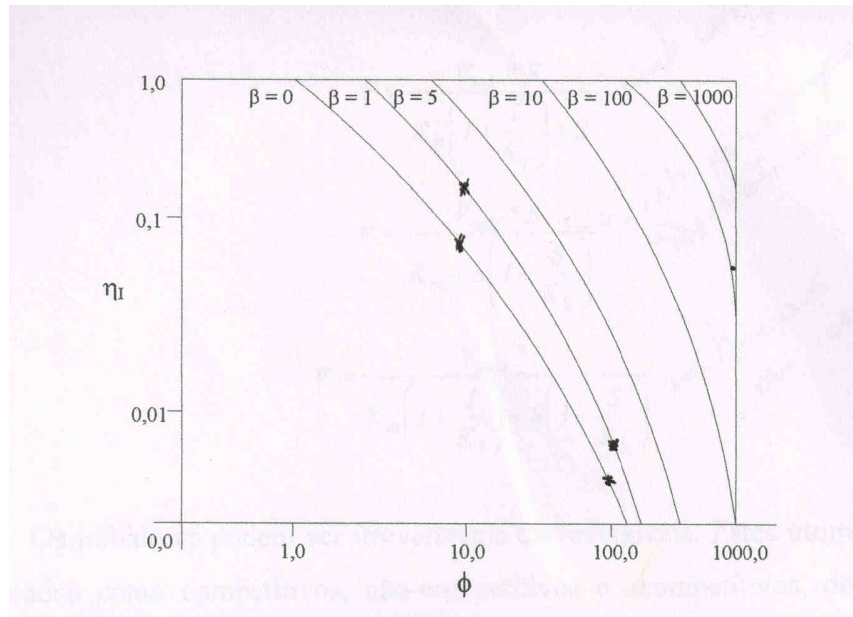


Figura 2.11 – Fator de efetividade interno (η) em função de Thiele (ϕ) para vários valores de concentração de substrato adimensional ($\beta_s = C_s / K_m$).

Dependendo da cinética da reação, diferentes combinações de variáveis podem ser usadas para definir o módulo de Thiele, como mostram as Equações 2.24 e 2.25 (BLANCH e CLARK, 1997):

-Para reação de ordem n

$$\phi_n = R_p \cdot \left(\frac{S_p \cdot \rho_p \cdot k_n \cdot (C_s)^{n-1}}{D_{ef}} \right)^{1/2} \quad (2.24)$$

- Para cinética de Michaelis-Menten (esfera)

$$\phi = \frac{R_p}{3} \left[\frac{V_m}{k_m \cdot D_{ef}} \right]^{1/2} \quad (2.25)$$

Problemas difusionais ocorrem em consequência de atrasos no transporte de substrato para o interior da partícula, fazendo com que a concentração de substrato no interior seja menor que a concentração de substrato na superfície. Assim, quando a velocidade intrínseca não depende da concentração de substrato (ordem zero) é porque este está em grande excesso e, neste caso, $\beta_s \gg 1$ ($\beta_s = C_s / K_m$). A não ser que ϕ seja muito grande, ou seja, V_m muito maior que D_{ef} (reação rapidíssima), mesmo que a concentração do substrato seja menor no interior da partícula pode ser que ele ainda esteja em excesso relativamente à K_m , fazendo com que a efetividade se mantenha próxima de 1.

Quanto menor a concentração do substrato, mais importante se tornam os efeitos difusionais, pois a velocidade da reação se torna muito sensível a variações na concentração do substrato. A Figura 2.11 mostra como esse fato implica que para mesmos valores do módulo de Thiele a efetividade diminui com a diminuição de β . Deste modo, altos valores de ϕ significam reação rápida e/ou difusão lenta e diminuição da efetividade com a diminuição de β ; baixos valores de ϕ significam reação lenta e/ou difusão rápida, com $\eta \cong 1$ para qualquer β .

Alguns pesquisadores descrevem a cinética de enzimas imobilizadas em termos de parâmetros aparentes. Na determinação destes, normaliza-se na forma de Lineweaver-Burk os dados de taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato obtidos de um reator em estado estacionário. REGAN *et al.* (1974), entretanto, mostram através de dados obtidos por simulação, a grande influência do diâmetro da matriz nos valores dos parâmetros aparentes. Por outro lado, outros pesquisadores abordam o problema em termos de parâmetros efetivos. Na determinação destes, utiliza-se um balanço de massa envolvendo difusividade de massa e taxa de reação. Os princípios e considerações sobre este balanço são sumarizados a seguir.

Na determinação de parâmetros efetivos é necessário o conhecimento do perfil de concentração de substrato no interior da matriz. Para tal, deve-se determinar num primeiro passo o coeficiente de transferência de massa na camada limite (k_L), com intuito de se calcular a concentração na superfície da matriz. A partir daí, determina-se o perfil de concentração no interior por intermédio de um balanço de massa envolvendo difusividade de massa e taxa de reação. Para uma matriz porosa, o substrato presente no reator, difunde-se para dentro da matriz, e em presença da enzima transforma-se em produto(s). O substrato e produtos de reação podem difundir através dos poros, enquanto que a enzima de alto peso molecular fica aprisionada entre as moléculas do gel (CABRAL,1989). A Figura 2.12, ilustra de forma esquemática, o tipo de perfil de concentração de substrato em uma matriz esférica contendo enzima imobilizada e imersa em um meio agitado, sendo R , S_e e S_b o raio da matriz, concentração de substrato na superfície externa e concentração de substrato no meio líquido do reator, respectivamente.

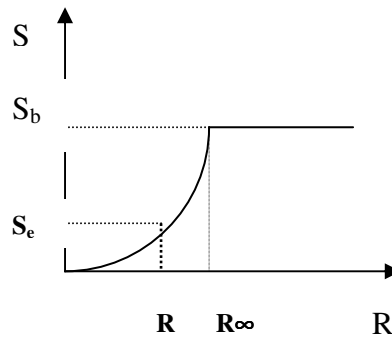


Figura 2.12 – Esquema do perfil de concentração de substrato em suporte esférico, contendo enzima imobilizada.

O perfil esquemático apresentado na Figura 2.12 surge da solução da Equação de balanço de substrato na partícula. Neste balanço de massa no interior da matriz, as seguintes suposições são admitidas:

- A enzima é homogeneamente distribuída no interior da matriz;
- O sistema está em estado estacionário;
- O modelo cinético da taxa de reação é de forma análoga à enzima livre;
- A difusividade efetiva de massa D_{ef} no interior é constante em qualquer posição;
- O substrato e produtos de reação podem difundir através da matriz, enquanto que a enzima não.

Partindo-se de tais suposições, toma-se um elemento de volume dV no interior de uma matriz esférica, como esquematizada na Figura 2.13.

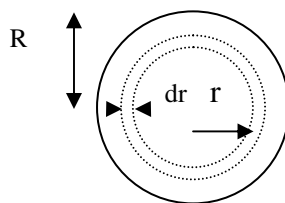


Figura 2.13 – Esquema de um elemento de volume no interior de uma matriz esférica.

A diferença entre o fluxo de substrato por unidade de área da esfera na posição $r+dr$ e na posição r , é devido ao consumo do substrato por reação enzimática no elemento de volume dV . Desta forma o balanço de massa em termos de substrato pode ser escrita pela Equação 2.26.

$$j \cdot A|_{r+dr} - jA|_r = r(S) \cdot dV \quad (2.26)$$

Onde j é o fluxo de massa e $r(S)$ é a taxa de reação no elemento de volume dV , e $A|_{r+dr}$ e $A|_r$ são as áreas superficiais da esfera nas posições respectivas.

Pela primeira Lei de Fick, pode-se escrever o fluxo de massa j de acordo com a Equação 2.27:

$$j = -D_{ef} \cdot \frac{dS}{dr} \quad (2.27)$$

Onde D_{ef} é a difusividade efetiva de substrato no suporte. Substituindo-se a Equação 2.27 em 2.26, definindo a área e volume para a partícula esférica e aplicando a definição de derivada para a variável r , pode-se deduzir a Equação 2.28 geral:

$$D_{ef} \left[\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = r(S) \quad (2.28)$$

Admitindo-se as seguintes condições de contorno:

a) O gradiente de concentração no centro da esfera é nulo: $\frac{dS}{dr}|_{r=0} = 0$

b) O fluxo de substrato para o interior da matriz, devido a transferência de massa por convecção na camada limite, deve ser igual ao fluxo de substrato por difusão molecular para o interior da mesma conforme Equação 2.29: $j = D_{ef} \cdot \frac{dS}{dr}|_{r=R} = k_L \cdot (S_b - S_e)$ (2.29)

Vários trabalhos são apresentados na literatura, realizados em diversos tipos de reatores e em diversas geometrias de matriz contendo enzimas e utilizando-se deste procedimento. JEISON *et al.* (2003), utilizando simulação matemática, estudaram o efeito de cinética da reação e tamanho da partícula no fator de efetividade em enzimas imobilizadas, submetidas a restrições difusionais internas. KRORASHEH *et al* (2002), desenvolveu uma metodologia de otimização aplicada para estimar parâmetros cinéticos intrínscos para reações reversíveis e irreversíveis que seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten. O método utiliza um algoritmo de busca direta de otimização no qual a solução numérica é governada por equações diferenciais. A utilidade e validade do método é demonstrado por comparação dos valores preditos das constantes cinéticas intrínscas obtidas pelo método com os valores experimentais obtidos da literatura para diferentes sistemas de enzimas imobilizadas. MUFTAH e REESH (2005) desenvolveram um modelo matemático para prever a performance e simulação de hidrólise de lactose em um reator de leite empacotado com

enzimas imobilizadas , que seguiu cinética de Michaelis-Menten com inibição competitiva pela galactose. A performance deste reator foi analisada levando em consideração vários efeitos difusionais como dispersão axial, e limitações interna e externa de transferência de massa.