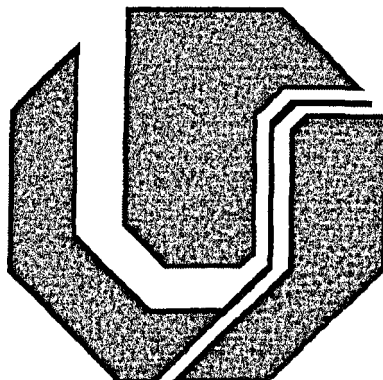


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MON
577.15
T655e
TES/MEM



**ESTUDO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE
E IMOBILIZADA**

Autor :Cláudia Maria Tomás

DIRBI/UFU



1000187179

Uberlândia - MG

Ano 1998

ESTUDO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA

Cláudia Maria Tomás

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(Orientador – DEENQ/UFU)

Prof. Dr. Euclides Honório de Araújo
(DEENQ/UFU)

Prof. Dr. Vicelma Luiz Cardoso
(DEENQ/UFU)



Prof. Dr. Tânia Lúcia Santos Miranda
(DEQ/UFMG)

UBERLÂNDIA, MG, BRASIL
23 DE NOVEMBRO DE 1998

13-0
4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE
E IMOBILIZADA

Cláudia Maria Tomás

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química,
área de concentração em Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos Químicos

Uberlândia-MG

1998

ESTUDO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA

Cláudia Maria Tomás

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Euclides Honório de Araújo
(DEENQ/UFU)

Prof. Dr. Vicelma Luiz Cardoso
(DEENQ/UFU)

Prof. Dr^a. Tânia Lúcia Santos Miranda
(DEQ/UFMG)

UBERLÂNDIA, MG, BRASIL
23 DE NOVEMBRO DE 1998

Dedico este trabalho, com pureza de alma, à minha família. Aos meus pais, João (in memoriam) e Gildete, às minhas irmãs Núbia e Núzia, ao meu Namorado Fernando, porque sempre vai valer a força e o estímulo de cada um.

Tomás, Cláudia Maria, 1972

Estudo da Hidrólise de Lactose por β -Galactosidase na Forma Livre e Imobilizada/

Cláudia Maria Tomás, 1998.

--Uberlândia: UFU, 1998

67f.

il

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Curso de Mestrado em Engenharia Química.

Bibliografia: f.: 66 - 67

1. Enzimas - Teses. 2. Enzimas imobilizadas - Teses. 3. Lactose - Teses. 4. Beta galactosidase - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia

CDU - 577.15

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pelas muitas outras maravilhas que conquisto no dia a dia.

À minha mãe, que é o meu próprio braço direito.

Ao meu pai, que mesmo ausente, tenho certeza, torceu e torce pelo meu sucesso.

Às minhas irmãs pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado pelo apoio e compreensão.

Ao professor Eloízio Júlio Ribeiro, pela orientação, apoio e compreensão.

Aos meus colegas de mestrado, todos, sem exceção.

Aos técnicos Humberto Belo e Silva, Zuleide Ferreira da Costa e Roberta Alves de Freitas Andrade, pela ajuda durante a parte experimental.

À FAPEMIG pela bolsa de estudo, sem essa talvez eu não pudesse dedicar-me exclusivamente ao mestrado.

Ao técnico Édio José Alves, pelo apoio na parte computacional da minha dissertação.

Ao ex-aluno e hoje professor, Ubirajara, pela ajuda na realização de alguns cálculos computacionais.

Ao professor Marcos Antônio Souza Barroso pela ajuda na análise de alguns dados.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia por buscar o aperfeiçoamento dos engenheiros.

À NOVO NORDISK pela doação da enzima -galactosidase

À Cooperativa Agropecuária Ltda de Uberlândia (CALU), indústria de processamento de leite de Uberlândia, pela cooperação e apoio.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	i
Lista de símbolos.....	ii
Resumo	iii
“Abstract”	iv

1- INTRODUÇÃO	01
----------------------------	-----------

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
--------------------------------------	-----------

2.1- Enzimas como catalisadores.....	03
--------------------------------------	----

2.2- Enzimas no processamento de leite	04
----------------------------------------------	----

2.3- Fontes de enzimas.....	
-----------------------------	--

2.3.1- Propriedades da lactase	
--------------------------------------	--

2.4- Lactose	06
--------------------	----

2.4.1- Hidrólise da lactose.....	06
----------------------------------	----

2.4.1.1- Produtos da hidrólise de lactose.....	07
------------------------------------------------	----

2.5- Métodos alternativos para hidrólise de lactose	07
-----------------------------------------------------------	----

2.6- Cinética Enzimática.....	08
-------------------------------	----

2.6.1- Modelo cinético de Michaelis-Menten	08
--------------------------------------------------	----

2.6.2- Inibição Enzimática.....	10
---------------------------------	----

2.7- Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	14
--------------------------------------------------------------------	----

2.8- Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas	15
------------------------------------------------------------------------------	----

2.9- Imobilização de Enzimas.....	18
-----------------------------------	----

2.9.1- Métodos de Imobilização de Enzimas.....	20
------------------------------------------------	----

2.9.2- Imobilização em Processo Industrial.....	22
-------------------------------------------------	----

2.9.3- Efeitos de Imobilização nas propriedades das enzimas.....	22
------------------------------------------------------------------	----

2.9.3.1- Inativação durante a Imobilização.....	22
-------------------------------------------------	----

2.9.3.2- Efeitos de Transferência de Massa.....	22
-------------------------------------------------	----

2.10- Imobilização de β -galactosidase.....	23
---------------------------------------------------	----

2.11-Planejamento de Experimentos.....	23
----------------------------------------	----

3- MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1- Enzima.....	26
3.2- Reagentes e suportes para imobilização.....	26
3.3- Tampão láctico.....	26
3.4- Unidade experimental da enzima livre.....	27
3.5- Unidade experimental para uso da enzima imobilizada.....	29
3.6- Métodos Experimentais.....	30
3.6.1- Determinação de glicose.....	30
3.6.2- Metodologia de dosagem de glicose	30
3.6.3- Determinação da atividade de β -galactosidase livre e imobilizada	31
3.7- Influência do pH e da temperatura na atividade de β -galactosidase livre	32
3.8- Estabilidade da enzima β -galactosidase em relação ao pH.....	32
3.9- Estabilidade térmica da enzima.....	32
3.10- Influência da concentração de lactose na atividade de β -galactosidase na forma livre.....	33
3.11- Determinação da influência dos produtos na atividade da enzima livre.....	33
3.12- Análise conjunta da temperatura, concentração e pH através do planejamento composto central.....	34
3.13- Imobilização de β -galactosidase em resina fenol-formaldeído (Duolite).....	35
3.14- Imobilização de β -galactosidase em Sílica de Porosidade Controlada (SPC).....	36
3.15- Variação da concentração de β -galactosidase no processo de imobilização em SPC.....	37
 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	 38
4.1- Influência do pH na taxa de reação catalisada por enzima livre.....	38
4.2- Estabilidade da enzima β -galactosidase livre em relação ao pH.....	39
4.3- Influência da temperatura na atividade de β -galactosidase na forma livre.....	41
4.4- Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase.....	42
4.5- Influência da concentração de lactose na atividade de β -galactosidase livre.....	45
4.6- Avaliação da presença de galactose no meio reacional.....	46
4.7- Análise do planejamento composto central.....	48
4.8- Imobilização de lactase em Duolite.....	51
4.9- Influência do pH na imobilização da sílica de porosidade controlada.....	51

4.10- Influência da concentração da enzima no processo de imobilização em SP.....	53
4.11- Cinética da reação de hidrólise de lactose por lactase imobilizada em SPC.....	54
5- CONCLUSÕES.....	56
6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	57
7- ANEXOS.....	58
Anexo A - Tabelas 01 e 02 contendo os valores experimentais de taxa de hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre, em função do pH e da temperatura do meio, respectivamente.....	59
Anexo B - Tabelas 03 e 04, que trazem os valores de taxa de reação da hidrólise de lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre (Tabela 03) e imobilizada em SPC (Tabela 04).....	61
Anexo C - Tabela 05 que mostra os valores de retenção de atividade da β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da concentração da mesma, e Tabela 06 que correlaciona os valores de retenção de atividade da enzima β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da variação do pH do meio de imobilização.....	63
Anexo D - Tabela 07, proveniente do Statistica, que traz os valores dos coeficientes das variáveis concentração, temperatura e pH, que são representadas por X1, X2 e X3 respectivamente	65
Anexo E - Resultados experimentais da taxa de hidrólise de lactose por β -galactosidase usando tampão fosfato.....	67
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática da unidade experimental para estudo cinético da enzima na forma livre.....	28
Figura 3.2: Representação esquemática da unidade experimental para estudo cinético da enzima imobilizada	29
Figura 4.1: Atividade enzimática em função do pH do meio reacional.....	39
Figura 4.2: Atividade de β -galactosidase livre em função da temperatura.....	41
Figura 4.3: Gráfico de Arrhenius para a inativação térmica de β -galactosidase.....	44
Figura 4.4: Taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose em função da concentração da mesma.....	45
Figura 4.5: Taxa de reação de hidrólise de lactose em função do próprio substrato e do produto da reação, a galactose, segundo o modelo de inibição competitiva.....	48
Figura 4.6: Influência do pH do meio de imobilização na retenção de atividade enzimática de β -galactosidase por SPC.....	52
Figura 4.7: Atividade da enzima imobilizada em g/(g.L.min) em função da concentração da enzima no meio de imobilização.....	53
Figura 4.8: Influência da concentração de lactose na taxa da reação de hidrólise pela enzima imobilizada	5

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Valores codificados das variáveis concentração, pH e temperatura na montagem do Planejamento Composto Central.....	25
Tabela 3.1: Composição do tampão láctico e concentrações de sais utilizados na preparação do tampão láctico.....	27
Tabela 3.2: Valores das variáveis reais e codificadas para montagem do Planejamento Composto Cental.....	35
Tabela 4.1: Valores de estabilidade da enzima em relação ao pH.....	40
Tabela 4.2: Dados de tempo e taxa de reação para diferentes temperaturas.....	42
Tabela 4.3: Valores de k_d e $t_{1/2}$ em função da temperatura	43
Tabela 4.4: Resultados experimentais de taxa de reação (V) em função da concentração de lactose (S) e galactose (I).....	46
Tabela 4.5: Soma dos quadrados dos resíduos referente a cada modelo de inibição.....	47
Tabela 4.6: Resultados do Planejamento Composto Central para a influência das variáveis concentração de substrato, pH e temperatura sobre a taxa de reação.....	49
Tabela 4.7: Valores dos coeficientes das variáveis codificadas, concentração, temperatura e pH calculados através do software Statistica.....	50
Tabela 4.8: Resultados de atividade catalítica obtidos na imobilização de β -galactosidase em Duolite em função do pH do meio de imobilização.....	51

NOMENCLATURA

α	Coeficiente de ortogonalidade
A_r	Atividade (%)
αK_m	Constante de dissociação (g/L)
β	Constante adimensional
E	Enzima livre
E_d	Energia de desativação (min^{-1})
EP	Complexo enzima produto
ES	Complexo enzima substrato
I	Concentração de inibidor (g/L)
k_d	Constante da taxa de desativação da enzima (min^{-1})
k_i	Constante de inibição (g/L)
K_m	Constante de dissociação ou constante de Michaelis-Menten (g/L)
K_p	Constante de velocidade catalítica (g/L.min)
pH	pH
R	Constante da lei dos gases (cal/K.mol)
S	Concentração de substrato (g/L)
SPC	Sílica de porosidade controlada
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	Tempo (min)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida (min)
V	Taxa de reação (g/L.min)
V_m	Velocidade máxima da reação se toda a enzima estiver complexada (g/L.min)
V_{obd}	Taxa de reação observada (g/Lmin)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de hidrólise de lactose através da enzima β -galactosidase, na forma livre e imobilizada. Os estudos cinéticos da enzima na forma livre e imobilizada foram realizados em um microrreator de mistura a 30°C e pH 6,5. O modelo cinético encontrado, tanto para a enzima livre como imobilizada, foi o de Michaelis-Menten. No caso da enzima livre, houve inibição pela galactose e os parâmetros encontrados foram $V_m = 0,16 \text{ g/(Lmin)}$, $K_m = 17,04 \text{ g/L}$ e $K_i = 54,26 \text{ g/L}$. A enzima β -galactosidase quando incubada em diversos valores de pH apresentou melhor estabilidade em pH 6,5. A temperatura ótima encontrada foi de 40°C e o pH ótimo 6,5. A cinética de hidrólise da lactose foi estudada na faixa de 10 a 150 g/L, dentro da faixa de solubilidade da lactose. A atividade enzimática foi crescente de 10 a 110 g/L, estabilizando-se a partir desse ponto. Pelo Planejamento Composto Central, montado para estudar a influência das três variáveis, temperatura, concentração de lactose e pH, conjuntamente na atividade da enzima livre, percebeu-se uma marcante influência do pH, inibindo o efeito da temperatura e concentração. Ao estudar a estabilidade térmica da enzima livre, percebeu-se a sensibilidade desta em relação à temperatura pela determinação do tempo de meia vida. A 40°C, o tempo de meia vida da enzima foi 682,2 min e a 55°C foi de 1,21 min. A imobilização da lactase foi realizada utilizando-se dois suportes diferentes, a resina de troca iônica, de nome comercial Duolite e sílica de porosidade controlada (SPC). A enzima imobilizada em SPC apresentou uma atividade catalítica máxima de 1,49 g/(g.L.min) e imobilizada em Duolite de 0,84 g/(g.L.min).

“ABSTRACT”

The objective of this work was to study the kinetics of lactose hydrolysis using the enzyme β -galactosidase, in the free and immobilized form. The kinetic studies of the enzyme in the free and immobilized form were conducted in a micro reactor, at 30°C and pH of 6,5. The kinetic model found, for the free enzyme as well as the immobilized form, was the one of Michaelis-Menten. In the case of the free enzyme there was an inhibition by the galactose and the parameters found were $V_m = 0,16 \text{ g/(Lmin)}$, $K_m = 17,04 \text{ g/L}$ and $K_i = 54,26 \text{ g/L}$. The enzyme β -galactosidase, when incubated at several pH values, presented better stability at pH 6,5. The optimum temperature was 40°C and the best pH was 6,5. The kinetics of hydrolysis of the lactose was studied in a range between 10 to 150g/L, inside the range of the lactose solubility. The enzymatic activity increased from 10 to 110g/L, and remained stable from this point on. Through a Central Composed Planning System it was possible to study the influence of three variables, temperature, concentration of lactose and pH jointly in the activity of the free enzyme. There was a strong influence of the pH that inhibited the effects of temperature and concentration. When studying the thermal stability of the free enzyme, it was noticed the influence of temperature by determining the time of half live. At 40°C the time of half life of the enzyme was 682,2 min and at 55°C, it was of 1,21 min. The immobilization of the lactase was accomplished using two different supports, an ionic exchange resin (Duolite) and a controlled pore silica (SPC). The enzyme immobilized on SPC had a maximum catalytic activity of 1,49g/(g.L.min) and immobilized on Duolite of 0,84 g/(g.L.min).

1-INTRODUÇÃO

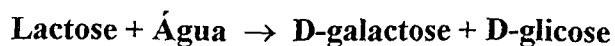
O leite, por ser um produto acessível à população, possuir um custo relativamente baixo e por ser matéria-prima para a fabricação de grande número de outros produtos derivados, merece uma atenção especial.

A lactose, chamada de açúcar do leite, é um dissacarídeo que tem como características principais, baixa solubilidade em água, de 15 a 20% a 20°C, e baixo poder adoçante

O alto nível de lactose, um dissacarídeo presente no leite, restringe o consumo deste alimento por pessoas intolerantes ao mesmo, devido à deficiência da enzima β -galactosidase no intestino delgado, enzima que desdobra a lactose nos monossacarídeos glicose e galactose.

A enzima β -galactosidase pode ser encontrada em plantas, particularmente em amêndoas, pêssego, damasco e maçã, em várias espécies microbianas como leveduras e mofos e também no intestino de animais, principalmente nos que estão em fase de amamentação.

Para a redução do teor de lactose no leite e seus derivados uma das alternativas propostas é a hidrólise enzimática através da enzima β -galactosidase. Um dos objetivos da hidrólise da lactose em leite é de melhor atender às pessoas intolerantes a esse dissacarídeo, adequando o leite e produtos derivados à dieta de tais pessoas. Outro objetivo é a produção de produtos lácteos com melhores propriedades físicas, tais como maior solubilidade dos produtos da hidrólise e menor presença do efeito denominado "arenosidade" devido à cristalização da lactose em tais alimentos. A reação simplificada da hidrólise é:



Com a hidrólise, o açúcar relativamente insolúvel é transformado em monossacarídeos mais doces e com menor tendência à cristalização. O processo de hidrólise tem sido, na maioria dos casos, realizado utilizando enzimas livres, mas já existem alguns processos industriais que fazem uso da tecnologia de enzimas imobilizadas.

Com o processo de imobilização da enzima espera-se uma conversão final maior em menor tempo de reação. E pode-se ainda reaproveitar a enzima através de um simples processo de filtração da mistura reacional, o que promove uma grande economia operacional.

Como aplicações da lactose hidrolisada pode-se ter a produção de iogurte ou queijo fresco, onde o processo de hidrólise reduz o tempo gasto para produzi-los, torna o iogurte

mais doce e obtém-se melhores condições de armazenamento a longo prazo. No caso de iogurte de frutas, a quantidade de adoçante pode ser diminuída e assim, o produto final terá menos calorias, além de não ter o efeito da arenosidade, causado pela cristalização da lactose.

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- a) Determinar o modelo cinético da hidrólise de lactose, em termos de taxas iniciais de reação em função da concentração inicial de lactose, para β -galactosidase livre, usando a faixa de solubilidade do substrato em estudo, a lactose.
- b) Estudar a influência dos produtos da reação, glicose e galactose na cinética de reação catalisada pela β -galactosidase livre.
- c) Testar a possibilidade de imobilização da β -galactosidase na resina Duolite.
- d) Estudar a imobilização de lactase em sílica de porosidade controlada, ativada por silanização.
- e) Verificar a influência do pH e temperatura na atividade e estabilidade da enzima β -galactosidase na forma livre.
- f) Verificar a influência do pH, temperatura e concentração de substrato, conjuntamente na atividade enzimática da β -galactosidase através de um Planejamento Composto Central, da estatística, o qual diminui a quantidade de ensaios a serem realizados.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-ENZIMAS COMO CATALISADORES

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica, que participam nas reações químicas que ocorrem nas células vivas. Atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre da reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade da primeira em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, a temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como reduzindo as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (BAILEY, 1986).

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem muito antes que sua função e natureza, ou mesmo os próprios microrganismos, fossem conhecidos. Somente após os trabalhos de Pasteur, no final do século passado, sobre fermentação alcoólica, em que se evidenciou a intervenção de leveduras nesse processo e os de Buchner, que extraiu em 1897, pela primeira vez, enzimas ativas de células vivas, é que foi considerada a existência de enzimas. O trabalho de Buchner foi muito importante, pois evidenciou que as enzimas exerciam seu papel de catalisador fora da célula viva (RIBEIRO, 1989).

Com a compreensão da natureza das enzimas e de seu potencial catalítico, sua utilização tem aumentado bastante, em diversos campos, tais como produção de alimentos, cervejas, indústrias têxteis, farmacêuticas e na medicina (CABRAL, 1982).

Ao contrário dos catalisadores sintéticos comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo dessa forma, os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluentes (SEGEL, 1993). Esse alto grau de especificidade das enzimas, devido à conformação tridimensional das mesmas, levou Emil Fischer, em 1894 a sugerir a hipótese da chave e fechadura. Esse modelo considera que a enzima possui uma região, chamada sítio ativo, o qual é complementar em tamanho, forma e natureza química à molécula do substrato (RIBEIRO, 1989).

Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam. As enzimas, de um modo geral, são mais frágeis, porém à temperatura ambiente, são mais ativas que os catalisadores sintéticos (BAILEY, 1986).

2.2-ENZIMAS NO PROCESSAMENTO DE LEITE

Enzimas são catalisadores biológicos e semelhantemente aos outros catalisadores, não são consumidos nas reações que elas catalisam. Obviamente, para que os processos possam ser melhorados economicamente pelo reuso das enzimas, há necessidade de recuperação destas no processo.

O leite bovino contém cerca de 50 enzimas nativas e mais de 27 delas têm sido classificadas pela INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY ENZYME COMMISSION (KENNEDY, 1987).

Uma das aplicações das enzimas nos produtos lácteos é no processo de coagulação do leite para fazer queijo. As enzimas responsáveis pela coagulação são as enzimas proteolíticas, embora nem todas gerem um produto de qualidade aceitável (REED, 1993).

O uso de lactases nos produtos industriais derivados do leite é uma das mais promissoras aplicações de enzimas no processamento de alimentos. A fermentação de lactose por leveduras tais como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*, ou fúngica com *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* tem sido utilizada em muitas preparações. Enzimas fúngicas com pH ótimo na faixa ácida têm sido vantajosas na preparação de massa de pão (REED, 1993).

É muito comum adicionar lactase nas misturas para aumentar o poder adoçante, reduzir o potencial de intolerância e prevenir contra a cristalização nos produtos. As lactoses para sorvetes têm sido hidrolizadas por incorporação direta da β -galactosidase (lactase) na mistura e mantida por 5 dias a 7,5°C.

Existe uma enzima também chamada lactase encontrada no intestino dos ratos, que apresenta pH ótimo próximo de 3,0 que reage com o O-nitrophenyl- β -D-galactoside e com a lactose.

Como já mencionado anteriormente as enzimas ocorrem em plantas, especialmente em amêndoas, pêssego, damasco e maçãs e têm sido encontradas em várias espécies de bactérias e também no intestino de animais, principalmente naqueles em fase de amamentação.

Entre as várias enzimas requeridas para processar produtos lácteos, muitas coagulam o leite para manufatura do queijo, como as proteases, as lipases intensificam o sabor e aceleram a maturação do queijo e a lactase diminui a lactose do leite, sendo este usado para a manufatura de sorvetes com menor tendência a formar arenosidade e produtos para pessoas que possuem problema de digestão da lactose (KENNEDY, 1987).

As enzimas, como visto anteriormente, possuem uma infinidade de aplicações e para poder usá-las de maneira eficiente já se estuda a imobilização destas por diferentes métodos e em diferentes suportes. Alguns dos métodos de imobilização encontrados na literatura são a adsorção física, ligação covalente dentre outros e os suportes citados para imobilização das enzimas podem ser resinas fenolíticas, vidro poroso e até mesmo o nylon.

2.3-FONTES DE ENZIMAS

Lactase é o nome mais comum para a enzima β -galactosidase ou mais formalmente β -D-galactoside galactoidrolase. Em catálise, entre outras, a reação de hidrólise de lactose dá uma mistura equimolar de glicose e galactose. Possíveis fontes de enzimas são: plantas, organismo animal, bactéria, levedura (enzima intracelular), fúngica (enzima extracelular). Algumas dessas fontes são usadas como preparações de enzimas comerciais. Tem-se várias fontes de β -galactosidase, mas nem todas são aceitáveis ou recomendadas como seguras. Preparações de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e de *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*) são consideradas seguras porque essas fontes já têm uma história de uso e tem sido submetidas a numerosos testes. A lactase de *Escherichia coli*, embora seja uma espécie muito investigada, não é usada no processo alimentar por causa do seu custo e o fato de oferecer problemas de toxidade com extratos brutos de coliforms (GEKAS, 1985).

2.3.1-PROPRIEDADES DA LACTASE

As propriedades das enzimas dependem de suas fontes. Suas melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte da mesma e, se imobilizada, com a técnica adotada na imobilização. Tipos de transportador também podem influenciar na determinação das condições de temperatura e pH. Em geral, lactases fúngicas apresentam a melhor condição de operação em relação ao pH, numa faixa ácida (2,5-4,5), e lactases de leveduras e bactérias numa região de pH neutro (6,0-7,0 e 6,5-7,5 respectivamente). Estas diferentes condições de pH fazem com que cada lactase seja apropriada para uma aplicação específica. Então, lactases fúngicas são usadas para hidrólise de soro ácido enquanto as lactases de leveduras e bactérias são apropriadas para leite (GEKAS, 1985).

2.4-LACTOSE

A presença de lactose no leite e seus derivados é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores, uma vez que muitas pessoas evitam o consumo deste produto, como já foi dito anteriormente.

(Através de alguns estudos já realizados com esse substrato, hoje já se produz leite aromatizado a partir de leite tratado com lactase. Este tratamento realizado com a enzima β -galactosidase diminui a quantidade de açúcar a ser adicionada, sem que a doçura do produto seja com isso reduzida. Outrossim, a quantidade de essência a ser usada, pode ser diminuída.

Na produção de leite condensado, a cristalização da lactose pode ser evitada através de um tratamento com lactase, reduzindo-se assim o risco de espessamento provocado pela coagulação da caseína sobre os cristais de lactose (publicação da NOVO NORDISK).

A presença de lactose em vários produtos e subprodutos industriais derivados do leite, segundo médicos, nutricionistas e ambientalistas é indesejável. Um dos problemas importantes é a deposição de soro, especialmente soro ácido que é um produto da manufatura do queijo ricota. Este material contém lactose, cerca de 5% em peso, e exige uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO)^{*}, poluindo o ambiente. Em princípio, este problema pode ser resolvido pela hidrólise enzimática da lactose. O resultado dessa hidrólise é um xarope com grande poder adoçante, e que pode ser adicionado a vários produtos do leite, reduzindo então a demanda de sacarose e o custo do tratamento do resíduo.

2.4.1-HIDRÓLISE DA LACTOSE

Lactose, o açúcar encontrado no leite e soro, e sua correspondente hidrólise pela β -galactosidase, foi objeto de pesquisa durante a década passada. Isto é devido ao desenvolvimento da técnica de imobilização de enzimas que dá nova e interessante possibilidade para a utilização em muitas indústrias que processam o leite (GEKAS, 1985). A hidrólise da lactose do soro e do leite resulta em produtos alternativos para pessoas que possuem baixo nível de lactase intestinal fazendo com que as mesmas não passem a evitar tais produtos, como acontece atualmente (TREVISAN, 1996; GEKAS, 1985). A ingestão direta de lactase, por via oral, por essas pessoas tem sido feita, mas tem provocado reações alérgicas (BÓDALO, 1991). Tecnicamente, lactose é facilmente cristalizada e isso limita certos processos na indústria do leite. Queijo manufaturado de leite hidrolisado matura muito mais rapidamente que o feito com de leite normal. O problema da lactose no soro é principalmente

relatado no caso de poluição ambiental.* Um caminho atrativo para a utilização do soro é a hidrólise de sua lactose para obter xaropes doces constituídos de glicose e galactose. Comparado com a sacarose (valor adoçante relativo de 100%), o xarope tem um valor cerca de 70%, enquanto a lactose tem um valor consideravelmente menor, atingindo apenas a faixa de 40% (GEKAS, 1985).

2.4.1.1-PRODUTOS DA HIDRÓLISE DA LACTOSE

O xarope doce produzido do soro por hidrólise da lactose pode ser usado como fonte de açúcar, em alguns casos como fonte de proteína em produtos de padaria, confeitaria, refrigerantes, sorvetes, sobremesas ou em alimentos para o gado. Vários graus de concentração e proporção de mistura com outros produtos podem ser utilizados. Um xarope concentrado com 80% total de sólidos é preparado de soro de queijo ricota, através de desproteinização, hidrólise e concentração. O xarope tem um agradável sabor adoçante e uma leve coloração amarela. Ele dá ao sorvete de baunilha uma qualidade comparável ao que é dado pelo xarope de milho. Uma bebida com sabor de laranja, preparada da hidrólise e desproteinização do soro de queijo, é recomendada para atletas. Uma nova companhia (Nutri-search Company, Kentucky, USA) usa o produto da hidrólise do soro para crescimento das leveduras de pão (GEKAS, 1985).

2.5-MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE

Atualmente existem dois métodos importantes para a hidrólise de lactose, o método catalítico ou ácido e o enzimático com uso de lactase. O primeiro método é caracterizado por severas condições de pH e temperatura (pH 1-2 e T 100-150°C). Um alto grau de hidrólise é obtido num curto período de tempo com o método ácido. Um exemplo típico é 80% de hidrólise em 3 minutos quando o pH for 1,2 e a temperatura, 150°C (GEKAS, 1985). O método enzimático depende das propriedades das enzimas utilizadas. Suas condições de operação geralmente são mais suaves, o pH deve estar numa faixa de 3,5 a 8,0 e a temperatura, de 5 a 60°C.

2.6-CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que lida com os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os fatores mais importantes são a concentração de enzima, concentrações de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura. Quando todos esses fatores são analisados apropriadamente, é possível se ter um melhor conhecimento sobre a natureza da reação enzimática. Por exemplo, variando-se a concentração de substrato e de produto, é possível deduzir o mecanismo cinético da reação, isto é, a ordem com a qual os substratos se ligam e os produtos se liberam da enzima e se esta ordem é obrigatória ou aleatória. Tais estudos podem estabelecer os tipos de complexos enzima-substrato e enzima-produto que podem se formar e, em alguns casos, fornecem evidências para intermediários estáveis, ligados por covalência, que não seriam determinados por análises químicas comuns. Certas constantes cinéticas podem ser determinadas, e a partir destas, pode-se deduzir as concentrações intercelulares de substratos e produtos e o sentido fisiológico da reação. A cinética de uma reação pode indicar o modo pelo qual a atividade da enzima é regulada.

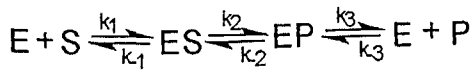
Um estudo do efeito da variação do pH e da temperatura nas constantes cinéticas pode fornecer informação em relação à identidade dos grupamentos R dos aminoácidos do sítio ativo. Uma análise cinética pode levar a um modelo para uma reação enzimática e, reciprocamente, os princípios da cinética enzimática podem ser usados para escrever a equação de velocidade para um modelo proposto, o qual poderá ser então testado experimentalmente (SEGEL, 1993).

Os modelos cinéticos são determinados por dois caminhos, o primeiro é o tratamento em equilíbrio rápido (HENRI, MICHAELIS E MENTEN) e o segundo o tratamento do estado estacionário (BRIGGS E HALDANE), mas ambos chegam à mesma equação matemática representativa do modelo, com uma diferença sutil na constante de saturação do substrato.

2.6.1-MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN

A reação enzimática mais simples envolve um único substrato transformando-se em um único produto. Algumas teorias tentam explicar a elevada especificidade e atividade das enzimas, porém os conceitos de sítio ativo e complexo enzima-substrato são universalmente aceitos e é o ponto de partida para determinação da maioria das equações de taxa de reação (RIBEIRO, 1989). A dedução da equação da taxa por Michaelis-Menten parte do conceito de

formação do complexo enzima-substrato, ES, e do conceito de equilíbrio rápido. A sequência de reação é dada abaixo:



Onde:

E: enzima não complexada

S: substrato

ES: complexo enzima substrato

EP: complexo enzima produto.

k_i : constantes de taxa de reação das etapas elementares

Na dedução do modelo de Michaelis e Menten são feitas algumas simplificações, tais como:

- considerar apenas o complexo central ES,
- a reação de regeneração do complexo ES é desprezível,

Assim, o mecanismo simplificado para reação passa a ser:



A taxa de reação para o modelo acima, em função do complexo ES é dada na Equação 2.1.

$$V = k_p * [ES] \quad (2.1)$$

Onde

k_p : constante da taxa de reação de liberação do produto P.

V: taxa de reação

Com a Equação 2.1 e um balanço de massa para enzima, chega-se à Equação 2.2, que é a equação da taxa de reação em função da concentração de substrato :

$$V = \frac{V_m * S}{(K_s + S)} \quad (2.2)$$

Onde V_m é a velocidade máxima da reação se toda a enzima estivesse complexada e

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.3)$$

K_s é a constante de Michaelis-Menten

O valor de K_s estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, além de estabelecer uma comparação entre enzimas de diferentes organismos através do seu valor numérico. Através dos valores de K_s é possível identificar inibidores fisiologicamente importantes. K_s mostra o nível de afinidade entre a enzima e o substrato.

2.6.2- INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Um inibidor é qualquer substância que reduz a taxa de reação. Este processo de inibição enzimática é um instrumento de regulação das células vivas e um dos procedimentos de diagnóstico, dos mais importantes para os enzimologistas. Na vida diária, temos os inibidores sendo representados por drogas, antibióticos, preservativos, venenos e toxinas (SEGEL, 1993).

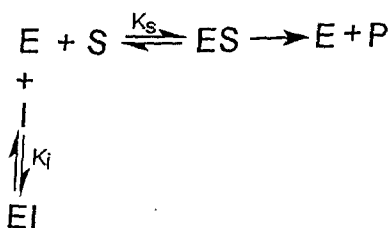
Em processos industriais a inibição exerce um papel muito importante, pois trata-se normalmente, com concentrações elevadas de substratos e produtos, além de que, os substratos não são substâncias puras.

Temos na literatura vários modelos de inibição, sendo que alguns serão descritos abaixo.

a) Inibição competitiva

Um inibidor competitivo é uma substância que se combina com uma enzima não complexada de forma a impedir a ligação do substrato com a enzima. O inibidor e o substrato competem entre si pela ligação com a enzima.

O mecanismo que descreve a inibição competitiva é:



Este fenômeno é descrito pela Equação 2.4:

$$V = \frac{V_m * S}{S + K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2.4)$$

Onde:

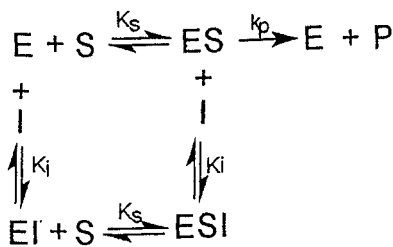
I = concentração de inibidor

K_i = constante de inibição

O processo inibitório depende das afinidades relativas de K_s e K_i pela enzima e é um processo reversível. Pelo aumento de S, o equilíbrio é deslocado no sentido do complexo ES e V_m não é alterado, mas o valor de K_s é aumentado.

b) Inibição não competitiva

É caracterizada pela formação de um complexo inativo ESI, formado pela ligação de EI com S ou ES com I, segundo o mecanismo a seguir:



A Equação 2.5, representativa do fenômeno em termos cinéticos é:

$$V = \frac{V_m * S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2.5)$$

Onde K_i e I são as constantes de inibição e a concentração de inibidor respectivamente.

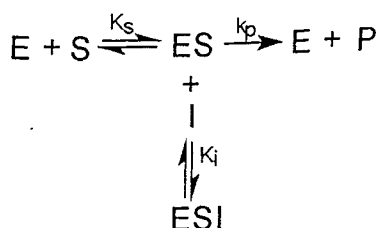
Pelas equações de equilíbrio acima, podemos notar que com qualquer concentração de inibidor, por maior que seja a concentração de substrato, não se consegue levar toda enzima à forma ES, que é a forma produtiva. Em qualquer valor de I, uma parte da enzima permanecerá sob a forma de complexo não produtivo ESI, de onde podemos prever que V_m em presença de

inibidor não competitivo será sempre menor que na ausência do mesmo, já que K_s permanece o mesmo.

c) Inibição Acompetitiva (Incompetitiva)

Um inibidor incompetitivo clássico é uma substância que se liga reversivelmente ao complexo enzima-substrato, fornecendo um complexo ESI inativo. O inibidor não se liga à enzima livre. Trata-se de uma inibição rara em sistemas unireacionais.

As reações de equilíbrio que descrevem a inibição incompetitiva são:



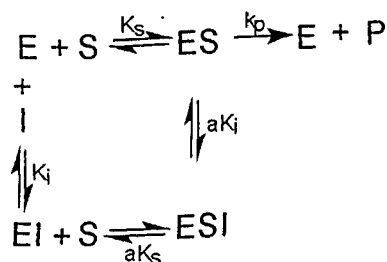
A Equação cinética 2.6 da inibição é:

$$V = \frac{V_m * S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2.6)$$

Assim como no caso da inibição não competitiva, para qualquer valor de I, não existe valor de S que leve toda a enzima à forma ES.

d) Inibição Mista Linear

Trata-se de uma forma de inibição não competitiva expressa pelo mecanismo:



O modelo cinético deste tipo de inibição é dado pela Equação 2.7:

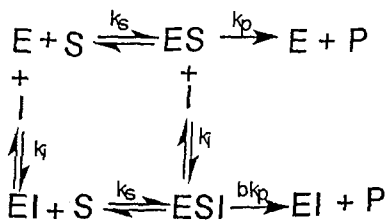
$$V = \frac{V_m * S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{aK_i}\right)} \quad (2.7)$$

Neste tipo de inibição, a presença de I na enzima modifica a constante de dissociação de K_s para aK_s .

e) Inibição Parcialmente Não Competitiva

Neste tipo de inibição, o inibidor e o substrato se ligam à enzima em diferentes sítios, produzindo diferentes complexos ES, EI e ESI. Os complexos ES e ESI produzem produto, mas o complexo ES o faz com maior facilidade.

O mecanismo que descreve a seqüência de equações é mostrado abaixo:



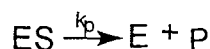
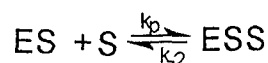
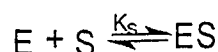
A velocidade da reação para esse mecanismo é dada pela Equação 2.8:

$$V = \frac{V_m S \left(1 + \frac{\beta}{K_i} I\right)}{\left(S + K_s\right) \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (2.8)$$

f) Inibição pelo Substrato

Este tipo de inibição ocorre quando uma grande quantidade de substrato provoca redução na taxa de reação.

Para este tipo de comportamento, o modelo cinético do processo segue as equações abaixo:



Nestas condições, a Equação 2.9 representa a cinética desse fenômeno:

$$V = \frac{V_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.9)$$

A máxima taxa de reação teoricamente alcançada é obtida quando $dv/dt=0$ e e_p representada pela Equação 2.10:

$$S_{\max} = \sqrt{K_s \cdot K_i} \quad (2.10)$$

2.7-INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

O efeito do pH nas reações enzimáticas se deve à ionização reversível do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas. Esses efeitos são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudança no equilíbrio da reação (REED, 1993).

Os sítios ativos das enzimas são frequentemente 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 consequência da inativação das enzimas ou combinação desses efeitos. O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como:

temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração de substratos, 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 a temperatura de desnaturação (SEGEL, 1993).

A melhor condição de pH das enzimas, em um dado substrato, pode variar de 2,0, como é o caso da pepsina, até 10,0 como para a fosfatase alcalina, e muitas exibem pH próximo ao neutro, como no caso da lactase. A mesma enzima isolada, de fontes diferentes, pode exibir diferentes valores de pH ótimos, provavelmente refletindo a necessidade fisiológica do organismo de onde a enzima foi isolada (REED, 1993).

2.8-INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

Na maioria das reações químicas ocorre o aumento da velocidade com a elevação da temperatura. Um aumento na temperatura provoca 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. (As enzimas são moléculas protéicas complexas.) Sua atividade catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos R específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estéreo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. Em termos práticos, uma molécula de enzima é uma estrutura muito delicada e frágil. Se a molécula absorve muita energia, a estrutura terciária rompe-se e a enzima ficará desnaturada, isto é, perderá 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. (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, por uma ou duas vezes o tempo escolhido para a realização dos testes experimentais, e aí, medindo-se a atividade a uma temperatura suficientemente baixa para não causar desnaturação da enzima. A temperatura de estabilização da enzima depende de outros fatores como pH, força iônica do meio, presença ou ausência de ligantes (SEGEL, 1993).

A relação entre taxa de reação e temperatura é descrita pelo modelo de Arrhenius, representado pela Equação 2.11. O intervalo de validade do referido modelo é bastante limitado, pois qualquer temperatura significativamente superior àquela do ambiente biológico natural, pode desnaturar a enzima (BAILEY, 1986).

$$k = Z \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2.11)$$

Onde:

k é a constante da taxa da reação

T temperatura em K

R constante dos gases (cal/(mol K))

Z frequência de colisões favoráveis entre reagentes (REED, 1993).

Ea energia de ativação da reação

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. Na maioria dos casos considera-se cinética de primeira ordem para relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura (RIBEIRO, 1989).

Supondo desativação de primeira ordem, vem:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d A \quad (2.12)$$

Onde:

A = a atividade da enzima num tempo t qualquer

k_d = constante da taxa de desativação

Integrando a Equação 2.12 entre t=0 e t, obtem-se:

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_d t \quad (2.13)$$

Onde:

A_0 = atividade inicial da enzima

K_d = constante da taxa de inativação

Um conceito comum em cinética química e enzimática é o de tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que A/A_0 , na Equação 2.13 seja igual a 0,5, ou seja, o tempo necessário, à temperatura T , sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. Da Equação 2.13, e com o conceito de tempo de meia vida, chega-se a Equação 2.14 :

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.14)$$

Por outro lado, k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.15.

$$k_d = A \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right) \quad (2.15)$$

A Equação 2.15, na forma linearizada é apresentada na Equação 2.16:

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (2.16)$$

Onde:

E_d = Energia de ativação do processo de inativação da enzima

R = constante da lei dos gases

Segundo HENLEY; SADANA (1985), o modelo de desativação de 1ª ordem é freqüentemente adequado para representar a cinética de desativação enzimática, mas fazendo uma revisão da literatura, 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 caso, a atividade pode ser maior que a inicial em algum período de tempo e propõem uma cinética de desativação em série e agrupam os casos de desativação, encontrados nesta literatura, em várias categorias diferentes.

2.9-IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Apesar das inúmeras vantagens das enzimas como catalisadores, o uso das mesmas em aplicações industriais 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 (RIBEIRO, 1989). Para eliminar as desvantagens do uso das enzimas como catalisadores e com o objetivo de obter catalisadores altamente ativos e estáveis, surgiu o processo de imobilização das enzimas. Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e podem ser usadas repetida e continuamente, tornando as moléculas de enzimas insolúveis no meio aquoso (RIBEIRO, 1989)

Nos processos com a 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 o custo. As enzimas no produto também podem ser um problema, pois podem ser uma impureza indesejável que deverá ser removida. O uso de enzimas imobilizadas minimiza esses inconvenientes. Finalmente, uma enzima imobilizada pode ser fixada em posição próxima a outras enzimas participando de uma sequência catalítica, aumentando a conversão em processos de multietapas. Essas características de imobilização de enzimas são atrativas se uma grande quantidade de substrato é requerida e se as enzimas envolvidas são muito caras.

Muitos métodos de imobilização de enzimas são avaliados. Assim, os métodos de imobilização usados são devido às influências das propriedades dos biocatalisadores resultantes, já que as enzimas são catalisadores biológicos. Então, a seleção de uma estratégia de imobilização deriva de especificações do processo para catálise, incluindo parâmetros como atividade catalítica, eficácia da utilização de enzimas, características de desativação e regeneração, fontes e custo.

Alguns parâmetros considerados na imobilização são:

- atividade
- estabilidade operacional
- concentração do substrato
- efeito da concentração de oligossacarídeos
- mínimo e máximo tempo de residência
- formação de sub-produtos
- sensibilidade ao pH e temperatura

- tamanho e forma do suporte utilizado na imobilização
- densidade do suporte

No caso de imobilização de enzimas, as propriedades físicas e químicas do suporte também são importantes, o tamanho do poro e a porosidade do sólido determinam a quantidade de enzima que pode ser imobilizada no suporte.

Algumas vantagens e desvantagens de imobilização de enzimas são listadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 Lista das vantagens e desvantagens da imobilização de enzimas

Vantagens	Desvantagens
Baixo custo da enzima	Custo de imobilização
A enzima não contamina o produto	Inativação da enzima (às vezes)
A enzima torna-se mais estável (às vezes)	Limitações de transferência de massa

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 preocupar com métodos de separação. Devido a estas duas vantagens da imobilização de enzimas, reuso da mesma e a não necessidade de uso de métodos de recuperação desta no produto final, tem-se uma economia no custo do processo em estudo.

Embora a imobilização das enzimas seja uma alternativa para uso 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.

A estabilidade da enzima imobilizada pode ser aumentada ou diminuída dependendo da pureza da solução de substrato, que muitas vezes pode conter agentes inibidores. As preparações de enzimas imobilizadas virão a ter contato com uma grande quantidade de substrato, logo elas são mais sensíveis aos efeitos de inativação que as enzimas livres.

A imobilização de enzimas geralmente é feito quando se quer montar um processo contínuo. Quando usamos uma concentração de enzimas muito alta temos um curto tempo de residência e a interferência das reações espontâneas podem ser minimizadas. Para escolher-se

entre o uso da enzima livre e imobilizada muitos fatores devem ser levados em consideração, mas o mais importante está relacionado ao custo do processo.

2.9.1-MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Há várias maneiras de classificar os vários tipos de enzimas imobilizadas. ZABORSKY, 1973 apud RIBEIRO, 1989, classifica os métodos de imobilização de enzimas em físicos e químicos. Métodos químicos são aqueles dependentes da formação de ligações covalentes, tais como ligação da enzima ao suporte, incorporação da enzima à cadeia de um polímero em crescimento e a ligação cruzada da enzima com um reagente multifuncional de baixo peso molecular. Os métodos físicos independem da formação de ligação covalente, tais como adsorção, oclusão dentro de matrizes insolúveis em água e oclusão em microcápsulas. Alguns dos métodos de imobilização são descritos abaixo:

a) Ligação covalente em suporte sólido: normalmente a imobilização de enzimas ocorre em duas etapas: na primeira etapa o suporte é tratado com reagente que ativa alguns de seus grupos funcionais e, na segunda etapa, o suporte ativado é misturado com a enzima e então ocorre a ligação. Alguns dos reagentes usados para ativação dos suportes contêm o grupo hidroxil ou amino. O glutaraldeído é um reagente freqüentemente usado na imobilização de enzimas nos processos industriais.

b) Ligação cruzada: freqüentemente a ligação cruzada é usada em combinação com outros métodos de imobilização, por exemplo, para estabilizar preparações de enzimas imobilizadas por adsorção física. O glutaraldeído é comumente usado como reagente da ligação cruzada.

c) Adsorção física: é talvez o método mais simples de imobilização de enzimas. O suporte é misturado com a solução de enzimas. Depois de algum tempo, o suporte com a enzima adsorvida é filtrado. A atração entre o suporte e a enzima pode ser por forças de Van der Waals, interações iônicas ou interações específicas. Comumente o adsorvente usado é a alumina, carvão ativo, terra de diatomácea e vidro. A maior vantagem do método de imobilização por adsorção é a sua simplicidade.

02651/99

d) Enzimas em meio orgânico: a maior vantagem desta técnica comparada com o uso de reações em meio aquoso é o aumento da conversão de substâncias hidrofílicas 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 no suporte ou simplesmente depositada numa mistura de suporte seco como uma solução aquosa de enzima. Essas preparações podem ser usadas como catalisadores nos solventes orgânicos: pequena quantidade de água (menor que 1% do total do volume do reator) é necessária para ativar a enzima. Então as enzimas são insolúveis em quase todo o solvente orgânico e o risco da enzima transferir para essa fase é muito baixo. Os suportes usados no meio orgânico são celite, vidro e muitos outros (REED, 1993).

e) Entrelaçamento ou oclusão em géis poliméricos: o polímero mais usado é a policrilamida. A enzima é dissolvida em um tampão aquoso contendo acrilamida e bisacrilato para interagir fazendo ligação cruzada. A polimerização é inicializada por gerar radicais na solução. A polimerização envolve dois riscos para a enzima, primeiro o monômero e o radical formado durante a reação podem reagir com a enzima e inativá-la, e segundo, o aquecimento durante a polimerização também pode inativar a enzima. Uma alternativa é transportar a polimerização em uma emulsão de solução aquosa em um solvente orgânico.

f) Oclusão em microcápsulas: enzimas podem ser imobilizadas em microcápsulas formadas de membranas de polímero permeável ao substrato e ao produto, mas não à enzima. O tamanho das microcápsulas pode ser variado, usando diferentes condições durante a emulsificação. Muitos trabalhos com essa técnica são desenvolvidos em aplicações médicas.

g) Imobilização em membranas: membranas podem ser usadas para reter enzimas no reator enquanto permite a remoção dos produtos. Muitos tipos de membranas têm sido usadas em reações enzimáticas como membranas lisas e fibras ocas.

h) Imobilização em sistema 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.

2.9.2-IMOBILIZAÇÃO EM PROCESSO INDUSTRIAL

Muitos processos, em larga escala industrial, já em operação, empregam enzimas imobilizadas em alguns pontos. Dois notáveis exemplos são a produção de xaropes de frutose a partir de amido e manufatura de L-amino ácidos por resolução de misturas de amino ácido racêmicos. Ácido L-aspártico tem sido produzido enzimaticamente no Japão desde 1973 usando aspartase, que catalisa a conversão de ammonium fumarate para ácido L-aspártico (SATO et al, 1975; FUSEE, 1987 apud REED, 1993). O biocatalisador usado contém células de *Escherichia coli* entrelaçadas em policrilamida ou poliuretano (REED, 1993).

2.9.3-EFEITOS DE IMOBILIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES DAS ENZIMAS

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 (CABRAL, 1982; CHIBATA, 1978 apud RIBEIRO, 1989). Considera-se que as alterações nas propriedades enzimáticas são causadas por dois fatores. Um é devido a mudanças na enzima em si e o outro deve-se às propriedades físicas e químicas dos suportes usados na imobilização. Algumas dessas alterações estão descritas a seguir.

2.9.3.1-INATIVAÇÃO DURANTE A IMOBILIZAÇÃO

A inativação durante a imobilização pode ocorrer devido a altas temperaturas e outras condições adversas durante o procedimento de imobilização. Em métodos de imobilização em que ocorre 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 da atividade catalítica (REED, 1993).

2.9.3.2-EFEITOS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

A taxa de reação de um processo químico é determinada pelo efeito de transferência de massa e efeito cinético. Quando 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 freqüentemente. A concentração de substrato local em volta da enzima é normalmente diferente da concentração de substrato no seio da solução. No caso mais simples, a enzima é imobilizada em uma superfície lisa. Próximo à superfície está um filme líquido estagnante 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.

2.10-IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

β -galactosidase tem sido imobilizada por vários métodos: adsorção física, ligação covalente, oclusão em gel e outros (BÓDALO, 1991). Um grande número de diferentes suportes tem sido utilizado na imobilização de enzimas. A escolha do suporte é determinada pelas condições com que a enzima será usada e pelo método de ligação envolvido. Por exemplo, β -galactosidase tem sido ligada a géis hidrofílicos tais como Sephadex, DEAE celulose, AE celulose, e poliacrilamida, bem como a materiais hidrofóbicos como nylon, resinas fenolíticas e vidro poroso.

WETTALL (1976), descreve a técnica de imobilização de enzimas em suportes inorgânicos ativados por silanização, pelo método de ligação covalente e discute a importância do tamanho de partícula e poro na imobilização, levando em consideração os efeitos difusionais e a queda de pressão em função do tamanho da partícula.

OLSON; STANLEY (1973), discorrem sobre a importância da resina Duolite como suporte adsorvente para imobilização de enzimas. Enzimas como a β -galactosidase, invertase, amiloglucosidase, são imobilizadas neste suporte por processo iônico combinado com ligação cruzada com o reagente glutaraldeído.

TREVISAN (1996), imobilizou β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em outro tipo de suporte, a SPC silanizada e ativada com glutaraldeído para a hidrólise da lactose de soro de leite, analisando a influência da atividade enzimática tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada.

2.11-PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O problema básico no planejamento de experimentos é decidir qual arranjo de resultados será melhor para revelar aspectos da situação de interesse. Dentre essas situações

de interesse, deve-se saber quais são as variáveis que influenciam na resposta, saber os intervalos das variáveis influentes que minimizam os efeitos das variáveis não controláveis e conhecer os intervalos de cada uma das variáveis influentes, onde as respostas encontram-se próximas de seus valores nominais desejados (BOX, 1978; COUTINHO, 1996)

Para execução dos experimentos, deve-se ter algumas informações preliminares como:

- variáveis mais importantes
- intervalo no qual as variáveis devem ser estudadas
- forma de apresentação das variáveis e respostas (exemplo: escala logarítmica, linear e outras).

Existem várias técnicas de planejamento experimental e algumas delas são:

- a) planejamento fatorial
- b) planejamento composto central ou por superfície de resposta
- c) planejamento "Latim Square"

Analisando a aplicabilidade destes planejamentos, o que melhor serviu para análise dos dados de hidrólise da lactose foi o planejamento composto central, pois este planejamento nos fornece uma equação com a superfície de resposta, levando em consideração os efeitos de cada variável separadamente, interações entre estas variáveis e seus termos quadráticos. Através desta equação torna-se possível construir gráficos em três dimensões correlacionando a resposta obtida em função de duas das variáveis em estudo. Este planejamento é um planejamento fatorial de primeira ordem, aumentado por pontos adicionais para permitir estimar parâmetros para uma superfície de resposta de segunda ordem. No planejamento composto central têm-se o planejamento fatorial 2^k onde k é o número de variáveis, aumentado de $2k$ mais n , onde n é o número de réplica dos experimentos. Para montar o planejamento é necessário codificar as variáveis em estudo de maneira a montar a Tabela 2.1, a seguir, quando $k=3$.

Tabela 2.1: Valores codificados das variáveis concentração, pH e temperatura na montagem do planejamento composto central.

C(g/L)	T(°C)	PH
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1
0	0	0
0	0	0
-α	0	0
+α	0	0
0	-α	0
0	+α	0
0	0	-α
0	0	+α

Onde α é o coeficiente de ortogonalidade e os valores -1 e $+1$ são valores obtidos através de equações de codificação das variáveis em estudo.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-ENZIMA

Neste trabalho foi utilizada a enzima β -galactosidase, produzida a partir da fermentação de uma cepa selecionada da levedura *Kluyveromyces fragilis*. Essa enzima, cujo nome comercial é Lactozym, foi produzida e doada pela NOVO NORDISK. A enzima apresenta-se disponível na forma de um líquido claro, dourado, cuja densidade é de 1,2g/L. O Lactozym tem uma atividade declarada de 3000 LAU/mL. Uma unidade de lactase (LAU) foi definida como a quantidade de enzima que é capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, sob as condições padrão, pH 6,5 e temperatura 37°C (Publicação da NOVO NORDISK).

3.2-REAGENTES E SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Todos os reagentes utilizados nos experimentos, descritos a seguir, apresentavam grau d. pureza analítica:

1-Lactose, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{22}O_{11}H_2O$, na forma monohidratada, peso molecular 360,31g/mol, produzida pela LABSYNTH Produto para Laboratório LTDA

2-Glicose Anidra, com fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e peso molecular 180,16g/mol, industrializado pela VETEC Química Fina LTDA.

3-Galactose, produzida especialmente para uso em laboratório, pelo Laboratório DIFCO

4-Sílica de Porosidade Controlada SPC, correspondente à fração que passou pela peneira Tyler 32 e ficou retida na Tyler 35, com diâmetro médio de poro 375A, produzida pela Corning Glass Works.

4-Duolite S-761, Resina de troca iônica, fornecida pela Diamond Shamrock Corporation.

5-Sais, utilizados na preparação de tampão láctico e tampão fosfato

3.3-TAMPÃO LÁCTICO

A solução tampão foi preparada com água destilada, diversos sais e 0,01% de azida sódica como preservativo. Os sais foram adicionados de modo a fornecer os componentes químicos, na concentração de minerais encontrados naturalmente no leite. O tampão láctico foi recomendado pela NOVO NORDISK, que nos cedeu a enzima em estudo. Na tabela 3.1 a seguir é apresentada a composição do tampão utilizado.

Tabela 3.1: Composição do tampão láctico e concentrações de sais utilizados na preparação do tampão láctico

Componentes	Concentração (g/L)
$\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,795
Acido Cítrico. H_2O	1,663
K_2SO_4	0,180
K_2HPO_4	0,520
KH_2PO_4	1,470
KOH	1,090
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,830
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,750
NaOH	0,800
NaHCO_3	0,280

*sulfato de potássio
 fosfato de potássio - monobásico -
 fosfato de potássio - dibásico -
 hidróxido de potássio
 cloreto de magnésio
 cloreto de cálcio dihidratado
 hidróxido de sódio
 carbonato de sódio
 bicarbonato*

Pegava-se um balão com capacidade de 1L e colocava-se três quartos de água destilada. Adicionava-se então os componentes descritos na Tabela 3.1 e dissolvia-os por agitação. Ajustava-se o pH em 6,5 com solução de HCl . Adicionava-se ainda 0,01% (0,1g/L) de NaN_3 , que atuou como preservativo. Depois completava-se o volume a 1L com água destilada, tendo o cuidado de manter o pH em 6,5.

3.4-UNIDADE EXPERIMENTAL PARA USO DA ENZIMA LIVRE

A unidade experimental usada na realização dos ensaios de laboratório, com a enzima livre está representada esquematicamente na Figura 3.1. Ela consistia de um microrreator de mistura (4) ligado a um banho termostaticado (1) contendo um mecanismo de recirculação para manter a temperatura constante. O mecanismo de agitação foi promovido por um agitador mecânico (2), com pás construídas em dimensões compatíveis com o tamanho do microrreator. Para evitar a formação de vórtice, foi adaptado um sistema de chicanas ao reator.

Ao lado, foi colocado um béquer (3) com água fervendo, aquecido por um bico de Bunsen, com o objetivo de inativar a enzima, depois da reação.

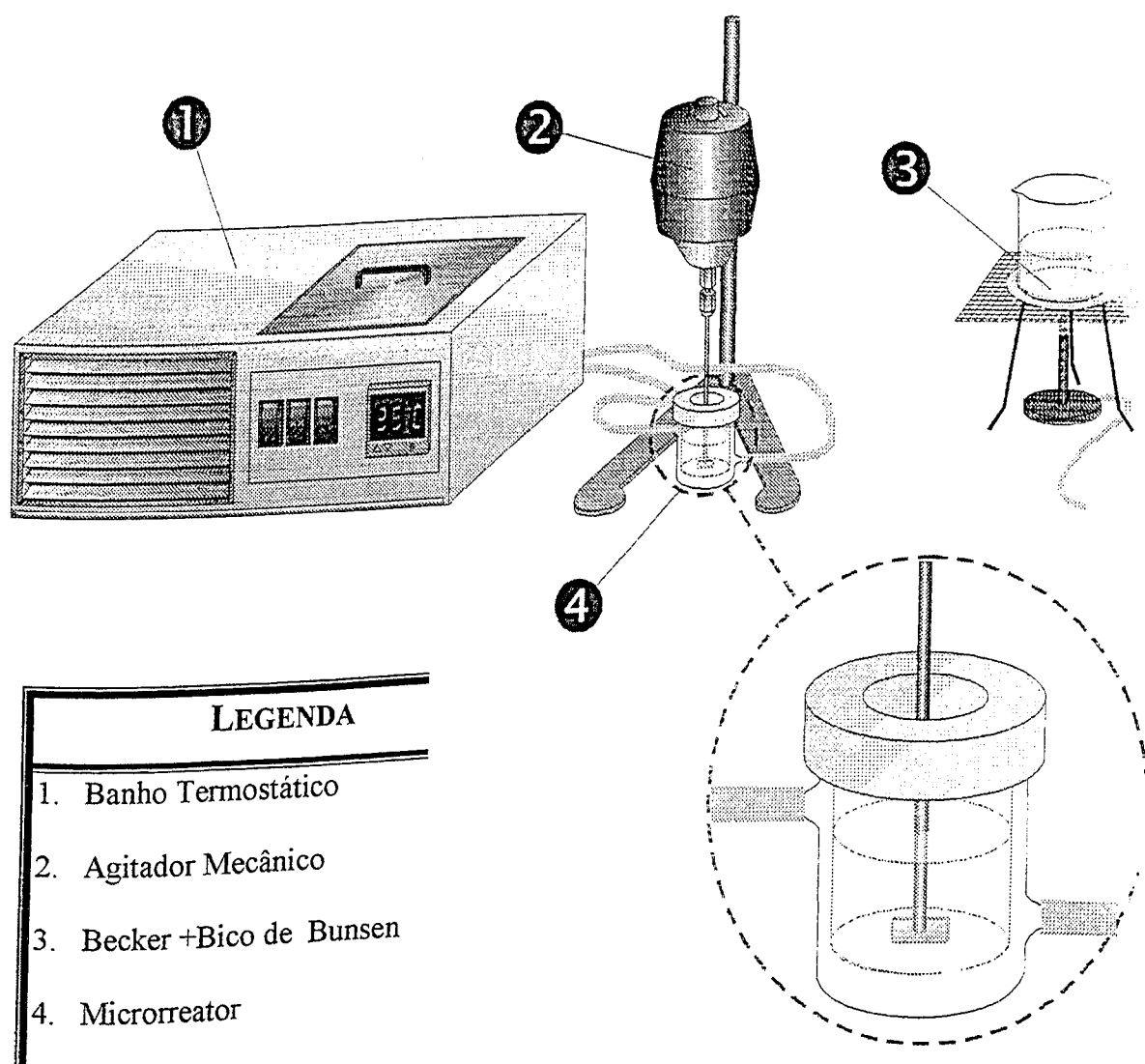


Figura 3.1: Representação esquemática da unidade experimental para estudo cinético da enzima na forma livre.

3.5 UNIDADE EXPERIMENTAL PARA USO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Para os ensaios com a enzima imobilizada, o mesmo esquema foi montado com exceção do agitador mecânico que foi substituído por um agitador magnético (2), e pelo acréscimo de uma cesta de tela de aço inox, onde era colocado a enzima imobilizada, conforme Figura 3.2.

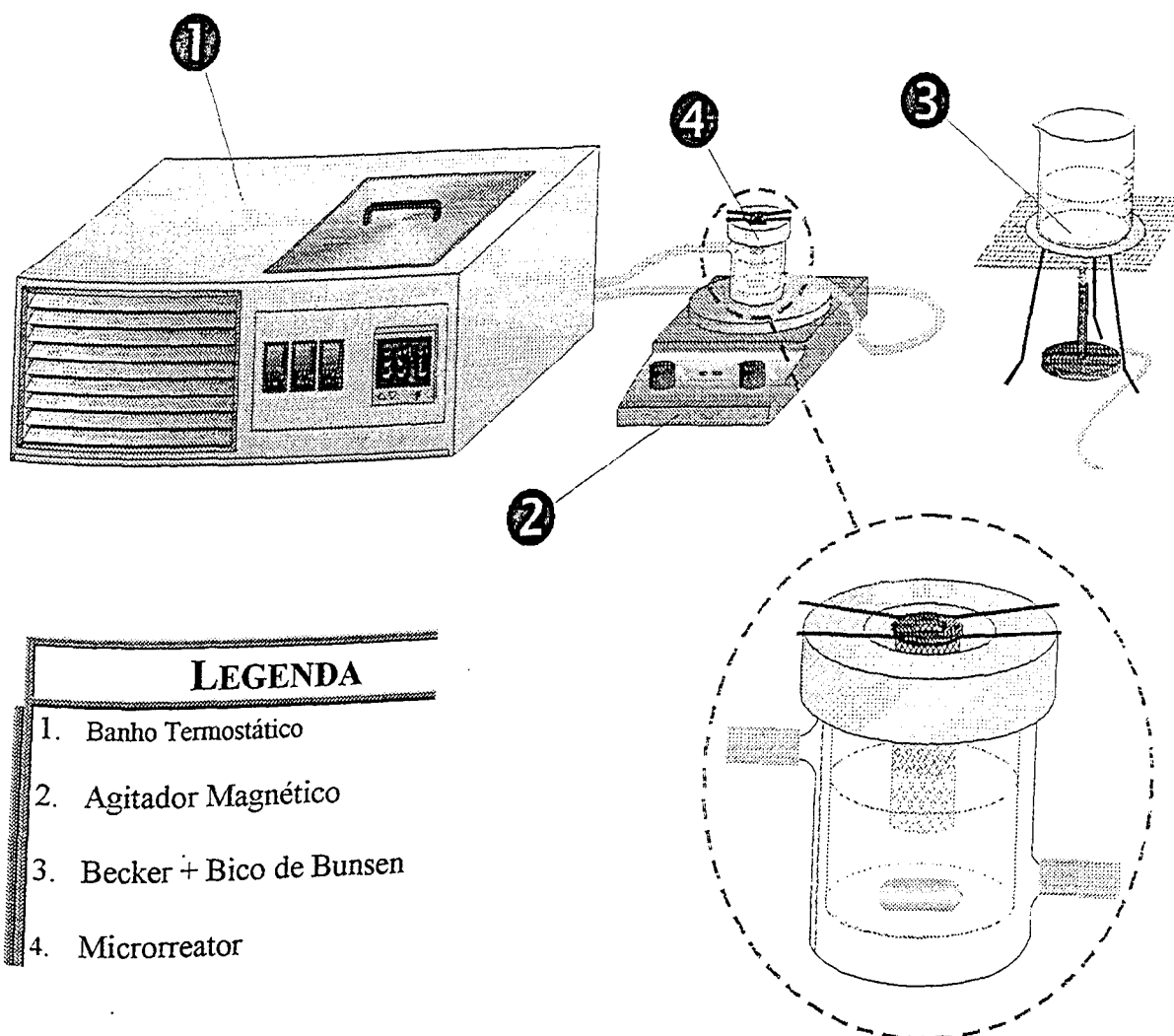


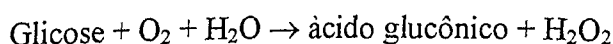
Figura 3.2: Representação esquemática da unidade experimental para uso da enzima imobilizada

3.6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.6.1-DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A glicose em todos os experimentos, foi dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se Kits GLICOSE-GOD-NA do Labtest, Sistema para diagnóstico.

Esse método é específico para a glicose e se baseia na oxidação da mesma, de acordo com a seguinte reação, catalisada pela glicose-oxidase:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, cuja intensidade de sua cor vermelha, é proporcional à concentração de glicose no meio. Esse composto de tonalidade vermelha apresenta a sua máxima absorção de luz na faixa de 505nm.

3.6.2-METODOLOGIA DE DOSAGEM DE GLICOSE

O Kit de glicose oxidase é composto de dois frascos, sendo o número 1 a mistura de enzimas e o número 2, o tampão, que também contém os reagentes 4-aminoantipirina e o fenol. O frasco 2, contendo 100mL de solução, foi diluído a 500mL com água destilada e depois separado em dois frascos escuros, cada um com 250mL do tampão diluído. Essa solução era estável por 12 meses a uma temperatura entre 2 e 8°C. A um desses frascos foi adicionado um dos frascos número 1, o qual continha a glicose oxidase e peroxidase, mistura essa que já estava pronta para reação com amostras contendo glicose. Essa solução era estável por 2 meses.

Para determinação do teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi a determinação da curva padrão ou de calibração, de absorvância em função das concentrações conhecidas de glicose. Para isso, preparou-se tubos de ensaios contendo 2mL da solução de glicose-oxidase preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 20μL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 1,5g/L, deixando-se reagir por 30 minutos a 30°C. Após esse tempo, foram lidas as absorvâncias para os vários tubos, em um espectrofotômetro B 380, da MICRONAL, usando cubetas de vidro de 1cm de percurso ótico, a 505nm,

3.7-IFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE LIVRE

Com o objetivo de estudar a influência do pH e da temperatura na atividade da enzima β -galactosidase na forma livre, foram determinadas as taxas iniciais de reação conforme item 3.6.3, utilizando uma concentração de lactose de 50g/L. Ao estudar a influência do pH, manteve-se a temperatura de 30°C era mantida constante e variava-se o pH das amostras de enzima na faixa de 4,0 a 9,0. A temperatura dos ensaios foram mantidas a 30°C, uma vez que nesta temperatura a enzima se mantém estável durante todo o tempo do experimento. Quando o objetivo era estudar a influência da temperatura na atividade da enzima, o pH era mantido constante em 6,5 e variava-se a temperatura de 10 a 60°C. Os experimentos realizados, em todos os casos foram únicos, ou seja, não se trabalhou com réplica dos mesmos.

3.8-ESTABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM RELAÇÃO

AO pH

Amostras de β -galactosidase a 0,5% em tampão láctico foram incubadas por 24 horas à temperatura de 30°C, a valores de pH na faixa de 4,0 a 8,0. Após esse tempo, foi determinada a atividade da enzima de cada tubo, usando solução de lactose a 50g/L pH igual a 6,5 e temperatura de 30°C. Nesses experimentos, o volume reacional foi de 50mL e o volume de enzima utilizado foi de 2mL. O tampão utilizado no estudo da estabilidade da enzima lactase foi o próprio tampão láctico, já citado anteriormente.

3.9-ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA

A estabilidade térmica da enzima era estudada através de experimentos onde as amostras da enzima eram mantidas em diferentes temperaturas em função do tempo. Preparava-se vários tubos de ensaio contendo a enzima β -galactosidase, incubando-os no banho a uma temperatura pré estabelecida. A intervalos adequados de tempo recolhia-se um tubo e determinava-se a atividade da enzima conforme item 3.6.3, a 30°C, pH 6,5, no tampão láctico, usando uma concentração de lactose igual a 50g/L. Nesses experimentos, amostras de enzimas eram incubadas em temperaturas de 40; 45; 47,5; 50; 53 e 55°C. Cuidado especial

era tomado na escolha do intervalo de retirada do tubo do banho, para cada valor da temperatura.

3.10-INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE

A dependência entre taxa inicial de reação de hidrólise de lactose e a concentração desse açúcar, foi determinada experimentalmente através das taxas iniciais de reação, conforme item 3.6.3, no intervalo de 10 a 150g/L, a 30°C e pH 6,5. O pH 6,5 usado foi recomendado pelo fabricante da enzima β -galactosidase. O limite superior do intervalo de concentrações, 150g/L deve-se à solubilidade da lactose no tampão considerado.

3.11-DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS NA ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE

As determinações das taxas de reação em presença de galactose, foram feitas de maneira similar aos demais experimentos, mas variando-se a concentração de galactose de 0 a 50g/L, conjuntamente com a variação da lactose de 10 a 50g/L. Foram realizados 6 experimentos mantendo a concentração de lactose constante em 10g/L e variando-se a concentração de galactose de 0 a 50g/L. O mesmo procedimento foi adotado para a concentração de lactose 20g/L e assim sucessivamente, até a concentração de lactose de 50g/L. Estes experimentos foram realizados a 30°C e pH igual a 6,5 e com a mesma concentração da enzima. As taxas iniciais foram determinadas conforme item 3.6.3. Foram testados vários modelos de inibição aos resultados experimentais de taxa de reação em função concentração de lactose, tais como: inibição competitiva, inibição não competitiva, inibição pelo substrato, inibição parcialmente não competitiva e inibição mista linear. Para a escolha do melhor modelo foram feitos os testes do Qui Quadrado e soma dos quadrados dos desvios. Estudos similares foram realizados em presença de glicose no meio reacional, porém não se obteve qualquer tipo de inibição.

3.12-ANÁLISE CONJUNTA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO E pH ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.

Após a realização dos vários experimentos descritos, para a análise isolada das três variáveis, temperatura, concentração e pH, foi feito um planejamento estatístico objetivando analisá-las conjuntamente. O planejamento escolhido foi o planejamento composto central com um total de 16 experimentos, sendo 2 réplicas. Este planejamento permitiu estimar os coeficientes de uma equação de superfície de resposta de segunda ordem. O planejamento fez a combinação de 3 variáveis, onde a faixa de temperatura foi de 27 a 53°C, a de pH foi de 4,7 a 7,3 e a de concentração de lactose de 27 a 107g/L. Com este teste foi possível encontrar um ponto ótimo de trabalho, ou seja, o melhor valor de temperatura, concentração e pH. As equações de codificação para as três variáveis concentração de lactose, temperatura e pH são mostradas a seguir:

$$C = \frac{C_0 - 75}{25} \quad (3.1)$$

$$T = \frac{T_0 - 40}{10} \quad (3.2)$$

$$pH = \frac{pH_0 - 6}{1} \quad (3.3)$$

A Tabela 3.2 apresenta os valores reais das variáveis (três primeiras colunas), seus valores codificados (três colunas seguintes).

Tabela 3.2: Valores das variáveis reais e codificadas para montagem do Planejamento Composto Central.

S(g/L)	T(°C)	pH	S(g/L)	T(°C)	pH
50	30	5	-1	-1	-1
100	30	5	+1	-1	-1
50	50	5	-1	+1	-1
100	50	5	+1	+1	-1
50	30	7	-1	-1	+1
100	30	7	+1	-1	+1
50	50	7	-1	+1	+1
100	50	7	+1	+1	+1
43	40	6	$-\alpha$	0	0
107	40	6	$+\alpha$	0	0
75	27	6	0	$-\alpha$	0
75	53	6	0	$+\alpha$	0
75	40	4,7	0	0	$-\alpha$
75	40	7,3	0	0	$+\alpha$
75	40	6	0	0	0
75	40	6	0	0	0

3.13-IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM RESINA FENOL-FORMALDEIDO (DUOLITE)

Amostras de 0,2g da resina fenol formaldeído, de nome comercial Duolite, eram lavadas com água destilada e deixadas por 24 horas em solução 0,1 mol/L de NaCl, sendo a seguir lavadas com tampão sob ligeiro vácuo, conforme procedimento descrito por OLSON, STANLEY (1973). Posteriormente, a cada amostra de suporte, eram adicionados 4mL de enzima a 5%, em tampão, cujo valor do pH variava de 3,0 a 8,0. Após esse tempo, os béqueres eram mantidos à temperatura de 4°C por 3 horas, sendo a seguir lavados com tampão láctico pH 6,5 e determinadas as atividades enzimáticas no reator tipo cesta, conforme item 3.6.3, a pH 6,5 e temperatura 30°C.

O procedimento de imobilização descrito anteriormente era repetido e como etapa subsequente às demais, adicionava-se 0,5ml de glutaraldeído de concentração 25% ao meio de imobilização e deixava-os em contato por aproximadamente 8h na geladeira. Esse procedimento era realizado com três valores diferentes de pH, 6,5; 7,0 e 7,5. Esta escolha devia-se a maior atividade na imobilização do Duolite, nesses valores de pH.

3.14-IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA (SPC)

A técnica de silanização aquosa adotada foi desenvolvida por Weetall (1976), conforme metodologia descrita a seguir:

- a) Preparava-se soluções de γ -aminopropiltriétoxilano a 1% e ajustava-se o pH num valor entre 3 e 4, com solução de HCl 6N.
- b) Adicionava-se certa quantidade da solução preparada no item anterior ao suporte, a fim de embebê-lo, utilizando ligeiro vácuo para retirar o ar dos poros. Após alguns minutos, quando não se notava a formação de bolhas de ar na solução, acrescentava-se o resto da mesma. Usava-se a relação de 20ml de solução de silano por grama do suporte. O pH permanecia entre 3,0 e 4,0.
- c) Colocava-se o erlenmyer com o suporte e a solução de γ -aminopropiltriétoxilano num banho com agitação a 75°C, reagindo por 3 horas.
- d) Lavava-se, então o material, sob vácuo, com água destilada e deixava-se secar por uma noite a 100 \pm 5°C. Este produto era estocado em vidro protegido da luz constituindo assim, o suporte silanizado.

Após silanização da Sílica de Porosidade Controlada, era feita a ativação do suporte e a imobilização da enzima β -galactosidase conforme metodologia descrita a seguir:

- e) Tomava-se uma certa quantidade do suporte silanizado e adicionava-se a ele, a relação de 10 ml de solução de glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato 0,1M e pH igual a 7,0, por grama de suporte. Deixava-o sobre vácuo por algum tempo para desaerar as partículas e depois colocava-se no skaker sob agitação a 25°C, deixando reagir por aproximadamente 45min (MONSAN, 1977/78 apud RIBEIRO, 1989)
- f) Após agitação com glutaraldeído, o suporte era lavado com água destilada e seco sob vácuo.
- g) A seguir, 1 grama do suporte era dividido em 10 partes iguais e colocadas em béqueres diferentes para reagir por 24 horas com 1mL da enzima lactase a 10%, em valores de pH variando de 2,0 a 9,0. Posteriormente as amostras de suportes, com lactase imobilizada, eram lavadas com solução tampão e determinadas suas atividades catalíticas no reator tipo cesta. Com os dados obtidos, verificava-se qual o pH ótimo de imobilização, o qual seria utilizado para realizar os demais experimentos de imobilização em SPC.

Após definidas as melhores condições de imobilização de β -galactosidase em SPC, era estudada a influência da concentração de lactose na taxa de reação de hidrólise da mesma, a 30°C e pH 6,5, conforme item 3.6.3.

3.15-VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO EM SPC

Como o pH do meio de imobilização que proporcionava uma maior atividade catalítica da enzima imobilizada era em torno de 6,5, esse valor era escolhido para se estudar a influência da mesma no meio de imobilização, com a concentração da enzima variando de 3% a 12% (v/v), seguindo o procedimento de imobilização em SPC descrito anteriormente.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes preliminares, primeiramente com a enzima β -galactosidase na forma livre utilizando o tampão fosfato, e posteriormente com a mesma enzima na forma livre e imobilizada utilizando tampão láctico visando obter as melhores condições de operação desta no processo de hidrólise de lactose. Os primeiros ensaios foram realizados com o objetivo de estudar a influência do pH e temperatura na taxa de hidrólise de lactose. Com as melhores condições operacionais destas variáveis estudou-se a taxa de reação de hidrólise de lactose em função da concentração da mesma, tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada, a influência dos produtos da reação, concentração da enzima na taxa de reação da enzima livre e a atividade da enzima retida nos dois diferentes suportes utilizados. Após este estudo foi montado um planejamento composto central, com o qual analisou conjuntamente as variáveis temperatura, concentração e pH.

4.1-INFLUÊNCIA DO pH NA TAXA DA REAÇÃO CATALISADA POR ENZIMA LIVRE

Estudos preliminares indicaram uma forte influência do pH na atividade de β -galactosidase. Assim, o primeiro passo foi a definição do tampão láctico a ser utilizado, conforme item 3.3. Verificava-se experimentalmente que a taxa de reação de hidrólise de lactose, mesmo no pH ótimo, depende muito da composição do tampão. Verificava-se experimentalmente que, utilizando tampão no pH 6,5, porém sem a presença dos componentes indicados na Tabela 3.1, as taxas de reações alcançavam valores menores que aqueles encontrados com o tampão láctico. Os resultados experimentais, utilizando o tampão fosfato como diluente, encontra-se no ANEXO E.

As taxas de reação eram determinadas a 30°C, numa concentração de lactose de 50g/L, em valores de pH no intervalo de 4,0 a 9,0, cujos resultados são apresentados na Figura 4.1.

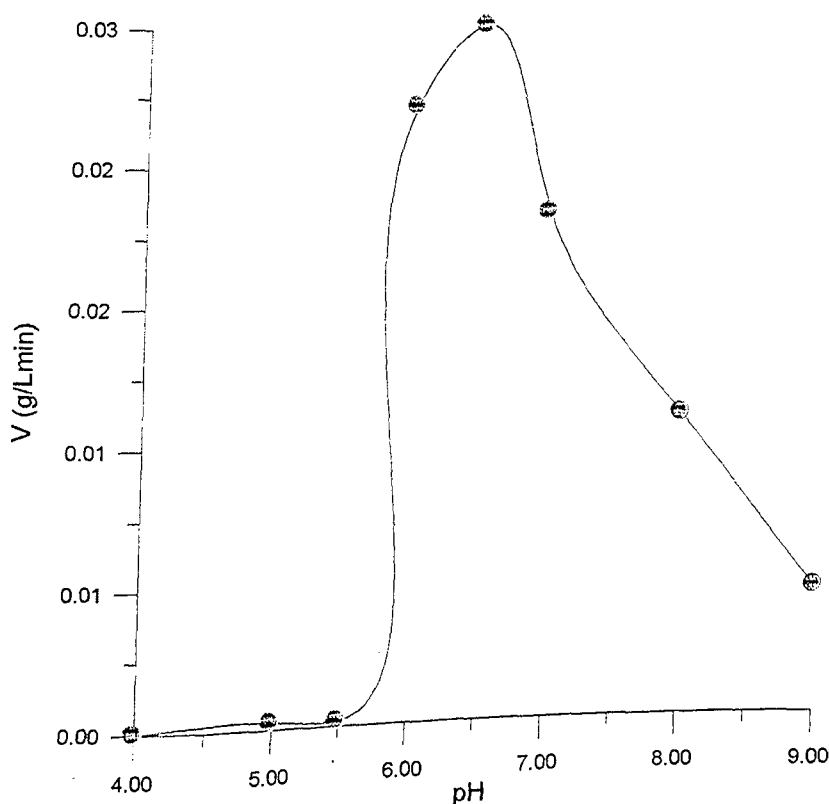


Figura 4.1: Atividade enzimática em função do pH do meio reacional

Pela mesma, verifica-se que no intervalo de pH de 4,0 a 5,5, a enzima não apresentou atividade catalítica, porém em pH 6,0, a atividade elevou-se, apresentando pH ótimo em pH 6,5. A partir desse valor, a atividade decresce.

Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Flores et al (1996) que diz que a β -galactosidase de leveduras tem um pH ótimo num intervalo de 6,0 a 7,0. Segundo esse autor este pH é o mais adequado para a hidrólise do leite, soro neutro e permeado. TREVISAN, 1996 também utilizou pH 6,5 para diluir a enzima de *Kluyveromyces fragilis*. MAHONEY; ADAMCHUK, 1980 realizaram ensaios com a enzima β -galactosidase da levedura *Kluyveromyces fragilis* em pH 6,6, que é praticamente o mesmo pH utilizado por FLORES (1996).

4.2-ESTABILIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE LIVRE EM RELAÇÃO AO pH

A influência do pH na estabilidade de β -galactosidase foi estudada incubando-se amostras da mesma, de atividade conhecida, em soluções tampão a 30°C, durante 24 horas, conforme CABRAL, (1982), em valores de pH variando de 4,0 a 8,0. Após esse tempo, eram

determinadas as atividades enzimáticas de cada amostra, em pH 6,5 e temperatura 30°C, numa solução com concentração de lactose 50g/L, e comparado com a atividade inicial da enzima. Os resultados em termos de atividade relativa são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores de estabilidade da enzima em relação ao pH

pH	Atividade relativa(%)
8,0	94,6
7,0	100,0
6,5	91,1
6,0	72,4
5,0	17,0
4,0	0,0

A atividade relativa foi considerada igual a 100% em pH igual a 7,0, sendo que este foi o pH em que a enzima apresentou maior atividade. Em pH 5,0 sua atividade foi de apenas 17% em relação à atividade inicial, ou seja pH igual a 7,0. Verificou-se que no intervalo de pH de 6,5 a 8,0 praticamente não ocorreu desativação, pois a atividade da enzima ficou em torno de 90%.

Uma análise conjunta da Figura 4.1 e Tabela 4.1 sugere que valores de pH menores que 5,0 implicam em grande desativação da enzima, na faixa de 6,0 a 8,0 a mesma apresenta alta estabilidade, e que para valores acima de 6,5, embora a enzima não apresente alta inativação, ela se encontra num estado de ionização inadequado para a catálise.

MAZZOBRE (1997) diz que o estudo da estabilidade das enzimas é um dos fatores determinantes para a caracterização e aplicação das mesmas em muitos processos biotecnológicos.

ROGALSKI et al (1994) estudaram a estabilidade da enzima β -galactosidade de diferentes fontes, bactérias e fungos. A forma nativa das enzimas de bactérias exibiram alta estabilidade para pH próximo de 7,8. Em pH ácido sua estabilidade decresceu bastante. No caso de enzima fúngica de *Aspergillus flavus*, verificou-se uma estabilidade de 70% em pH 4,5. A enzima fúngica de *Aspergillus notatum* apresentou 100% de estabilidade em pH 3,0. Ele não menciona a estabilidade de enzimas provenientes de leveduras.

4.3- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE NA FORMA LIVRE

As taxas iniciais de hidrólise de lactose com β -galactosidase livre são apresentadas na Figura 4.2, para temperaturas na faixa de 10 a 60°C, determinadas em pH 6,5, numa concentração de lactose de 50 g/L. Através desta, verifica-se que a atividade da enzima aumenta com o aumento da temperatura até que esta atinja 40°C, que é a temperatura ótima, decrescendo rapidamente a partir desse valor. Uma temperatura de 60°C é suficiente para inativar rapidamente a enzima em estudo.

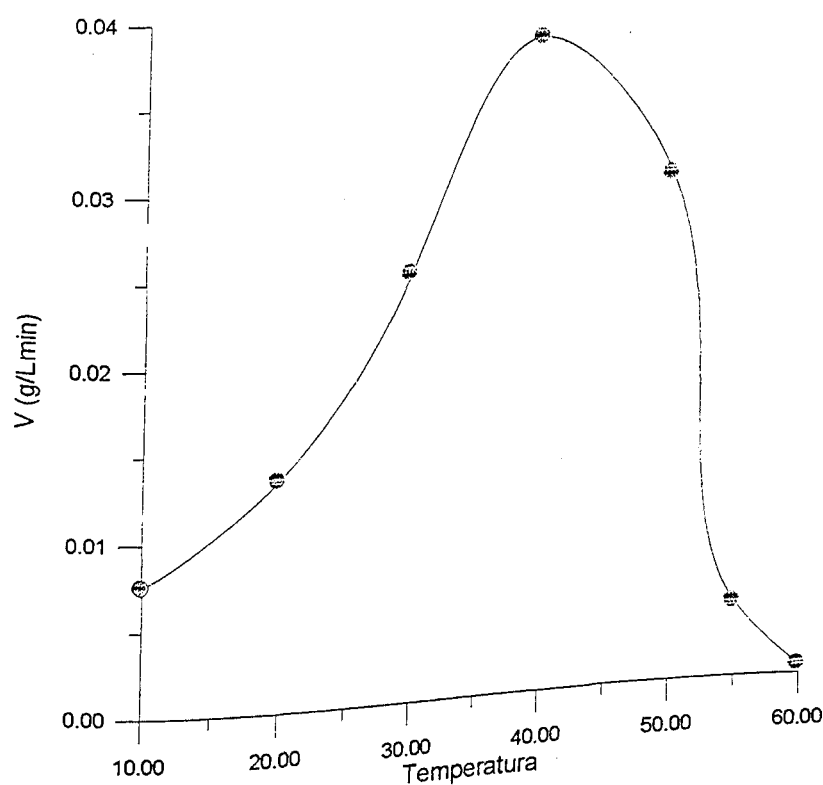


Figura 4.2: Atividade de β -galactosidase livre em função da temperatura

ROGALSKI (1994) encontrou uma temperatura ótima de 30°C para a β -galactosidase proveniente de bactéria e uma temperatura ótima de 40°C para β -galactosidasas fúngicas. As enzimas em geral apresentam-se mais ativas nesta faixa de temperatura.

4.4-ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

A influência da temperatura na estabilidade de β -galactosidase foi estudada conforme item 3.12 e os resultados de atividade relativa (A_r) em função do tempo, para cada temperatura, são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Dados de tempo e taxa de reação para diferentes temperaturas

T (°C)	t (min)	A_r	T (°C)	t (min)	A_r
T=40°C	0	1,00	T=50°C	0	1,00
	60	1,08		4	0,93
	180	0,92		8	0,39
	300	0,90		12	0,21
	420	0,74		16	0,13
	540	0,85	
	660	0,54	
	720	0,52	
T=45°C	0	1,00	T=53°C	0	1,00
	30	0,67		1.5	1,45
	60	0,45		3	0,73
	90	0,36		4.5	0,24
	120	0,26		6	0,12
	150	0,22	
	180	0,20	
T=47,5	0	1,00	T=55°C	0	1,00
	5	1,01		0.5	1,67
	10	0,62		1	1,52
	15	0,37		2	1,16
	20	0,24		3	0,48
	25	0,21		4	0,16
	30	0,15		5	0,09

Aplicando a Equação 2.13 aos resultados da Tabela 4.2, calculou-se os valores de k_d , para cada temperatura, os quais são apresentados na Tabela 4.3. Com os valores de k_d , determinou-se os valores de $t_{1/2}$ pela Equação 2.14, os quais se encontram na mesma tabela.

Tabela 4.3: Valores de k_d e $t_{1/2}$ em função da temperatura

Temperatura(°C)	$(k_d \text{ (min)}^{-1})$	$t_{1/2} \text{ (min)}$
40,0	0,0010	682,2
45,0	0,0091	76,6
47,5	0,0699	9,9
50,0	0,1392	5,0
53,0	0,4026	1,72
55,0	0,5722	1,21

Objetivando determinar a energia de ativação do processo de inativação da enzima, correlacionou-se $\ln(k_d)$ em função de $1/T$, na faixa 40 a 55°C, utilizando a Equação 2.16. O valor de E_d encontrado para a enzima lactase foi de 89244,3 cal/mol, sendo este menor que a energia de desativação da invertase, que teve um valor de 122171,17 cal/mol (RIBEIRO, 1989). A Equação 4.1 mostra a relação entre $k_d \text{ (min}^{-1})$ e $1/T \text{ (K}^{-1})$ encontrada, com um coeficiente de correlação de 0,98.

$$\ln(k_d) = 138,8 - 44909,6 \frac{1}{T}$$

$$\ln(k_d) = 138,8 - 44909,6 \frac{1}{T} \quad (4.1)$$

O gráfico de Arrhenius, correlacionando os valores de k_d da Tabela 4.5 em função da temperatura, está apresentado na Figura 4.3, cujos pontos representam os valores obtidos a partir dos experimentos e a reta corresponde ao modelo dado pela Equação 4.1.

$$E_d = 99135,38$$

$$E_d = 99135,38$$

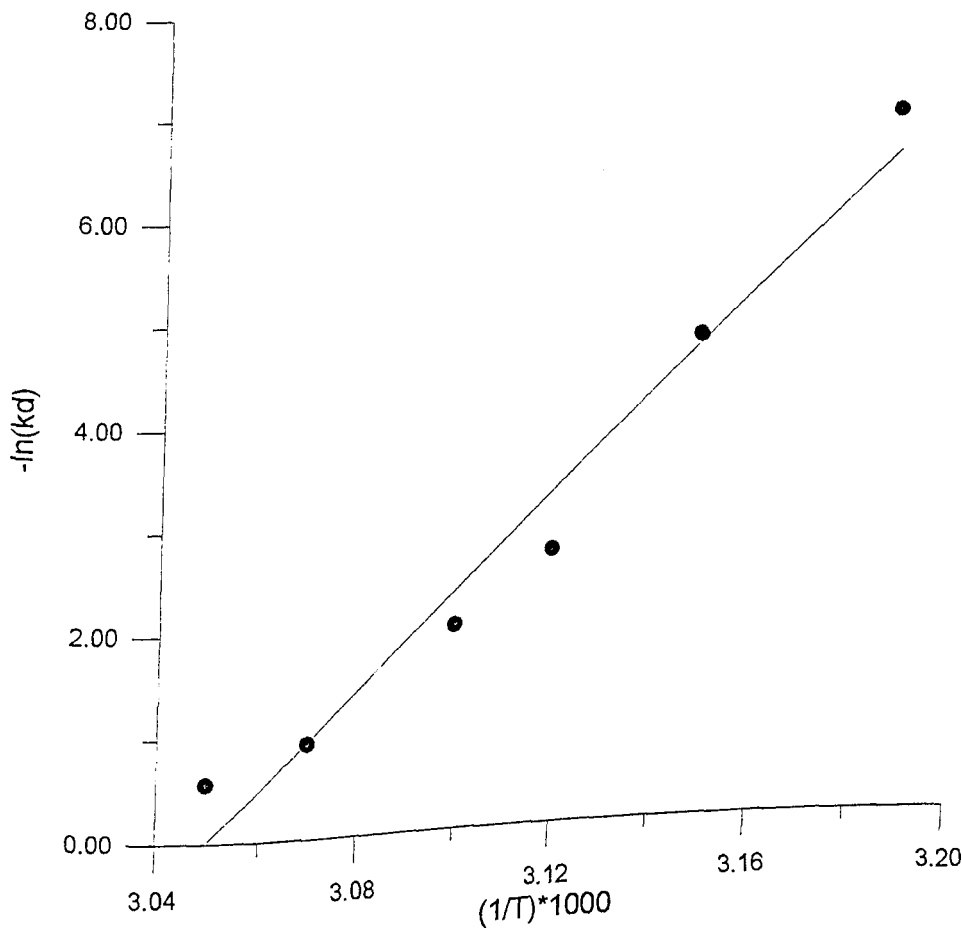


Figura 4.3: Gráfico de Arrhenius para a inativação térmica de β -galactosidase

Com os resultados descritos anteriormente, é possível perceber a tendência de inativação térmica da enzima. Em temperaturas próximas a 40°C, que corresponde à temperatura de máxima atividade, conforme a Figura 4.2, a enzima apresentou alta estabilidade, com tempo de meia vida da ordem 682,2min. Para temperaturas maiores que 40°C, a atividade enzimática começa a decrescer rapidamente, sendo a inativação muito severa a temperaturas da ordem de 50°C. Isto mostra a grande sensibilidade da enzima β -galactosidase em relação à temperatura.

MAZZOBRE (1997), mostrou resultados muito próximos a estes ao analisar a estabilidade térmica da β -galactosidase. O tempo de meia vida encontrado por ele foi em torno de 60 minutos a 45°C e menos que 0.5 minutos a 55°C. MAHONEY; WILDER (1987) concluíram que o tempo de meia vida da β -galactosidase de *Escherichia coli*, aquecida em tampão fosfato a 60°C, (com adição de NaN_3 e MgCl_2) foi de 1,1 minuto.

4.5 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE LIVRE

As taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose pela enzima livre, na ausência dos produtos da reação, foram determinadas experimentalmente conforme item 3.10, na faixa de concentração de 10 a 150 g/L e estão apresentadas na Figura 4.4. Esses resultados ajustados ao modelo de Michaelis-Menten, conduziram à Equação 4.2, cujos parâmetros determinados por regressão não linear, foram $K_m = 9,18$ g/L e $V_m = 0,14$ g/(L.min), com um coeficiente de correlação de 0,98.

O modelo de Michaelis-Menten encontrado está representado abaixo pela Equação 4.2:

$$V = \frac{V_m S}{K_m + S} \quad (4.2)$$

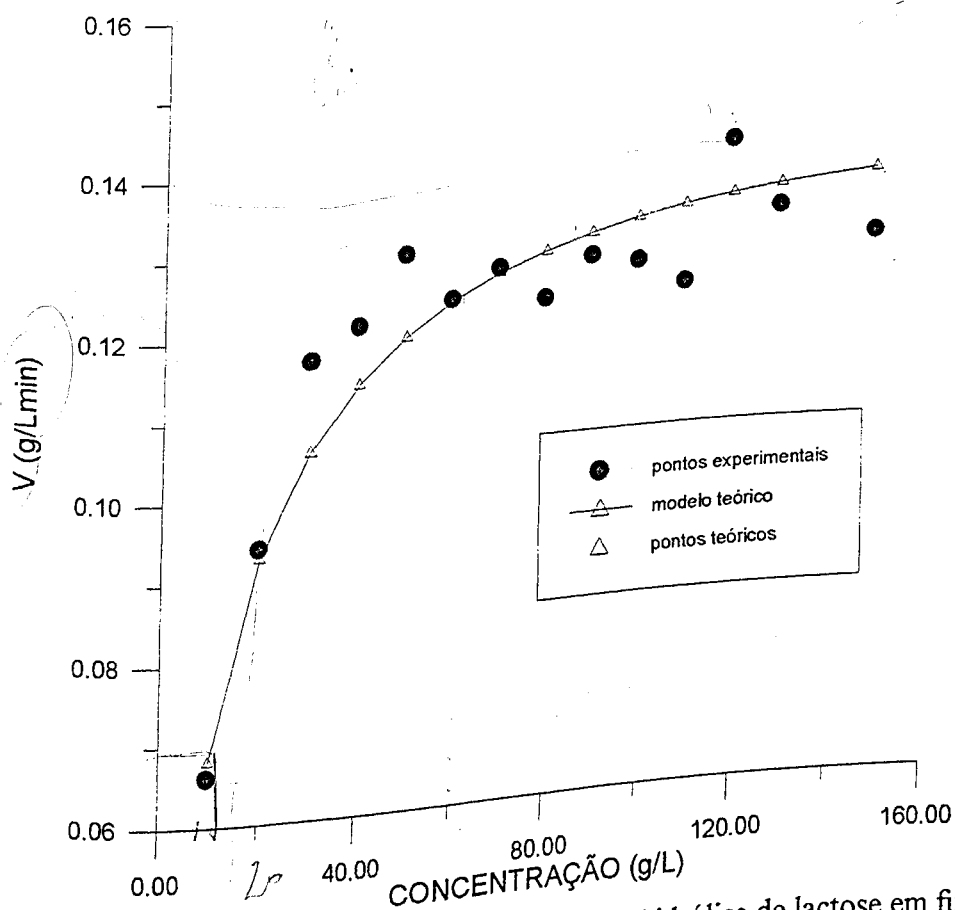


Figura 4.4: Taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose em função da concentração da mesma.

Uma comparação entre os resultados experimentais e a curva de ajuste dos mesmos, representados na Figura 4.3, mostra claramente que os resultados experimentais se ajustaram ao modelo de Michaelis-Menten. Os desvios dos pontos apresentados na Figura 4.4 devem-se provavelmente a erros experimentais. Nesta análise não se levou em consideração a presença de produtos da reação, glicose e galactose. Em processos com hidrólise total de produtos derivados do leite, com concentrações de lactose da ordem de 50g/L, os produtos foram considerados como no item 4.6.

ANDREW (1990), HENG (1994) e BÓDALO (1991) estudando a hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase proveniente de outras fontes, obtiveram o melhor ajuste dos dados experimentais seguindo o modelo de Michaelis-Menten.

4.6-AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GALACTOSE NO MEIO REACIONAL

A influência da galactose na reação de hidrólise de lactose foi estudada conforme item 3.11. As reações ocorreram na presença de concentrações iniciais conhecidas de galactose e os resultados obtidos encontram-se Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Resultados experimentais de taxa de reação (V) em função da concentração de lactose (S) e galactose (I)

S (g/L)	I (g/L)	V (g/Lmin)	S (g/L)	I (g/L)	V (g/Lmin)
10	0	0.065958	10	30	0.05171
20	0	0.094058	20	30	0.06523
30	0	0.117059	30	30	0.07541
40	0	0.120882	40	30	0.09033
50	0	0.122990	50	30	0.10494
10	10	0.049297	10	40	0.04759
20	10	0.077567	20	40	0.06379
30	10	0.098373	30	40	0.07806
40	10	0.070930	40	40	0.10854
50	10	0.128379	50	40	0.10837
10	20	0.051973	10	50	0.04574
20	20	0.075840	20	50	0.06225
30	20	0.083700	30	50	0.07788
40	20	0.102889	40	50	0.08616
50	20	0.121284	50	50	0.11272

Os valores experimentais da Tabela 4.4 foram ajustados aos vários modelos de inibição propostos na literatura conforme SEGEL (1979). Os modelos que melhor se ajustaram aos dados experimentais foram o de inibição competitiva e inibição mista linear. Utilizou-se como critério de discriminação o teste do Qui-quadrado e a minimização do quadrado dos desvios. Pelo teste do Qui-quadrado, efetuado com o software Microsoft Excel 5.0, todos os modelos representaram os dados experimentais com uma probabilidade de 100%, então o critério utilizado para escolha do melhor modelo foi o da soma dos quadrados dos resíduos. Os modelos de inibição competitiva e o de inibição mista linear apresentaram praticamente a mesma soma dos quadrados dos resíduos, conforme Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Soma dos quadrados dos resíduos referente a cada modelo de inibição

Modelo	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Inibição competitiva	0,002883
Inibição não competitiva	0,003112
Inibição acompetitiva	0,003373
Inibição mista linear	0,002883
Inibição pelo substrato	0,004860

Foi escolhido o modelo de inibição competitiva no presente trabalho por concordar com trabalhos anteriores, como o de PAPAYANNAKOS (1993) e GLATZ (1994). Eles encontraram o modelo de inibição competitiva pela galactose tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada, enquanto a glicose não inibiu a atividade da enzima.

Os parâmetros cinéticos encontrados, para o modelo de inibição competitiva, foram $V_m=0,16\text{ g/Lmin}$, $K_m=17,04\text{ g/L}$ e $K_i=54,26\text{ g/L}$, obtidos por regressão não linear. O modelo cinético que representa a inibição competitiva de β -galactosidase pela galactose está apresentado na Equação 4.3:

$$V = \frac{V_m S}{S + 17,04 \left(1 + \frac{I}{54,26} \right)} \quad (4.3)$$

Onde I representa a concentração de galactose.

A seguir é mostrado a Figura 4.5 que correlaciona a taxa de reação da hidrólise da lactose em função da concentração da mesma e do produto galactose.

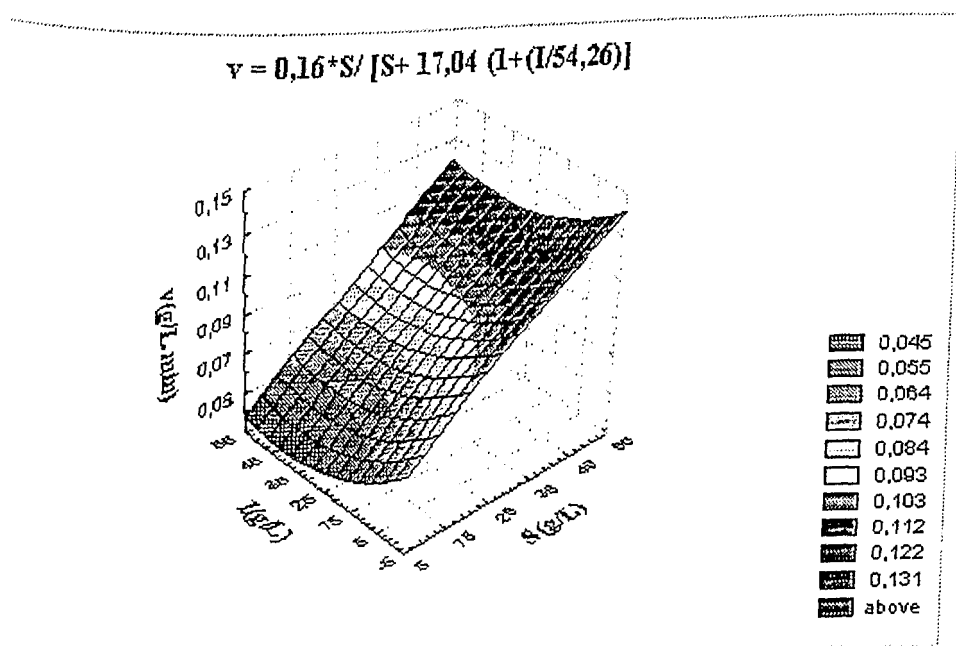


Figura 4.5 : Taxa de reação de hidrólise de lactose em função da concentração do próprio substrato e do produto da reação, a galactose, segundo o modelo de inibição competitiva.

Através da Figura 4.5 verifica-se que a taxa de reação é elevada quando aumenta-se a concentração de lactose e diminui-se a concentração do inibidor, a galactose. Quando a concentração do inibidor é alta e a concentração de lactose é baixa tem-se o menor valor da taxa de reação. A partir destes comentários é possível verificar que a presença do inibidor na reação provoca a diminuição da taxa da mesma. Para altos valores da concentração de lactose, mesmo para altas concentrações do inibidor galactose, atinge-se altas taxas de reação o que está de acordo com o mecanismo do modelo de inibição competitiva, o qual indica que para altos valores de concentração do substrato, há o deslocamento do equilíbrio para o lado do complexo produtivo ES.

4.7-ANÁLISE DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Através do planejamento composto central, como descrito no item 3.10, fez-se um estudo da influência conjunta da concentração de lactose, temperatura e pH do meio reacional na taxa de reação, cujos resultados experimentais encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Resultados do planejamento composto central para a influência das variáveis concentração de substrato, pH e temperatura sobre a taxa de reação

S(g/L)	T(°C)	PH	S(g/L)	T(°C)	pH	V (g/L.min)
50	30	5	-1	-1	-1	0,00000
100	30	5	+1	-1	-1	0,00000
50	50	5	-1	+1	-1	0,00000
100	50	5	+1	+1	-1	0,00000
50	30	7	-1	-1	+1	0,09012
100	30	7	+1	-1	+1	0,08526
50	50	7	-1	+1	+1	0,01088
100	50	7	+1	+1	+1	0,13288
43	40	6	$-\alpha$	0	0	0,08808
107	40	6	$+\alpha$	0	0	0,15535
75	27	6	0	$-\alpha$	0	0,08645
75	53	6	0	$+\alpha$	0	0,11310
75	40	4,7	0	0	$-\alpha$	0,00000
75	40	7,3	0	0	$+\alpha$	0,12002
75	40	6	0	0	0	0,11964
75	40	6	0	0	0	0,13002

Estes resultados foram analisados através do software Statistica, para verificar a influência de cada variável separadamente, interações entre essas variáveis e seus termos quadráticos. Pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se a Equação geral 4.4.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 + \beta_{33} X_3 X_3 \quad (4.4)$$

Onde

X_1 = concentração

X_2 = temperatura

$$X_3 = \text{pH}$$

Os coeficientes de X_3 e X_3X_3 , obtidos através do software Statistica têm um valor numérico bem superior aos demais, conforme pode ser visto pela Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Valores dos coeficientes das variáveis codificadas, concentração, temperatura e pH calculados através do software Statistica

Variáveis	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	X_1X_1	X_2X_2	X_3X_3
Coeficientes	0,22	0,37	35,68	0,00	0,00	0,01	0,06	-0,08	-35,73

Pela análise dos valores dos coeficientes de X_1 , X_2 , e X_3 na Tabela 4.7, conclui-se que a importância do pH na taxa de reação é muito superior às variáveis temperatura e concentração. Como X_3 representa o pH, apenas o seu efeito é verificado nas condições do planejamento proposto. Logo a Equação 4.4, de acordo com as considerações anteriores, pode ser representada pela Equação 4.5.

$$Y = 35,68X_3 - 35,73X_3X_3 \quad (4.5)$$

A Equação 4.5 mostra que o efeito da temperatura e da concentração foram mascarados, ou seja, apenas o efeito do pH predominou. Esse resultado provavelmente foi obtido devido a uma má escolha da faixa de pH. Em pH 5,0 a enzima não apresentou atividade e isso pode ter influenciado muito o resultado. Se um novo intervalo de pH fosse escolhido, no qual a enzima fosse mais ativa, talvez fosse possível tirar novas conclusões a respeito do efeito conjunto das três variáveis.

Neste caso não é possível mostrar as superfícies de resposta esperadas, pois tem-se o efeito de apenas uma das variáveis, o pH.

4.8-IMOBILIZAÇÃO DE LACTASE EM DUOLITE

Após imobilização de β -galactosidase em resina Duolite, conforme procedimento descrito no Item 3.14, em diferentes pHs, foram determinadas as atividades catalíticas da enzima imobilizada de acordo com o Item 3.6.3 as quais são apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Resultados de atividade catalítica obtidos na imobilização de β -galactosidase em Duolite em função do pH do meio de imobilização

pH	V(g/g.min.L)
6,0	0,84
6,5	0,25
7,0	0,17

A máxima atividade catalítica encontrada ocorreu para o pH do meio de imobilização igual a 6,0. Em pH 6.5 a atividade caiu em aproximadamente 70% e em pHs menores que 6,0 não houve retenção de atividade enzimática pela resina. Isto mostra a restrição na faixa de pH para imobilização da β -galactose em Duolite. Usando glutaraldeído, como agente de ligação cruzada, com o suporte Duolite, nenhuma atividade catalítica foi encontrada. Isto se deve, provavelmente, à reação do glutaraldeído com o sítio ativo da enzima ou com resíduos de aminoácidos que alteram a estrutura quaternária da enzima, sugerido por TREVISAN (1996).

4.9-INFLUÊNCIA DO pH NA IMOBILIZAÇÃO DA SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

A imobilização de β -galactosidase foi realizada em sílica de porosidade controlada, na faixa de pH de 2,0 a 9,0, à temperatura de 30°C, como descrito no Item 3.15. As atividades catalíticas das amostras de enzima imobilizada, em diferentes valores de pH, foram determinadas a 30°C, em pH 6,5, numa concentração de lactose de 50g/L, utilizando um microrreator tipo cesta e os resultados em termos de taxa de reação estão apresentados na Figura 4.6.

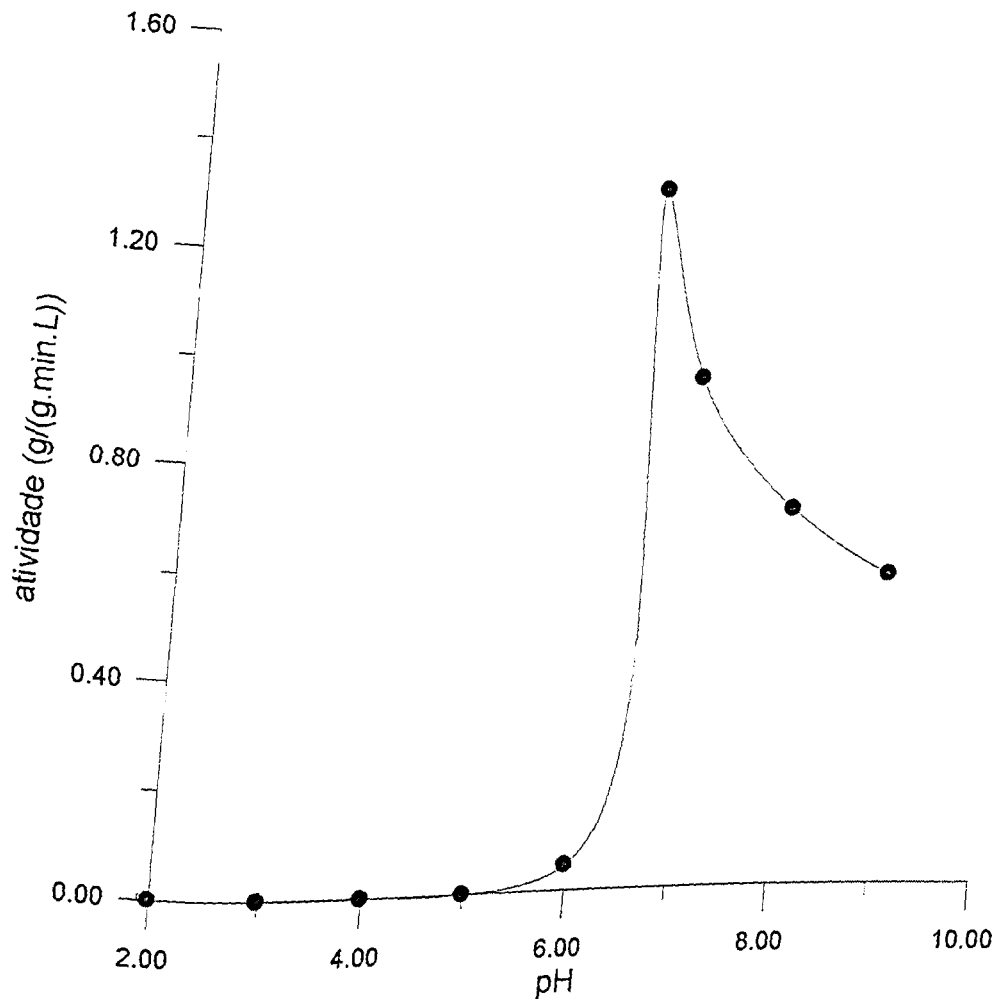


Figura 4.6: Influência do pH do meio de imobilização na retenção de atividade enzimática de β -galactosidase por sílica de porosidade controlada.

Através da mesma, é possível verificar que a maior atividade da enzima imobilizada foi em pH 6,5. Este foi o pH que apresentou o melhor estado de ionização tanto para a enzima imobilizada como para a enzima livre, como foi observado no Item 4.1. Em pH de 2,0 a 5,0 nenhuma atividade enzimática foi retida pelo suporte, ou seja, nesta faixa a enzima lactase é inativa, quando imobilizada em SPC.

O pH, como se pode perceber pelos dados obtidos e segundo OLSON; STANLEY (1973), tem grande efeito na atividade da lactase imobilizada.

SUNGUR; AKBULUT (1994) e PAPAYANNAKOS (1993) relatam a dependência da atividade da β -galactosidase imobilizada com aquela da enzima nativa, ou seja, se o pH ótimo da enzima livre encontra-se na faixa de 7,0, esta mesma faixa de pH será utilizado para imobilização desta enzima.

4.10-INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO EM SPC

Uma vez verificado que o pH do meio de imobilização que implicou em maior retenção de atividade no processo de imobilização foi de 6,5, este pH foi escolhido para continuidade do estudo da imobilização.

A influência da concentração da enzima no processo de imobilização foi estudada conforme item 3.16 e os resultados de atividade alcançados estão apresentados na Figura 4.7.

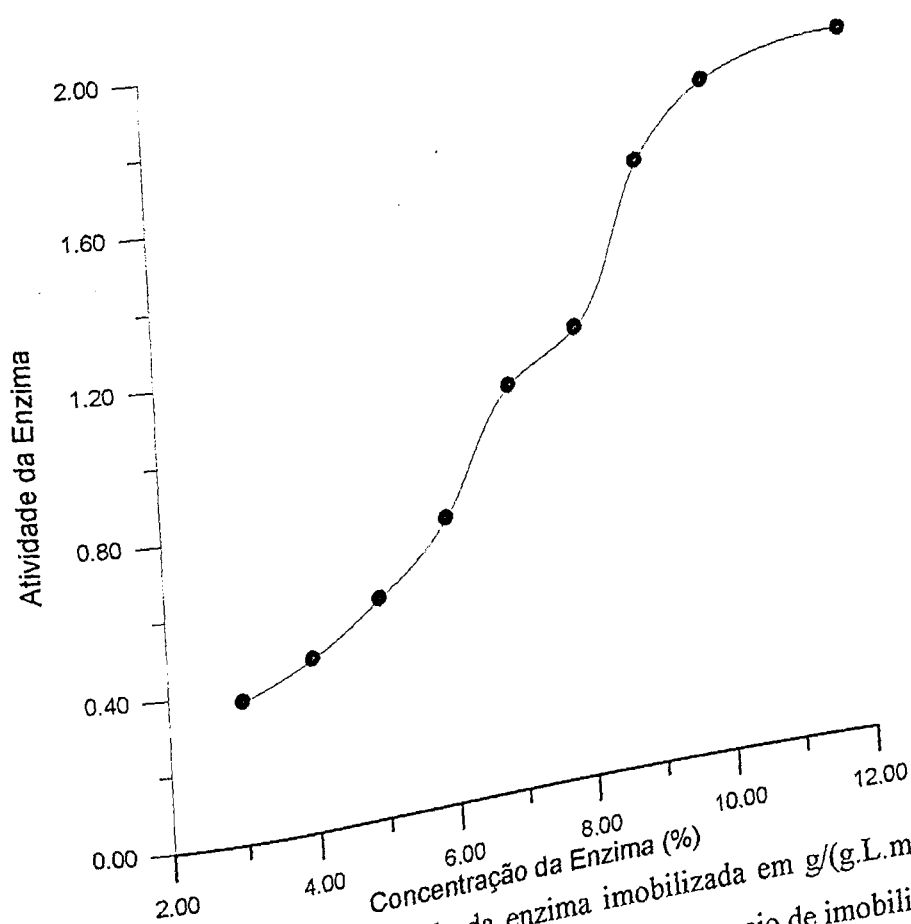


Figura 4.7: Atividade da enzima imobilizada em g/(g.L.min) em função da concentração da enzima no meio de imobilização

A atividade da enzima β -galactosidase imobilizada foi crescente com a concentração da mesma, no meio de imobilização, até aproximadamente 12%, mostrando uma certa tendência a se estabilizar a partir deste ponto. Isto sugere uma espécie de saturação da SPC pela concentração da enzima, ou seja, os sítios de ligação, na superfície do suporte, vão sendo

gradativamente ocupados à medida que o número de moléculas de proteína ativa vão aumentando no meio, até chegar à saturação.

Resultados semelhantes foram obtidos por AXELSSON (1990) ao apresentar um gráfico que correlaciona a porcentagem de enzima que se liga ao alginato de cálcio em função da razão da massa de β -galactosidase. A porcentagem de enzima retida pelo alginato foi crescente até uma determinada concentração da enzima, permanecendo praticamente constante a partir daí, ou seja, mesmo aumentando a concentração da enzima a porcentagem da mesma, ligada, permanece praticamente constante, indicando uma espécie de saturação do suporte.

4.11-CINÉTICA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LACTOSE POR LACTASE IMOBILIZADA EM SPC

Os resultados experimentais de taxa de reação em função da concentração de lactose em pH 6,5, temperatura 30°C e concentração de lactose 50g/L determinadas em reator tipo cesta, para a enzima imobilizada, são apresentados na Figura 4.8. Os resultados experimentais são representados por pontos, os quais se ajustaram ao modelo teórico de Michaelis-Menten, conforme a Equação 4.6. Os parâmetros cinéticos encontrados foram $V_m=0,18\text{g/L}\cdot\text{min}$ e $K_m=36,22\text{ g/L}$, através de regressão não linear, com um coeficiente de correlação de 0,98.

Uma comparação entre os resultados experimentais e o modelo de Michaelis-Menten, dado pela Equação 4.6, é mostrada na Figura 4.8.

(4.6)

$$V = \frac{0,183 * S}{36,22 + S}$$

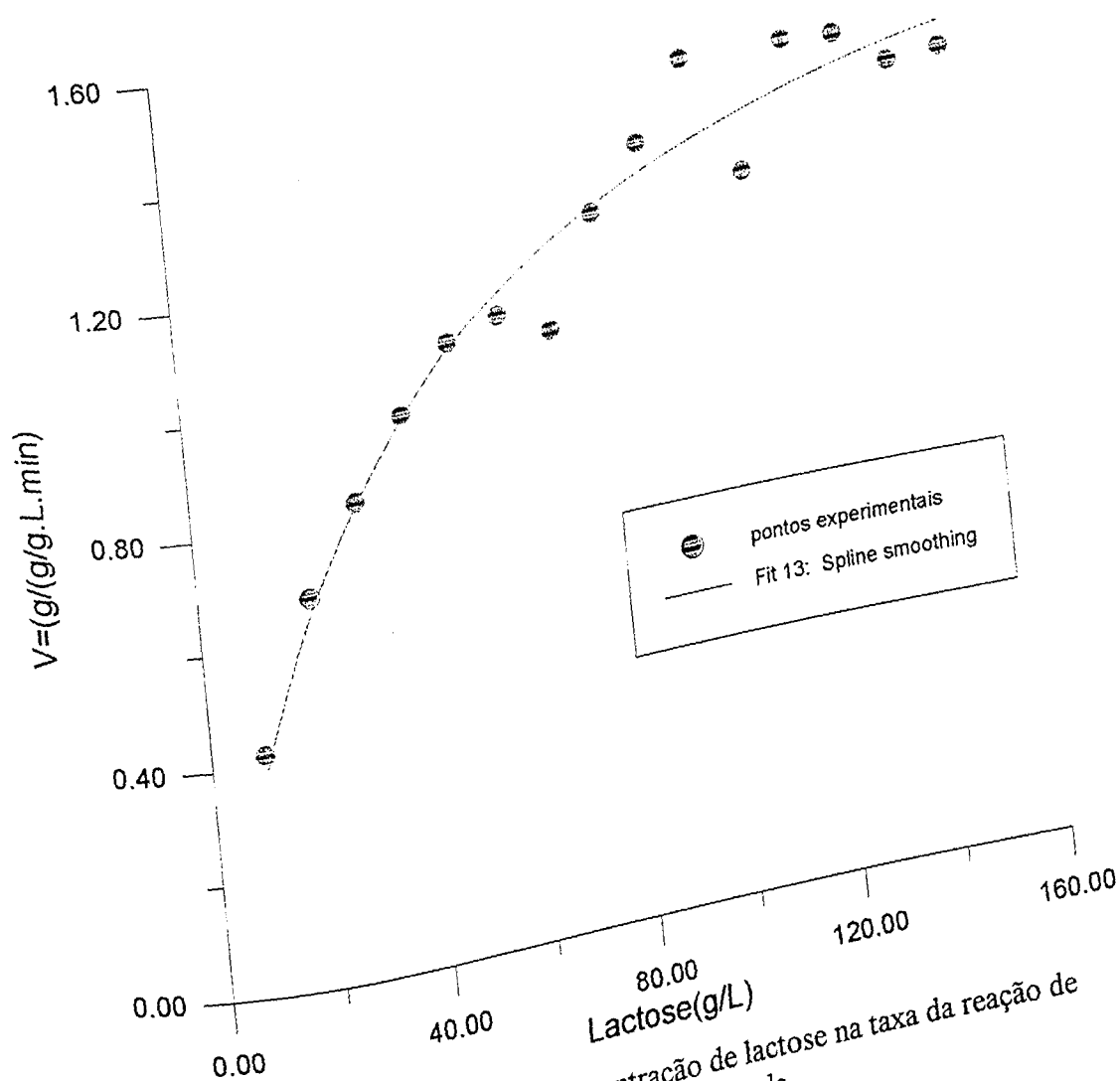


Figura 4.8: Influência da concentração de lactose na taxa da reação de hidrólise pela enzima imobilizada.

O valor de K_m para a enzima imobilizada aumentou quatro vezes em relação ao valor de K_m encontrado para a enzima livre, e isto se deve aos efeitos de transferência de massa ocorridos durante os dois diferentes processos de hidrólise de lactose.

PAPAYANNAKOS (1993), ao realizar a hidrólise de lactose com β -galactosidase de *Aspergillus niger*, imobilizada em cerâmica monolítica porosa, encontrou o modelo de Michaelis Menten com inibição competitiva pela galactose depois de testar alguns modelos cinéticos. HENG, GLATZ (1994) também encontraram o mesmo modelo quando imobilizaram β -galactosidase de *Escherichia coli* em membrana de troca iônica.

5-CONCLUSÕES

A cinética de reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase livre seguiu o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pela galactose, um dos produtos da reação. O modelo cinético está representado pela Equação 4.3, e os valores dos parâmetros cinéticos encontrados foram K_m igual a 17,04g/L e K_i igual a 54,26g/L.

A temperatura e o pH ótimos para a reação de hidrólise de lactose encontrados foram 40°C e 6,5 respectivamente. A atividade enzimática de β -galactosidase é extremamente dependente do pH do meio reacional, desativando-se rapidamente para valores de pH menores que 6,0 e maiores que 7,0. A temperatura também exerce grande influência na atividade catalítica da mesma, uma vez que obtêm-se melhores taxas em temperaturas mais elevadas, mas estas não podem ser altas a ponto de inativar a enzima.

A estabilidade térmica da enzima livre foi bastante elevada a 40°C, com um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) igual 682,2 minutos, mas em 55°C seu $t_{1/2}$ caiu para 1,21 minutos, isto mostra a restrição na faixa de temperatura para uso da enzima β -galactosidase. A energia de ativação do processo de inativação da enzima foi 89244,3cal/mol.

A imobilização de lactase de *Kluyveromices fragilis*, na resina fenol-formaldeído, de nome comercial Duolite, por processo iônico foi dependente do pH do meio de imobilização, apresentando máxima retenção de atividade em pH 6,0. Nessas condições conseguiu-se uma atividade catalítica de 0,84 g/(g.L.min).

A imobilização da enzima em sílica de porosidade controlada sofreu forte influência do pH do meio de imobilização, sendo que a máxima atividade alcançada foi em pH 6,5. A atividade da enzima imobilizada aumentou com a concentração da enzima livre no meio de imobilização até 12%, apresentando uma tendência de estabilização a partir desse ponto. A máxima atividade de lactase imobilizada alcançada, no processo de imobilização descrito acima, foi de 1,49 g/(g.L.min).

A sílica de porosidade controlada ativada por silanização com γ -aminopropiltriétoxissilano e ativada com glutaraldeído, mostrou-se um suporte adequado para imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromices fragilis*.
A cinética da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada em SPC seguiu uma cinética tipo Michaelis-Menten, com K_m igual a 36,22g/L e V_m igual a 0,18g/(g.L.min).

6-SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a influência conjunta do pH, temperatura concentração do substrato e dos produtos na taxa da reação, através de um planejamento composto central, utilizando uma faixa adequada para as variáveis.
- Utilizar suporte de sílica de porosidade controlada com outros diâmetros de poro, diferentes de 375°A, visando otimizar o processo de imobilização.
- Realizar um estudo da estabilidade operacional da enzima imobilizada obtida.
- Estudar a cinética de hidrólise de lactose por lactase imobilizada em termos de parâmetros intrínsecos

ANEXO A

Os valores experimentais de taxa de hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre, em função do pH do meio e da temperatura, são apresentados na Tabela 01 e Tabela 02, respectivamente.

ANEXO A

Os valores experimentais de taxa de hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre, em função do pH do meio e da temperatura, são apresentados nas Tabelas 01 e 02, respectivamente. Através destas tabelas foram construídas as Figuras 4.1 e 4.2 mostradas no Resultados e Discussão.

Tabela 01: Valores experimentais de pH e taxa de reação

PH	V(g/(Lmin))
4,0	0,0000
5,0	0,0003
5,5	0,0002
6,0	0,0219
7,1	0,0181
8,0	0,0108
9,0	0,0046

Tabela 02: Valores experimentais de temperatura e taxa de reação

Temperatura (°C)	V(g/(Lmin))
10	0,0076
20	0,0134
30	0,0248
40	0,0381
50	0,0297
55	0,0044
60	0,0005

ANEXO B

Dados da taxa de reação de hidrólise de lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre (Tabela 03) e imobilizada em SPC (Tabela 04).

ANEXO B

Os dados de taxa de reação de hidrólise de lactose, utilizando a enzima β -galactosidase na forma livre são apresentados na Tabela 03, e os dados relativos à enzima imobilizada em SPC são apresentados na Tabela 04. Nestas tabelas são apresentados os valores de concentração do substrato, taxa experimental e teórica respectivamente.

Tabela 03: Valores de concentração de lactose, taxa de reação experimental e teórica, sendo esta obtida pelo modelo de Michaelis-Menten, utilizando enzima livre

S(g/Lmin)	V _{exp} (g/(gLmin))	V _{teor} (g/Lmin)
10	0,06596	0,06800
20	0,09406	0,09289
30	0,11706	0,10579
40	0,12088	0,11369
50	0,12927	0,11902
60	0,12299	0,12286
70	0,12633	0,12576
80	0,12201	0,12803
90	0,12688	0,12985
100	0,12579	0,13134
110	0,12267	0,13259
120	0,14028	0,13366
130	0,13163	0,13455
150	0,12785	0,13603

Tabela 04: Valores de concentração de lactose, taxa de reação experimental e teórica, sendo esta obtida pelo modelo de Michaelis-Menten, utilizando enzima imobilizada em SPC.

S(g/Lmin)	V _{exp} (g/(gLmin))	V _{teor} (g/Lmin)
10	0,41792	0,39583
20	0,67685	0,65101
30	0,82708	0,82906
40	0,96105	0,96038
50	1,07016	1,06612
60	1,09975	1,14113
70	1,05435	1,20599
80	1,24486	1,25968
90	1,35243	1,30486
100	1,48529	1,34342
110	1,26643	1,37669
120	1,48529	1,40571
130	1,47849	1,43124
140	1,41467	1,45386
150	1,42404	1,47406

ANEXO C

Os valores de retenção de atividade da β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da concentração da mesma são apresentados na Tabela 05, e os que correlaciona os valores de retenção de atividade da enzima β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da variação do pH do meio de imobilização são apresentados na Tabela 06.

ANEXO C

Os valores de retenção de atividade da β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da concentração da mesma, são apresentados na Tabela 05 enquanto que os valores de retenção de atividade da enzima β -galactosidase, imobilizada em SPC, em função da variação do pH do meio de imobilização são apresentados na Tabela 06.

Tabela 05: Atividade da enzima imobilizada em SPC em função da concentração da mesma.

Enzima %(v/v)	Atividade (g/(gLmin))
3	0,03723
4	0,04503
5	0,05701
6	0,07449
7	0,10604
8	0,11805
9	0,15899
10	0,17776
12	0,18657
15	0,16204

Tabela 06: Atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada em SPC e valores de pH do meio de imobilização

pH	Atividade (g/gLmin)
2,0	0,00000
3,0	0,00000
4,0	0,00000
5,0	0,00000
6,0	0,00461
6,5	0,13035
7,0	0,09491
8,0	0,07031
9,0	0,05806

ANEXO D

Os valores dos coeficientes das variáveis concentração, temperatura e pH, que são representadas por X1, X2 e X3 respectivamente, são apresentados na Tabela 07, proveniente do Statistica

ANEXO D

Os valores dos coeficientes das variáveis concentração, temperatura e pH, que são representadas por X1, X2 e X3 respectivamente, são apresentados na Tabela 07, proveniente do software Statistica.

N=16	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(6)	p-level
			69,54055	15,04558	4,62199	,003608
			,34297	16,31424	,02102	,983909
X1	,2202	10,47619	,58052	16,31424	,03558	,972769
X2	,3728	10,47619	56,37371	16,81636	3,35231	,015375
X3	35,6805	10,64356	,00000	16,81652	,00000	1,000000
X1X2	,0000	,22090	,25000	16,81652	,01487	,988621
X1X3	,0033	,22090	,50000	16,81652	,02973	,977245
X2X3	,0066	,22090	,00093	,15615	,00593	,995459
X1X1	,0622	10,47650	-,00116	,15615	-,00745	,994297
X2X2	-,0781	10,47650	-,54826	,16331	-3,35710	,015284
X3X3	-35,7326	10,64390				

ANEXO E

Resultados experimentais da taxa de hidrólise de lactose por β -galactosidase usando tampão fosfato. Estes valores não foram apresentados na tese devido a grande oscilação dos pontos experimentais, causada pelo uso do tampão inadequado para este ensaio.

ANEXO E

Resultados experimentais da taxa de hidrólise de lactose por β -galactosidase usando tampão fosfato

Tabela 0 : Taxa iniciais de hidrólise de lactose por β -galactosidase usando tampão fosfato.

Concentração	taxas iniciais
5	0,002565
10	0,005913
15	0,007255
20	0,009647
25	0,013719
30	0,015233
35	0,047886
40	0,015769
45	0,014446
50	0,019196
55	0,022397
60	0,028206
65	0,025488
70	0,024687
75	0,028301
80	0,026985
85	0,034506
90	0,033699
95	0,036342
100	0,032557

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, P. et al Use of Novel Immobilized β -galactosidase Reactor to Hydrolyse the Lactose Constituent of Skim Milk, *Biotechnology and Bioengineering* 36, p293-308, 1990.
- AXELSSON, A & ZACCHI, G. Economic Evaluation of the Hydrolysis of Lactose Using Immobilized β -galactosidase *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25, pg 679-693, 1990.
- BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2 ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BAKKEN, A. P. & HILL, C. G. Use of Novel Immobilized β -Galactosidase Reactor to Hydrolyze the Lactose Constituent of Skim Milk. *Biotechnology Bioengineering* 36, p293-309, 1990.
- BEDDOWS, C. G. & MIRAUER, R. A. Immobilization of β -Galactosidase and Other Enzymes onto p-Amino-Carbanilated Celulose Derivatives, *Biotechnology and Bioengineering* 22, p311-321, 1980.
- BÓDALO, A. et al. A Comparison of Different Methods of β -Galactosidase Immobilization, *Process Biochemistry* 26, p349-353, 1991.
- BOX, G. E. P; HUNTER, G. W; HUNTER, J. S. " Statistics for Experimenters", An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. New York, John Wiley & Sons, 1978.
- CABRAL, J. M. S, Estudos de Imobilização de Enzimas pelo Método dos Metais de Transição, Lisboa, 1982. (Tese de Doutorado, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa).
- CHEN, J. P. & WANG, C. H. Lactose Hydrolysis by β -Galactosidase in Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, n° 3, p168-175, 1991.
- COUTINHO, F, U. Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre. Uberlândia. 1996. (Dissertação de Mestrado, UFU).
- FLORES, M. V. et al, Effect of Monovalent Cations on the Stability and Activity of Kluyveromyces lactis β -galactosidase, *Lebensmittel-Wissenschaft*, p503-506, 1996
- GEKAS, V. & LEIVA, L. Hydrolysis of Lactose: a Literature Review. *Process Biochemistry*, Ricknansworks 20, p2-12, 1985.
- GREENBERG, N.A. & MAHONEY, R. R. Immobilisation of Lactase (β -Galactosidase) for use in Dairy Processing : A Review. *Process Biochemistry*, Feb/March 1981.
- HÄGERDAL, B. H. Comparison between Immobilized Kluyveromyces fragilis and Saccharomyces cerevisiae Coimmobilized with β -Galactosidase, with Respect to Continuous Ethanol Production from Concentrated Whey Permeate *Biotechnology and Bioengineering* 27, p914-916, 1985
- HENG, M. H. & GLATZ, C. E. Ion Exchange Immobilization of Charged β -Galactosidase Fusions for Lactose Hydrolysis, *Biotechnology Bioengineering* 44, p745-752, 1994.
- HENLEY, J. & SADANA, A Categorization of Enzyme Deactivations Using a Series-Type Mechanism, *Enz. Microb. Technol.* 7; p50-60, 1985
- HILL, C. G. An Introduction to Chemical Engineering Kinetics & Reactor Design. New York, J. Wiley, 1977.
- KENNEDY, J.F; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization- in Biotechnology, vol 7ª Ed. REHM, H. J; REED, G. ; VCH Publishers, New York, p 347-404, 1987.
- MAHONEY, R. R; ADAMCHUK, C. Effect of Milk Constituents on the Hydrolysis of Lactose by Lactase from kluyveromyces fragilis, *Journal of Food Science*, 45 p962-964, 1980.

- MATIOLI, G. et all. Beta Galactosidase de Kluyveromyces fragilis Estabilidade Operacional, 10° Congresso Brasileiro de Engenharia Química 2, p1308-1311, 1994.
- MAZZOBRE, M. F. et all. Glass Transition and Thermal Stability of Lactase in Low-Moisture Amorphous Polymeric Matrices. Biotechnol. Prog 13, p195-199, 1997.
- MONSAN, P. Optimization of Glutaraldehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization, Journal of Molecular Catalysis 3. P371-384, 1977/78.
- OLSON, A. C. & STANLEY, W. L. Lactase and Other Enzymes Bound to a Phenol-Formaldehyde Resin With Glutaraldehyde. J. Agr. Food Chem, 21, nº 3, 1973.
- PAPAYANNAKOS, N. et all. Studies on Modelling and Simulation of Lactose Hydrolysis by Free and Immobilized β -Galactosidase from Aspergillus niger. Engineering Journal 52, B1-B12, 1993.
- PERRY, J. H. Chemical Engineers' Handbook. 4 ed. McGraw-Hill Company, 1963.
- PUBLICAÇÃO da NOVO NORDISK, Enzyme Process Division, Bioindustrial Group.
- REED, G. & NAGODAWITHANA, T. Enzymes in Food Processing. 3 ed. New York Academic Press, 1993.
- RIBEIRO, E. J. Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase livre e Imobilizada. Campinas. 1989. (Tese de Doutorado, FEA, UNICAMP).
- ROGALSKI, J. et all. Lactose Hydrolysis in Milk by Immobilised β -Galactosidase. Journal of Molecular Catalysis 93, p233-245, 1994.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York, John Wiley, 1993.
- SUNGUR, S. & AKBULUT, U. Immobilisation of β -Galactosidase onto Gelatin by Glutaraldehyde and Chromium (III) Acetate. J. Chem. Tech. Biotechnol. 59, p303-306, 1994.
- TREVISAN, H. C. et all. Estudo da Imobilização de β -Galactose em Sílica de Porosidade Controlada, XI SINAIFERM, p48-53, 1996.
- WEETALL, H. H. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. Meth. Enzymol, 44, p134-148, 1976.
- WEETALL, H. H. et all. Scale-Up Studies on Immobilized Purified Glucoamylase Covalently Coupled to Porous Ceramic Support, Methods in Enzymol 44, p776-809, 1976.