
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS EXPERIMENTAIS DISCUSSÃO

4.1 – Atividade da β -galactosidase empregada no trabalho

Por meio dos resultados de velocidades iniciais de reações de hidrólise de lactose, determinados em triplicata conforme item 3.3, obtidos a 35°C, usando como substrato uma solução de lactose de concentração 50g/L, em tampão acetato pH 4,5, obteve-se uma atividade média de 1,94 U_L (gramas de glicose formada por litro por minuto de reação por miligrama de proteína).

O teor de proteína, determinado pelo método de Lowry conforme o item C.2 do Anexo C, foi de 0,140g/L de proteína para a enzima diluída a 1% em tampão acetato.

4.2- Resultados para a enzima livre

4.2.1 – Influência do pH na atividade da β -galactosidase livre

Sabe-se que alterações no pH afetam a estabilidade das enzimas, sendo que a sua maioria apresenta uma forte dependência do pH com relação à atividade. A influência do pH na atividade de β -galactosidase livre, determinada conforme itens 3.3 e 3.4.1, está apresentada na Figura 4.1. Observa-se que na faixa de pH estudada de 3,0 a 6,0, o pH 4,8 foi o valor que apresentou maior atividade e encontra-se na faixa de estabilidade da enzima (item 4.2.4). Como a diferença de atividade para o valor de 4,5 em relação ao pH de 4,8 foi muito pequena (de aproximadamente 1,2%), optou-se por trabalhar com pH 4,5, que é também o pH recomendado pelo fabricante da enzima. Observa-se que a partir do pH 4,8, a queda na atividade enzimática foi em torno de 12,14% para o pH 5 e em torno de 30% para o pH de 5,3 chegando a uma queda de 47% para o pH 6. A faixa de pH ótimo citada na literatura para esta enzima varia de 4,5 a 5 (GREENBERG e MAHONEY, 1981, GEKAS e LÓPES-LEIVA, 1985, PIVARNIK *et al.* 1995, ATES e MEHMETOGLU, 1997, EL-MASRY *et al.* 2001, TANRISEVEN e DOGAN 2002, PRASHANTH e MULIMANI 2005, GAUR *et al.* 2006,

HAIDER e HUSAIN, 2007) o que foi confirmado neste trabalho. A partir destes resultados, adotou-se como pH operacional 4,5.

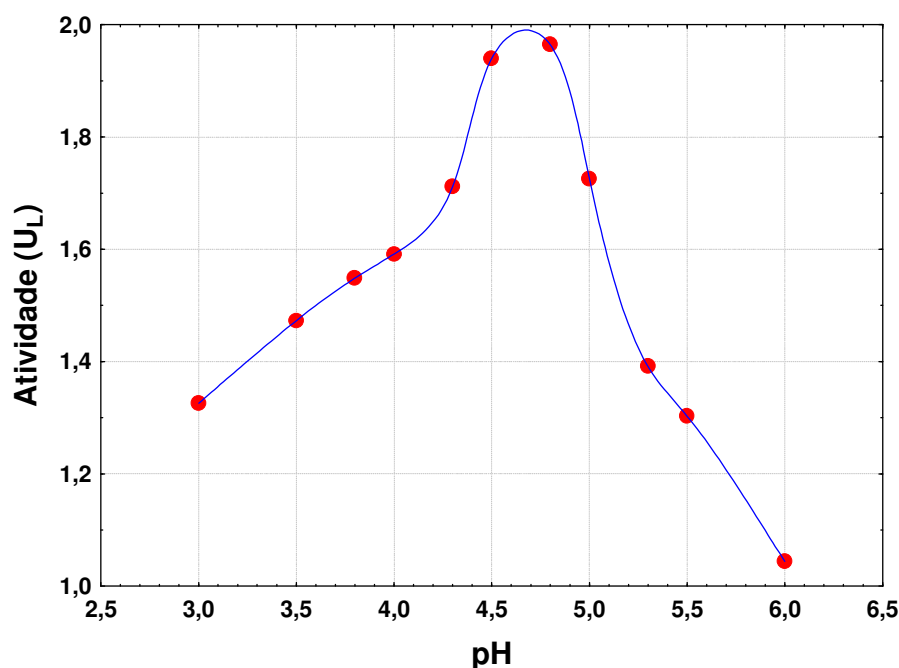


Figura 4.1 - Influência do pH na atividade da β -galactosidase livre.

4.2.2 - Influência da temperatura na atividade da β -galactosidase livre

Os resultados obtidos para a influência da temperatura na atividade de β -galactosidase livre, determinada conforme itens 3.3 e 3.4.1, estão apresentados na Figura 4.2. Observa-se que para a faixa de temperatura estudada, de 10 a 70°C, a etapa de ativação térmica se dá no intervalo de 10 a 55°C onde a temperatura de maior atividade foi de 55°C. A faixa de temperatura de máxima atividade enzimática citada na literatura para a enzima livre varia de 50 a 60°C (GREENBERG e MAHONEY, 1981, GEKAS e LÓPES-LEIVA, 1985, PIVARNIK *et al.* 1995, ATES e MEHMETOGLU, 1997, EL-MASRY *et al.* 2001, TANRISEVEN e DOGNA, 2002, PRASHANTH e MULIMANI 2005, GAUR *et al.* 2006, HAIDER e HUSAIN, 2007), o que foi confirmado neste trabalho. Observa-se que a atividade da enzima cai aproximadamente 14% quando a temperatura aumenta de 55°C a 60 °C, chegando a uma queda de 53% para 65°C, ficando completamente inativa a 70°C.

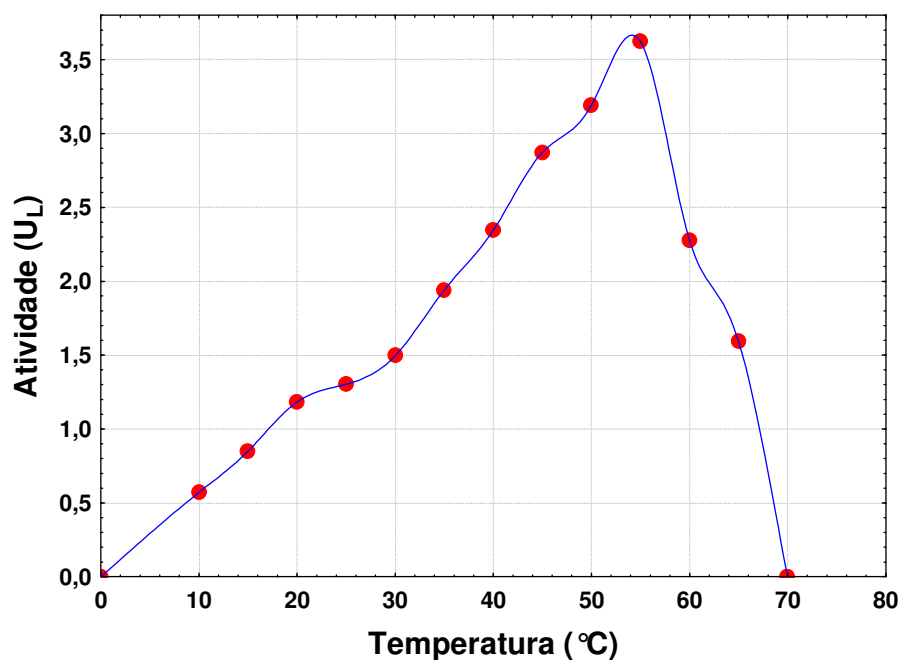


Figura 4.2 - Influência da temperatura na atividade da β -galactosidase livre.

Utilizando os resultados obtidos para a etapa de ativação térmica (10 a 55°C) na atividade enzimática em função da temperatura, foi determinada a energia de ativação da reação de hidrólise utilizando a Equação 4.1:

$$\ln A = \ln A^* - \frac{Ea}{RT} \quad (4.1)$$

A Figura 4.3 ilustra o cálculo da energia de ativação. O ajuste linear utilizando o *software Statistica 7.0* alcançou coeficiente de determinação de 98,89% e está representada na Equação 4.2.

$$\ln A = 11,9711 - 3,4841 \cdot \frac{1}{T} \quad (4.2)$$

A energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase na forma livre à pH 4,5 e 50g/L de substrato, foi calculada a partir da Equação 4.2, tendo encontrado o valor de 6,9 kcal/mol. O valor encontrado na literatura por EL-MASRY *et al.* (2001) foi de 8,8 kcal/mol para a enzima β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre determinado a pH 6,5 em tampão fosfato utilizando lactose a 68,4g/L.

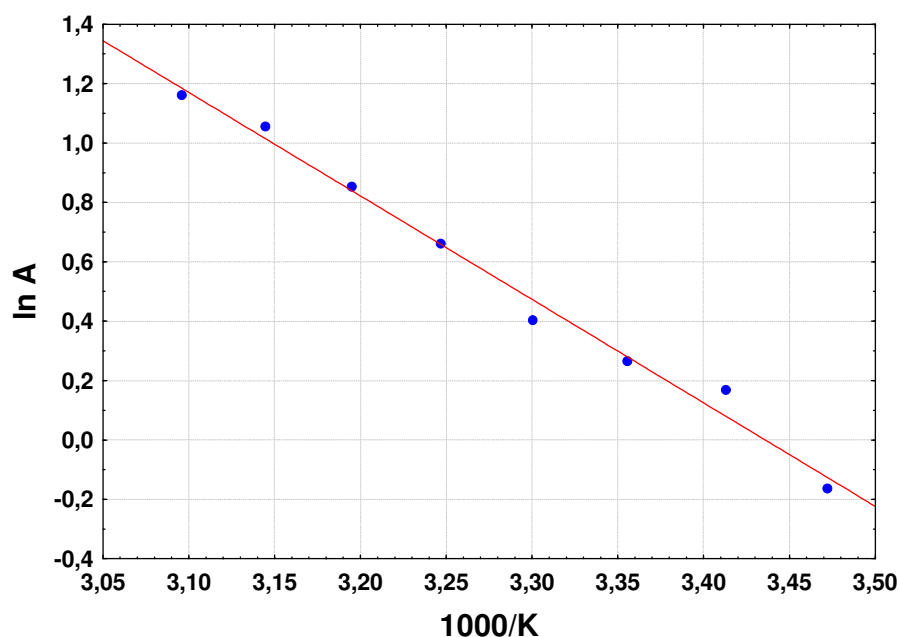


Figura 4.3 – Cálculo da energia de ativação térmica.

4.2.3 – Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase livre

Os resultados experimentais de velocidades iniciais de reação de hidrólise de lactose, em função da concentração inicial de substrato, na ausência de produtos da reação, obtidos a 35°C em tampão acetato a pH 4,5 com a enzima diluída a 1% (p/v), conforme item 3.4.2 são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Velocidades iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para a enzima na forma livre.

Concentração de substrato (g/L)	Atividade obtida (U_L)
0	0
10	0,814
20	1,174
25	1,317
30	1,584
40	1,695
50	2,124
60	2,026
70	2,223
80	2,123
90	2,049

A Figura 4.4 compara os resultados experimentais obtidos no estudo da influência do substrato na atividade enzimática com os ajustados pelo modelo. Através de uma regressão não linear, realizada pelo o *software Statistica 7.0*, utilizando o método numérico de Levenberg-Marquardt (MORE, 1977), estimou-se os valores de V_m e K_m que foram respectivamente 2,56 U_L e 17,83 g/L (52,13 mM) sendo que ambos parâmetros apresentaram-se significativos ao nível de 5% (valor-p < 0,05), apresentando soma dos quadrados dos desvios ($\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$) o valor de 0,18. Observa-se boa aproximação dos pontos experimentais com o ajustado pelo modelo de Michaelis-Menten conforme ilustra a Figura 4.4, no qual foi obtido coeficiente de determinação de 96,16%. Portanto a equação final de Michaelis-Menten está representada na Equação 4.3:

$$v = \frac{2,56 * S}{17,83 + S} \quad (4.3)$$

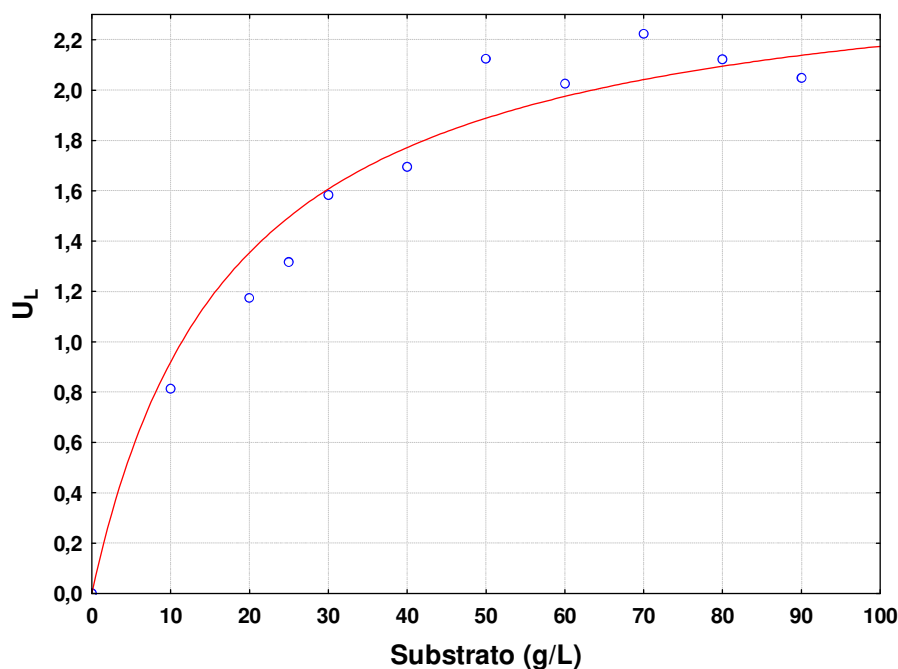


Figura 4.4 - Influência da concentração de substrato na atividade da β -galactosidase livre.

A Figura 4.5 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.6, a representação dos valores preditos em função dos observados. Observando a Figura 4.5, vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.6, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação de Michaelis-Menten, o que justifica o bom resultado obtido para o coeficiente de determinação.

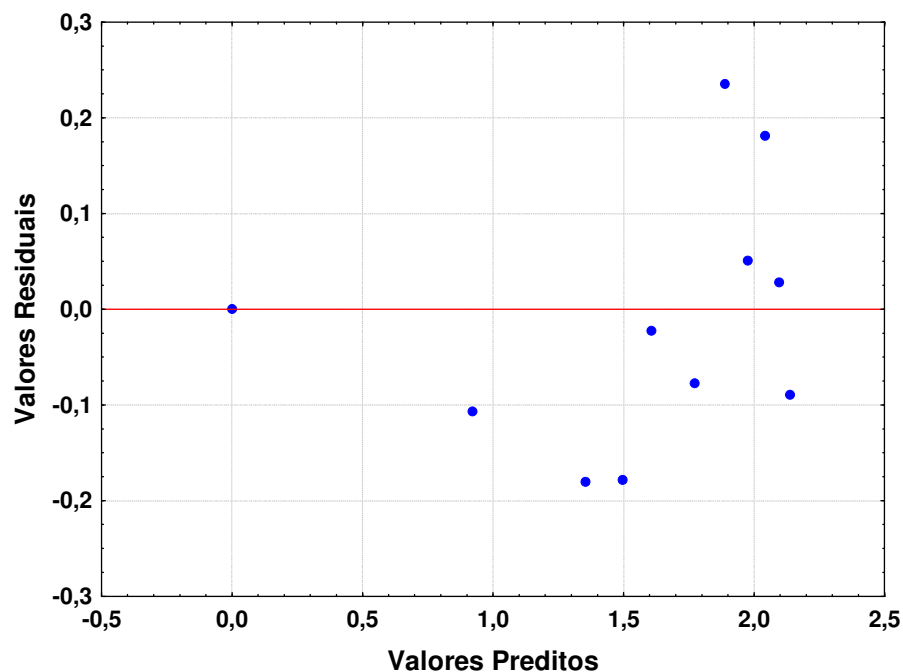


Figura 4.5 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

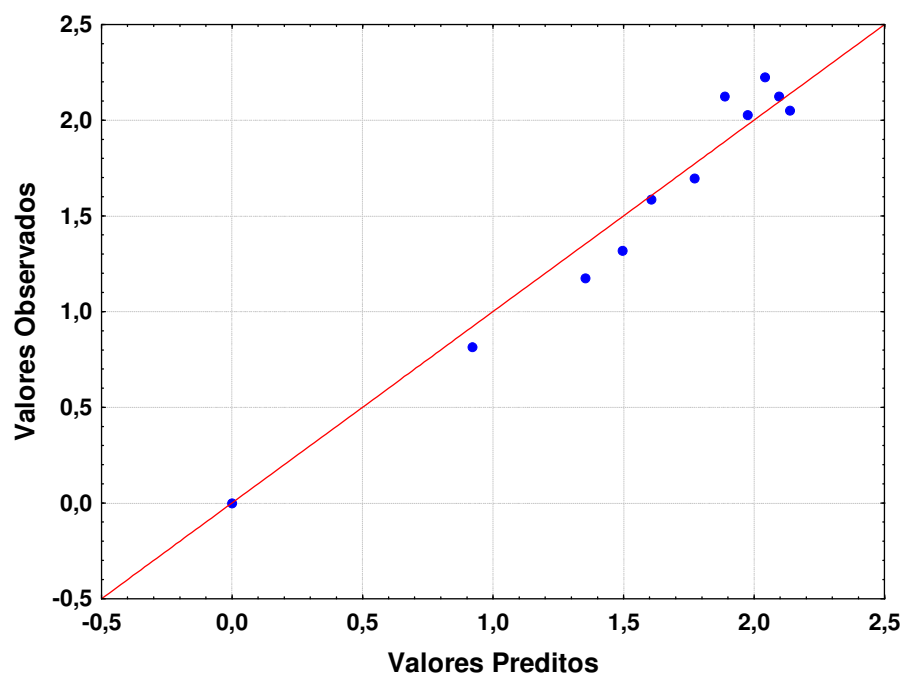


Figura 4.6 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

O valor obtido neste trabalho para K_m foi maior que alguns valores encontrados na literatura para a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma solúvel, exceto para PETERSON *et al.* (1989) que encontraram um valor de K_m de 52 mM. Por exemplo, no trabalho de TANRISEVEN e DOGAN (2002), foi encontrado para K_m o valor de 42 mM, ,

EL-MASRY *et al.* (2001) encontraram um valor inferior aos anteriores de 21,4 mM determinado a temperatura de 25°C, fator este que possa estar influenciando na diminuição do valor deste parâmetro. No trabalho de GAUR *et al.* (2006), obteve-se o valor de 2,63 mM utilizando Orto-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) como substrato.

4.2.4 – Estudo da estabilidade da enzima livre com relação ao pH

Na Figura 4.7 são representadas as atividades relativas, A_i/A_0 , definidas pela relação entre a atividade após 18 horas de incubação a diferentes valores de pH e a inicial (feita no pH ótimo), usada como referência, conforme item 3.4.3.

Observa-se que as atividades das amostras mantiveram-se praticamente estáveis na faixa de pH de 4,5 a 7 com relação à atividade inicial (A_0), a pH 4,5. Observa-se que para o pH de maior atividade enzimática, 4,8 (pH ótimo), a relação A_i/A_0 é praticamente 1, ou seja, para esse pH, após 18 horas de incubação a 35°C, não se verificou perda de atividade.

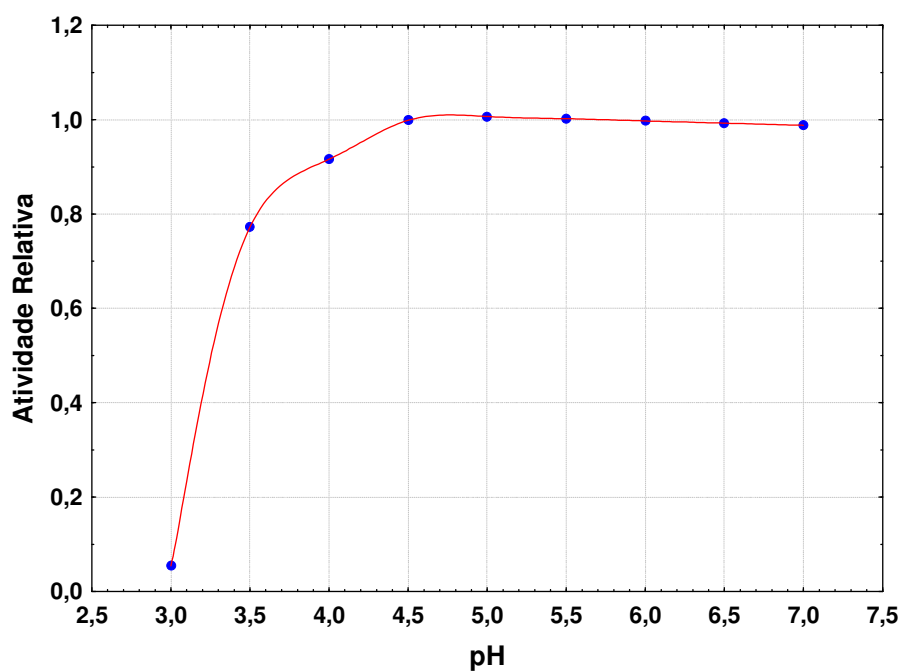


Figura 4.7 - Estabilidade da enzima livre com relação ao pH

No trabalho de HATZINIKOLAOU *et al.* (2005), foi verificado que a atividade de β -galactosidase de *Aspergillus niger* manteve-se constante no intervalo de pH de 3,0 a 6,0.

4.2.5 – Estudo da estabilidade térmica da enzima livre

A influência da temperatura na estabilidade da lactase na sua forma solúvel foi estudada conforme item 3.4.4. As atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas, estão apresentadas nas Figuras 4.8 e 4.9.

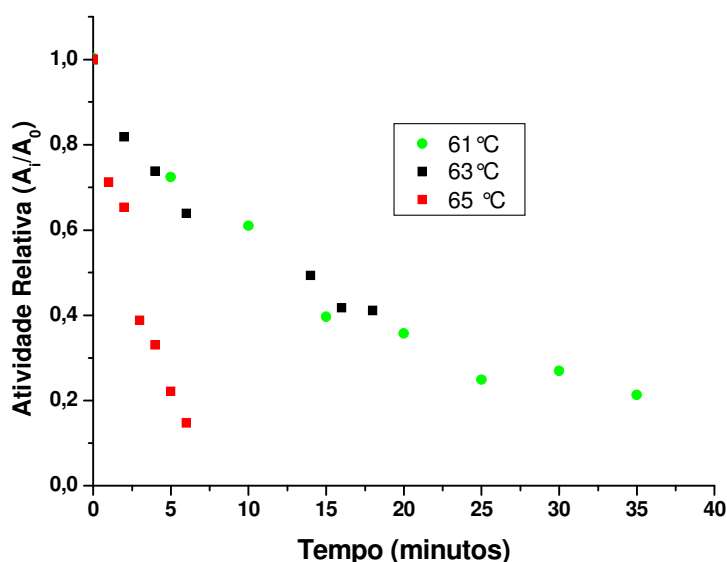


Figura 4.8 – Atividade relativa (A_i/A_0), em função do tempo, para as temperaturas de 65, 63 e 61°C.

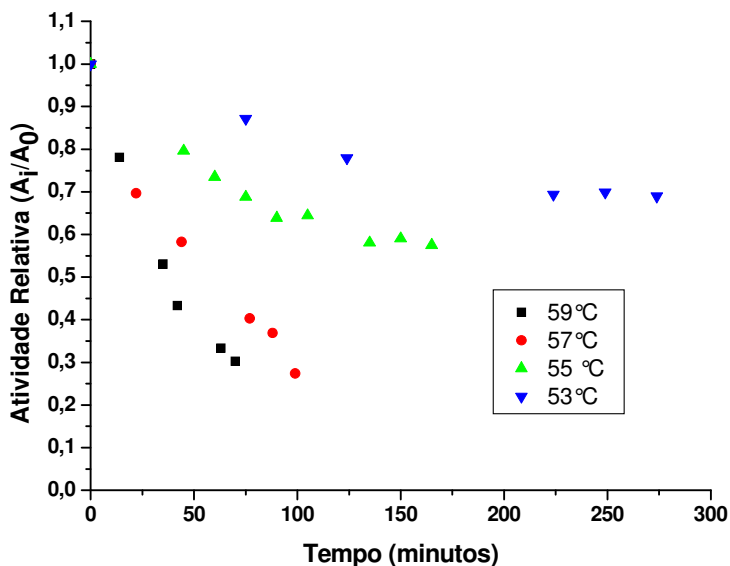
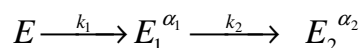


Figura 4.9 – Atividade relativa (A_i/A_0), em função do tempo, para as temperaturas 59, 57, 55 e 53°C.

Uma análise das Figuras 4.8 e 4.9 evidencia a forte dependência da estabilidade da enzima solúvel em relação à temperatura. Observa-se que para a temperatura de 65°C ocorreu

uma rápida desnaturação da enzimática. Já para a temperatura de 53°C observa-se que após 275 minutos, a enzima perdeu 31,1% de sua atividade.

Os resultados de atividade relativa em função do tempo de incubação, às várias temperaturas estudadas foram analisados segundo um modelo de desativação em série com dois estágios (HENLEY e SADANA, 1985), conforme modelo apresentado a seguir:



As Equações 3.1, 3.2 e 3.3 apresentadas no item 3.4.4 são representativas do mecanismo de desativação dado pelo modelo acima e os seus parâmetros cinéticos foram ajustados por regressão não-linear. Para as temperaturas de 53 a 65°C as Equações 3.1, 3.2 e 3.3 foram ajustadas por regressão não-linear utilizando o *software Statistica 7.0*, pelo método Quasi-Newton (BISHOP, 1975) que possui como critério de otimização o método dos mínimos quadrados ou pelo método de Levenberg-Marquardt (MORE, 1977), que utiliza o critério iterativo de convergência para ajuste de parâmetros. Optou-se por utilizar apenas estes dois métodos numéricos de estimativas de parâmetros neste trabalho por serem os mais citados na literatura. As Tabelas 4.2 a 4.8 e as Figuras 4.10 a 4.28 ilustram os resultados obtidos para cada temperatura, o método numérico utilizado, o melhor ajuste com os coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios, os respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10%. Como critério de escolha de ajuste, optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos dados experimentais, adotando inicialmente o modelo que apresentasse significado físico dos parâmetros coerentes com o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor de soma de quadrado dos desvios. Observa-se nas Tabelas 4.2 a 4.8 que o método numérico adotado para a Equação 3.3 foi o método de Quasi-Newton, pois não foi possível ajustar os resultados pelo método de Levenberg Marquart. Na Tabela 4.2 são apresentados os ajustes dos parâmetros a 65°C.

Tabela 4.2 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 65°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,2881 - 0	-----	----	-----	97,8%	0,0122
Eq3.2	Levenberg	0,2311 0,014	-----	-0,1343 0,488	-----	98,13%	0,0105
Eq3.3	quasi	0,2391	-0,1239	-0,059	-0,0118	98,17%	0,0103

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa, representados por pontos e os preditos pelos 3 modelos, Equações 3.1, 3.2 e 3.3 estão representados na Figura 4.10.

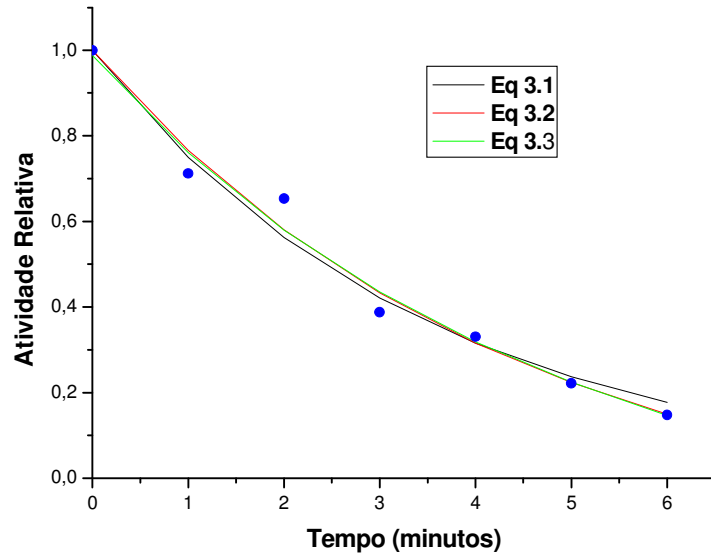


Figura 4.10 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 65°C.

Analisando a Figura 4.10 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos pelos 3 modelos. Observa-se pela Tabela 4.2, que todos os 3 ajustes apresentaram um bom valor para os parâmetros estatísticos (coeficiente de determinação (R^2) e a soma de quadrados dos desvio). Observa-se que para a Equação 3.3, foi obtido valores negativos para os parâmetros k_2 , α_1 e α_2 (HENLEY e SADANA, 1985) o que não condiz com o significado físico dos mesmos. A Equação 3.2 apresentou o valor do parâmetro α_1 negativo com valor-p maior que 10% tornando-o não significativo pelo teste *t-Student*. Com isto, somente a Equação 3.1 foi ajustada com parâmetros físicos significativos, mesmo apresentando entre os 3 ajustes o menor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a maior soma de quadrados dos desvio, ou seja, o modelo de desativação de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste com significados físicos dos parâmetros coerentes. O ajuste com a Equação 3.1 apresentou coeficiente de determinação igual a 97,8% e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0122. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.4.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,2881) t} \quad (4.4)$$

A Figura 4.11 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.12 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

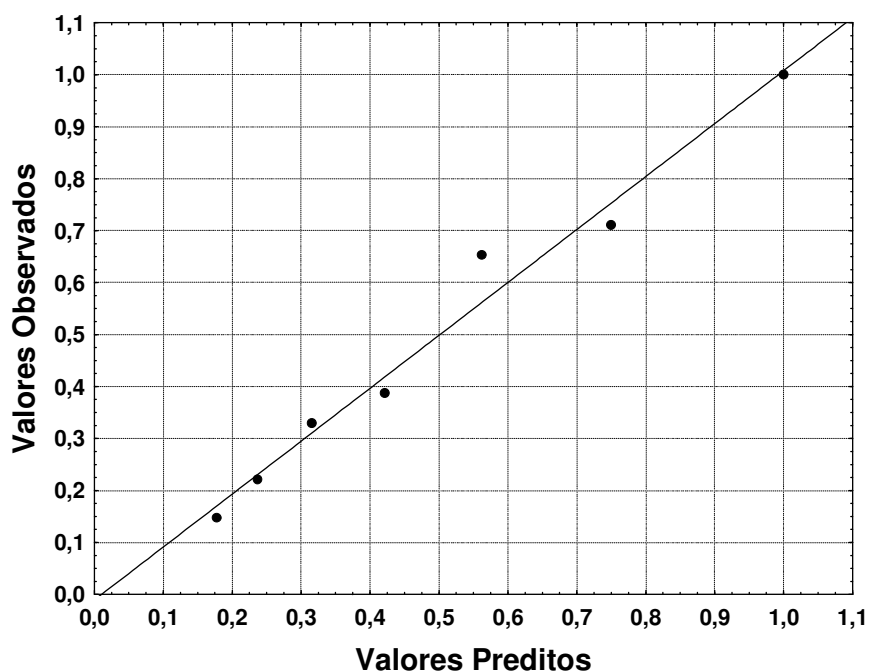


Figura 4.11 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

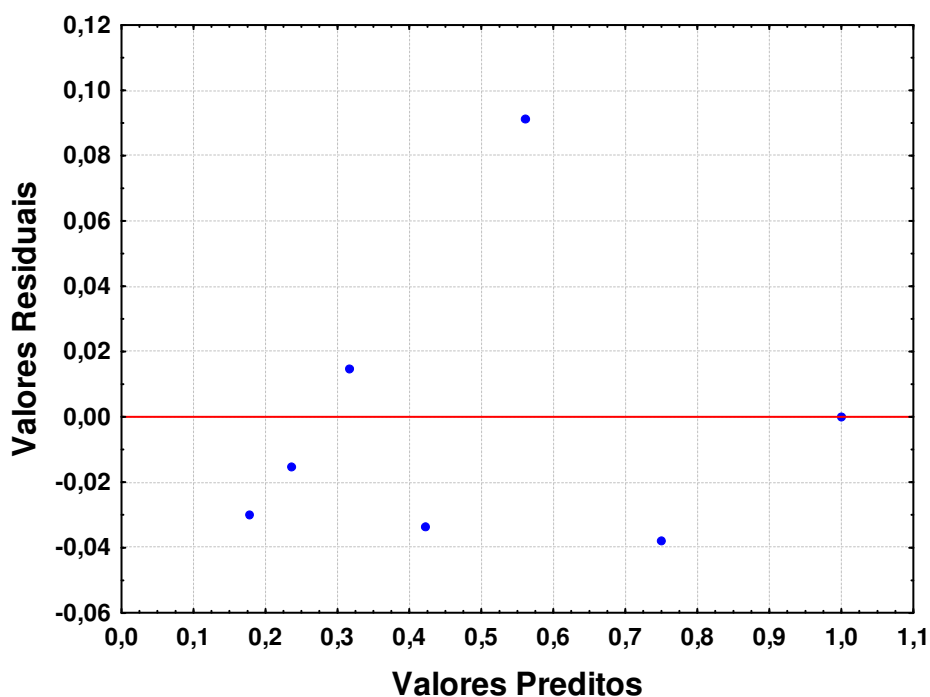


Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando a Figura 4.11 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos ao fornecido pela equação empírica, fato este justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação. Na Figura 4.12 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do

zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição o que tornaria o ajuste não adequado.

Na Tabela 4.3 são apresentados os ajustes dos parâmetros para temperatura de 63°C.

Tabela 4.3 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 63°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0595 0	-----	----	-----	90,9%	0,027
Eq3.2	Levenberg	0,1419 0	-----	0,3723 0	-----	99,14%	0,0025
Eq3.3	quasi	0,0581 -----	477813,9 ----	-264,289 -----	-0,0186 -----	93,7%	0,0183

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.13.

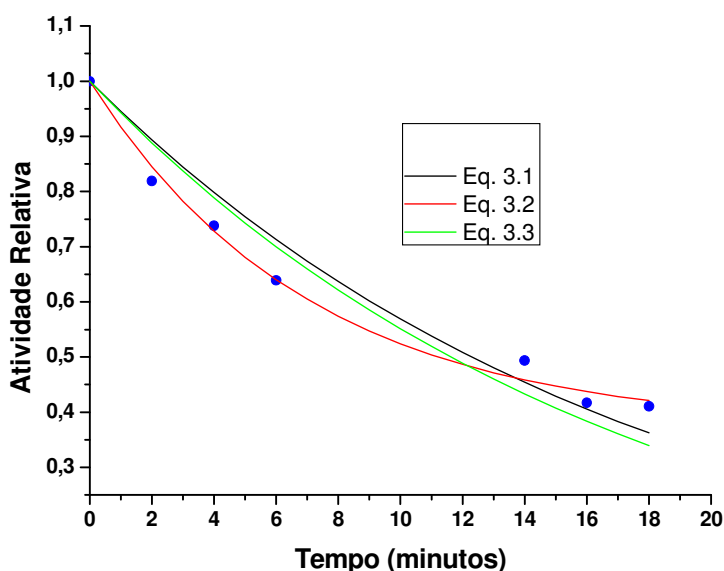


Figura 4.13 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 63°C.

Analisando a Figura 4.13 e a Tabela 4.3, verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos para o modelo da Equação 3.2. Para temperatura de 63°C foi possível ajustar as Equações 3.1 e 3.2 com parâmetros significativos e fisicamente coerentes. Comparando os parâmetros estatísticos obtidos pelas duas equações, observa-se que o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor quadrado dos desvios foi obtido no ajuste da Equação 3.2, o que descartou o modelo de desativação de primeira ordem ajustado pela Equação 3.1. O ajuste com a Equação 3.2 apresentou coeficiente de determinação igual a 99,14% e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0025. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.5.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,3723).e^{(-0,1419)t} + 0,3723 \quad (4.5)$$

Observando a Tabela 4.3 o valor do parâmetro α_1 obtido para a Equação 3.3 apresentou valor negativo, onde o máximo valor permitido é igual a 1 (a razão entre atividade específica entre o estágio final e inicial pode ser no máximo igual fazendo com que a razão se torne no máximo igual a 1). Já o valor de k_1 , apresentou valor extremamente alto, o que não condiz com a coerência do significado físico do modelo.

A Figura 4.14 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.15 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

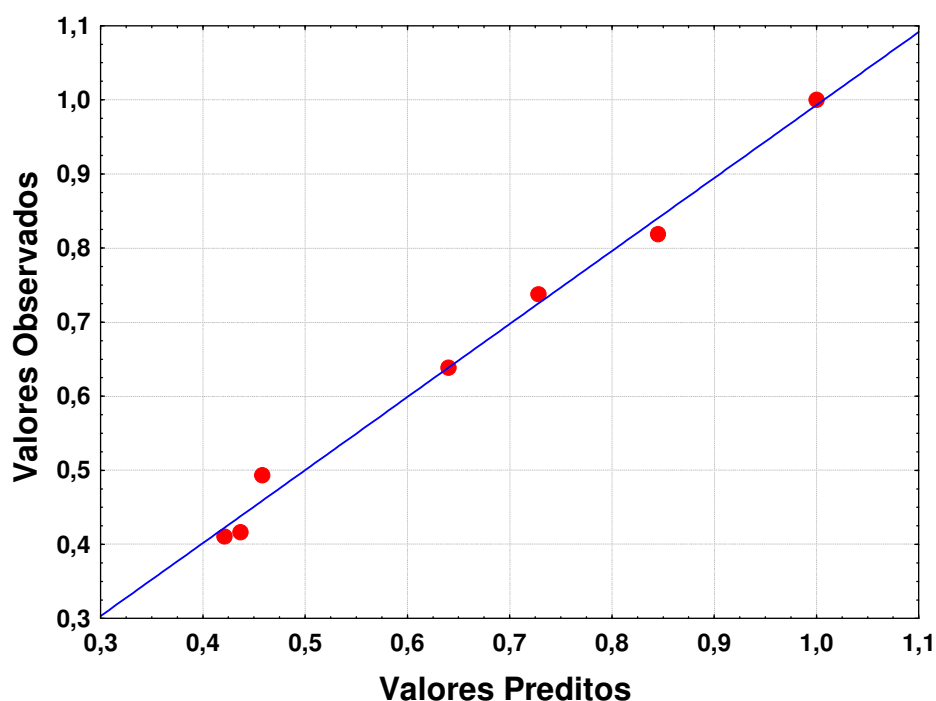


Figura 4.14- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

Observando a Figura 4.14 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.15 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

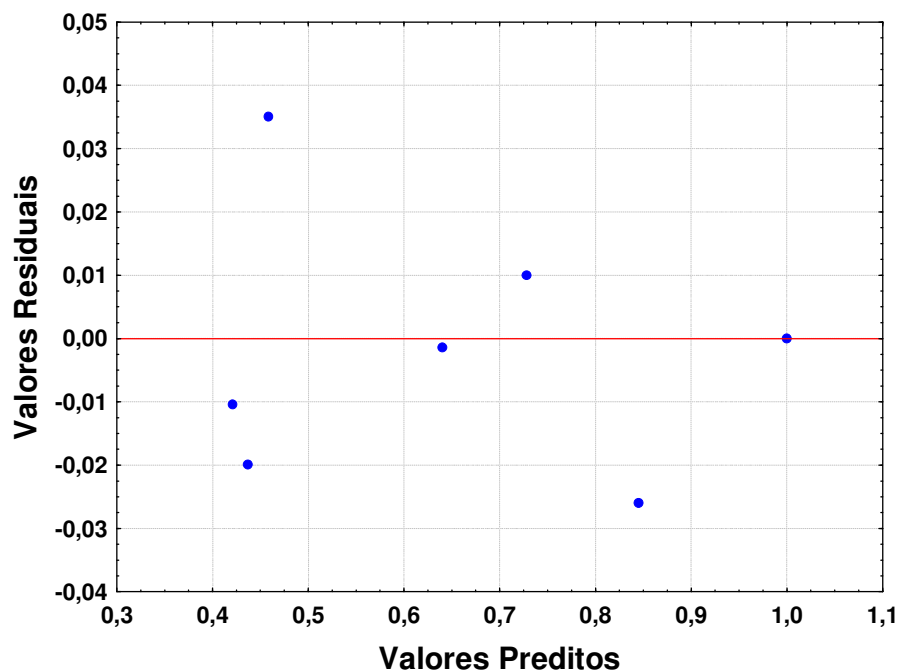


Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.4 são apresentados os ajustes dos parâmetros da temperatura de 61°C.

Tabela 4.4 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 61°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0519 0	-----	----	-----	97,59%	0,0129
Eq3.2	Levenberg	0,0721 0	-----	0,1435 0,019	-----	98,8%	0,0064
Eq3.3	quasi	0,0564 -----	22,669 ----	2,9074 -----	0,0365 -----	97,7%	0,0121

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.16.

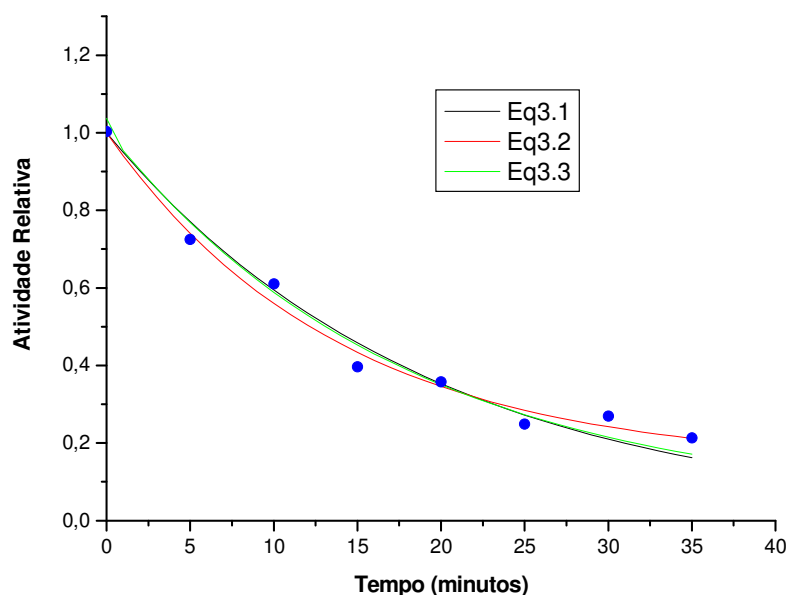


Figura 4.16 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 61°C.

Analisando a Figura 4.16 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos para os 3 modelos. Para temperatura de 61°C foi possível ajustar as Equações 3.1 e 3.2 com parâmetros significativos e fisicamente coerentes. Comparando os parâmetros estatísticos obtidos pelas duas equações, observa-se que a Equação 3.2 apresentou melhor ajuste quando comparado com o modelo de desativação de primeira ordem devido ao menor valor da soma dos quadrados dos desvios e maior valor encontrado do coeficiente de determinação (R^2). O ajuste com a Equação 3.2 obteve coeficiente de determinação igual a 98,8% e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0064. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.6.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,1435) \cdot e^{(-0,0721)t} + 0,1435 \quad (4.6)$$

Observando na Tabela 4.4 os valores dos parâmetros obtidos para a Equação 3.3, o parâmetros α_1 apresentou valor maior que 1, e o valor k_2 apresentou valor extremamente alto, o que torna este ajuste não condizente com o significado físico do modelo.

A Figura 4.17 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.18 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.17 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.18 vê-se

que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

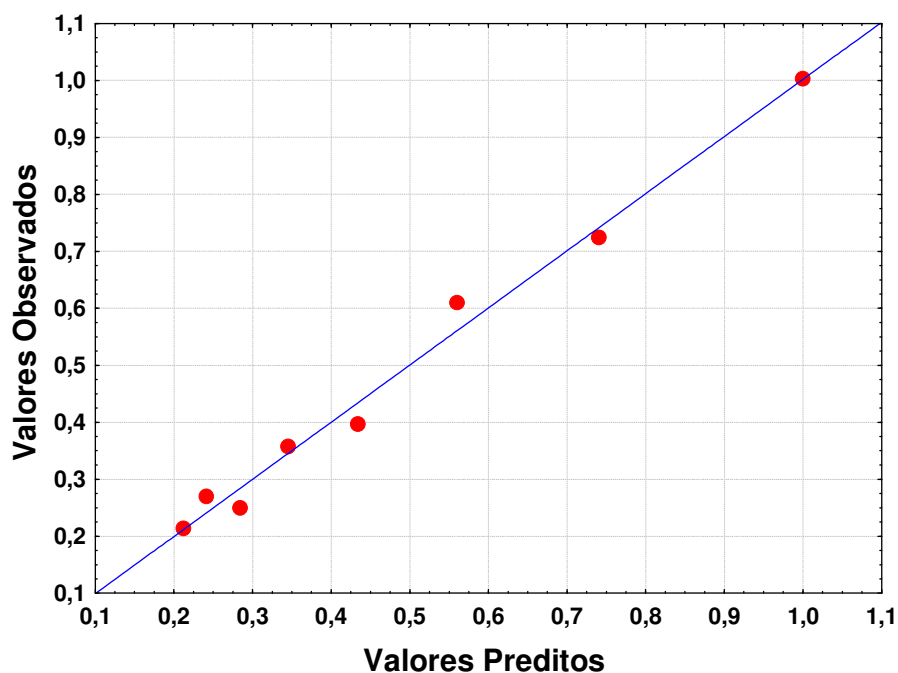


Figura 4.17- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

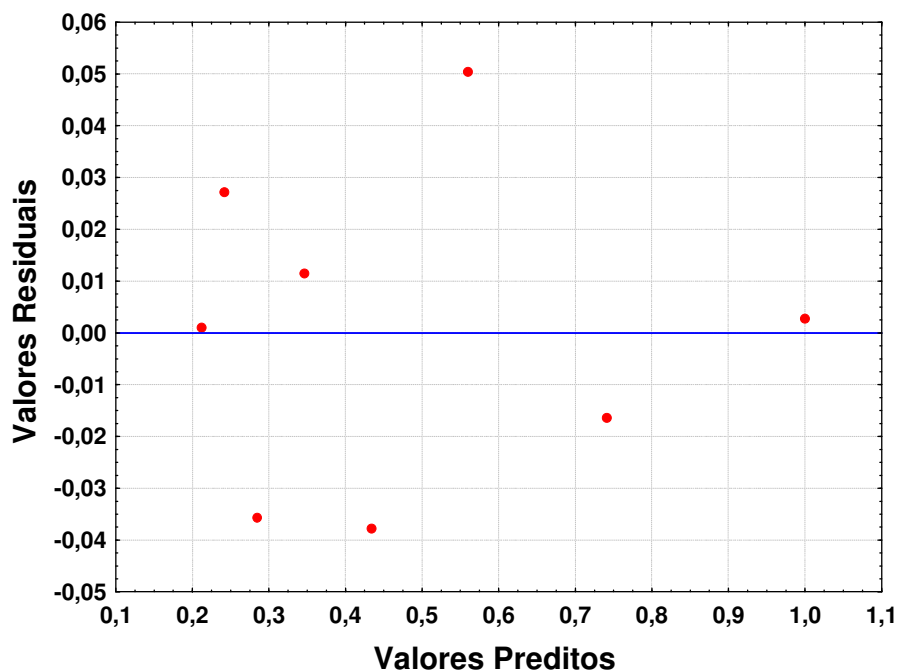


Figura 4.18 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.5 são apresentados os ajustes dos parâmetros para a temperatura de 59°C.

Tabela 4.5 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 59°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,018 0	-----	-----	-----	99,52%	0,0018
Eq3.2	Levenberg	0,0216 0,1819	-----	0,098 0,0013	-----	99,7%	0,0012
Eq3.3	quasi	0,0181 -----	26,0265 -----	0,0048 -----	-2,6581 -----	99,5%	0,0017

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.19.

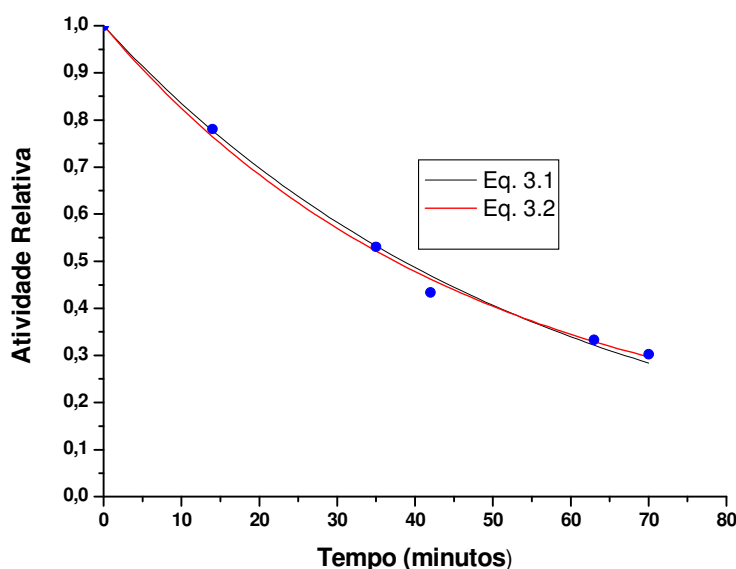


Figura 4.19 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 59°C.

Analisando a Figura 4.19 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos para apenas os modelos das Equações 3.1 e 3.2. Observando a Tabela 4.5 verifica-se que os melhores valores dos coeficientes de determinação e os menores valores da soma dos quadrados dos desvios foram obtidos nas Equações 3.2 e 3.3. A Equação 3.3, apresentou o parâmetro α_2 negativo e o valor de k_2 extremamente alto, tornando o ajuste para esta equação fisicamente incoerente, apesar dos parâmetros estatisticamente serem significativos. O parâmetro k_1 para a Equação 3.2 apresentou valor-p maior que 10%, ou seja, não significativo pelo teste *t-Student* tornando a utilização deste modelo inviável. Restou então, ajustar os dados experimentais ao modelo da Equação 3.1, da qual obteve-se coeficiente de determinação igual a 99,52% e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0018, valores menores quando comparados aos das outras 2 equações (99,7 e 99,5% para

Equação 3.2 e 3.3 respectivamente), mas estatisticamente alto. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.7.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,018) t} \quad (4.7)$$

A Figura 4.20 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.21 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.20 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.21 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

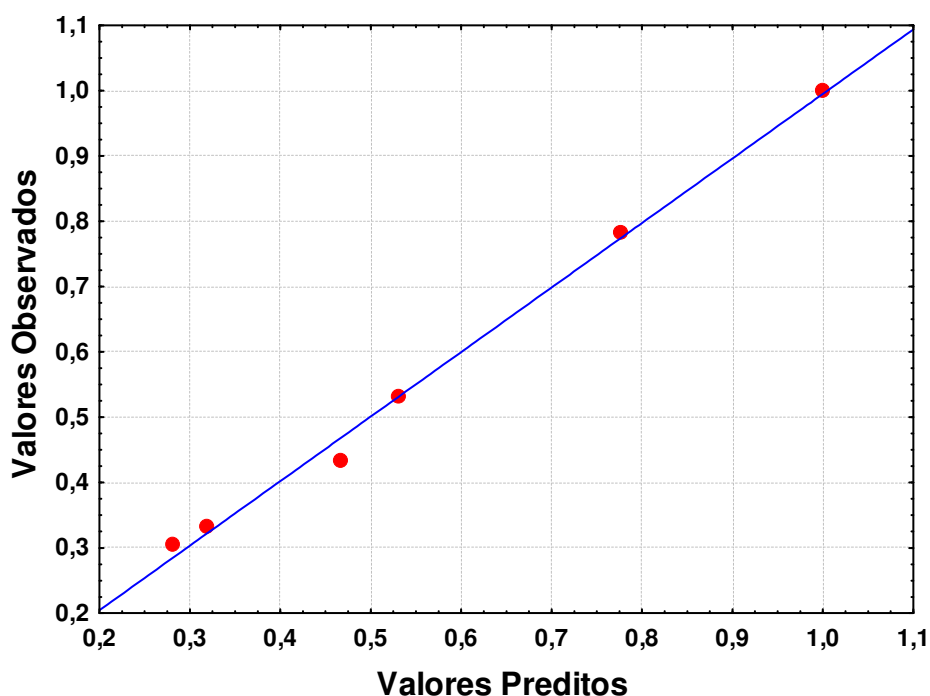


Figura 4.20- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

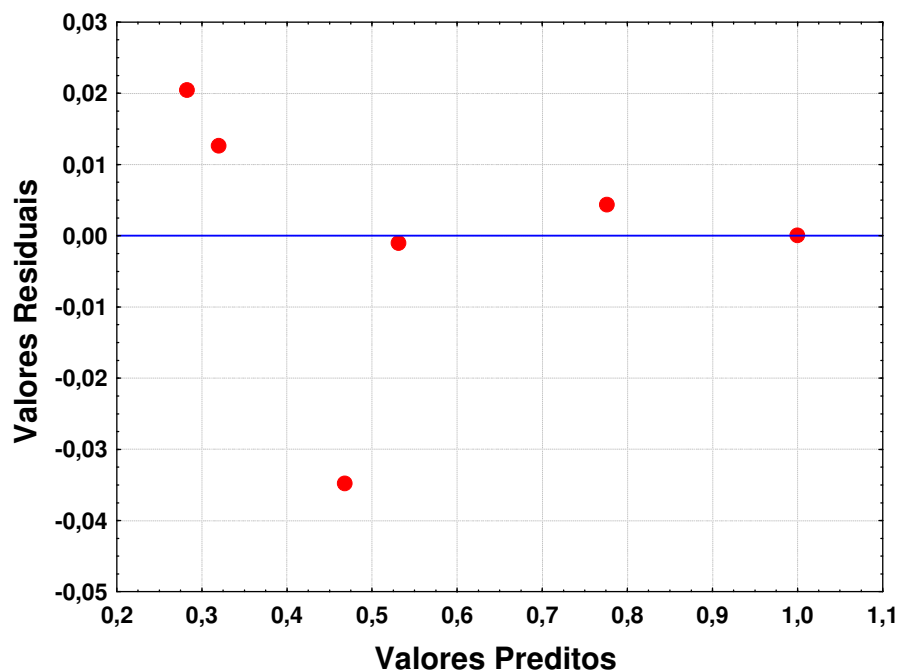


Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.6 são apresentados os ajustes dos parâmetros para a temperatura de 57°C.

Tabela 4.6 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 57°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0124 0	-----	----	-----	98,3%	0,0059
Eq3.2	Levenberg	0,016 0,015	-----	0,1438 0,2443	-----	98,65%	0,0047
Eq3.3	quasi	1,3496 -----	0,01068 ----	0,8965 ----	-0,00287 --	99,3%	0,0025

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos modelos estão representados na Figura 4.22.

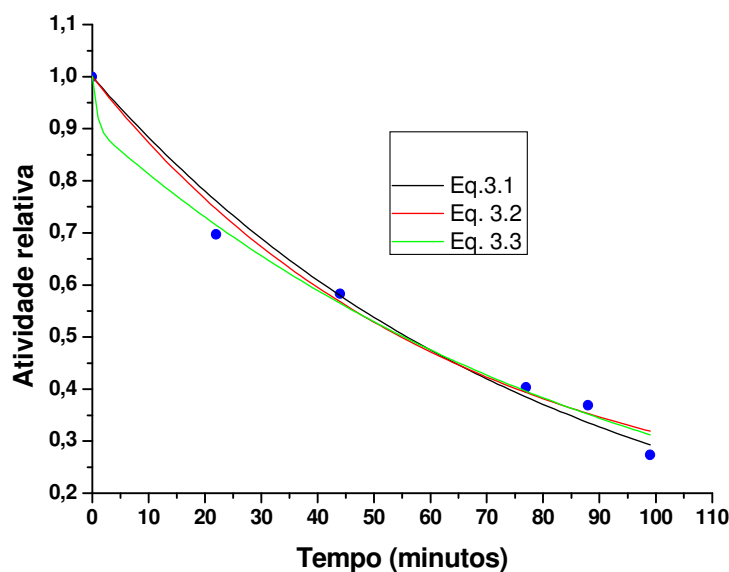


Figura 4.22 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 57°C.

Analisando a Figura 4.22 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos para os 3 modelos. Analisando os valores obtidos para os parâmetros na Tabela 4.5, a Equação 3.3 foi a que apresentou o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor da soma dos quadrados dos resíduos. Mas a sua utilização foi invalidada devido ao valor negativo α_2 . Entre os outros dois modelos, a Equação 3.2 apresentou menor valor da soma dos quadrados dos desvios e o maior valor do coeficiente de determinação, com parâmetros coerentes fisicamente mas não estatisticamente, pois o valor do parâmetro α_1 apresentou valor-p maior que 10% de acordo com o teste *t-Student* tornando-o não significativo estatisticamente. Portanto para esta temperatura, foi adotado o modelo de desativação de primeira ordem (Equação 3.1) cujos parâmetros estão representados na Equação 4.8.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0124) t} \quad (4.8)$$

A Figura 4.23 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.24 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.23 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.24 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

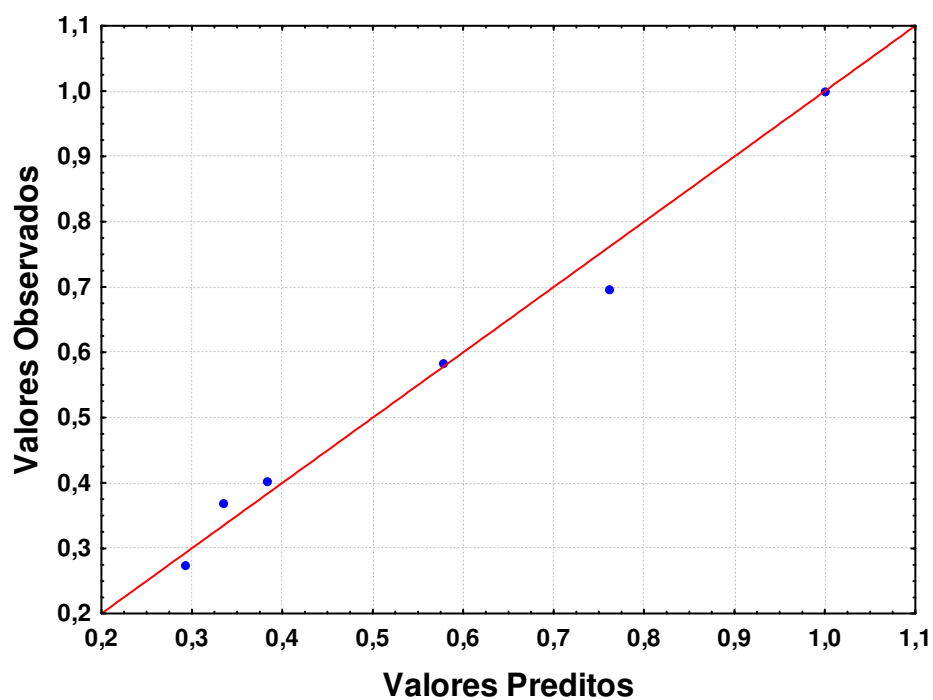


Figura 4.23- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

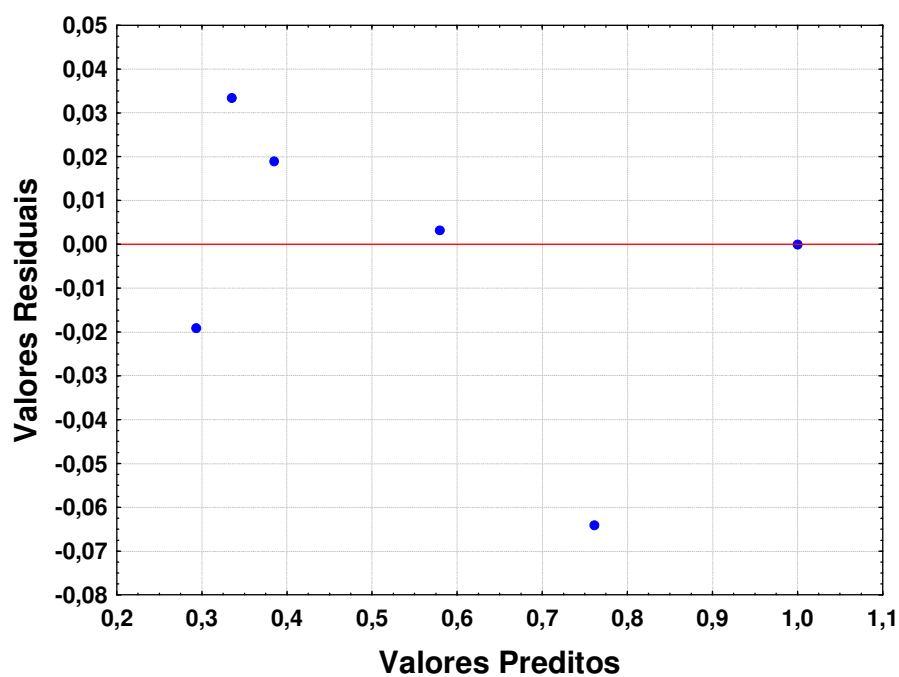


Figura 4.24–Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Na Tabela 4.7 são apresentados os ajustes dos parâmetros para a temperatura de 55°C.

Tabela 4.7 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55°C

	Método	k ₁ valor- p	k ₂ valor- p	α ₁ valor- p	α ₂ valor- p	R ²	Σ(V- V _{modelo}) ²
Eq1	Levenberg	0,004 0	-----	-----	-----	89,6%	0,0154
Eq2	Levenberg	0,0134 0	-----	0,5161 0	-----	99,19%	0,0019
Eq3*							

* - Não foi possível ajustar os dados experimentais à Equação 3.3 por nenhum dos métodos numéricos fornecidos pelo Statistica 7.0

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 2 modelos estão representados na Figura 4.25

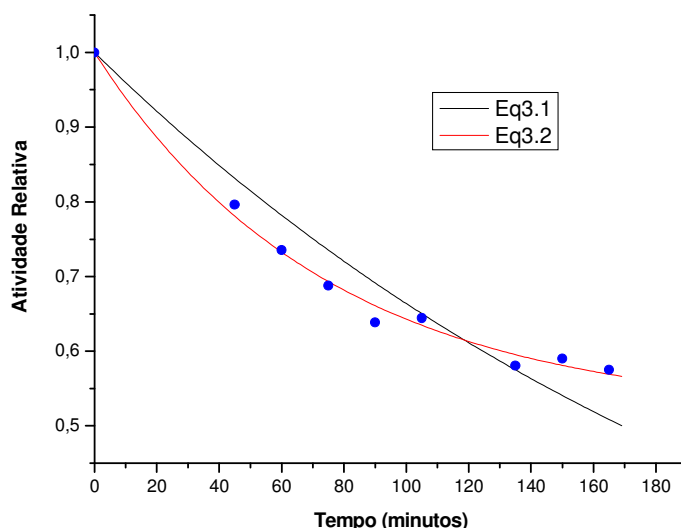


Figura 4.25– Perfil da desativação térmica à temperatura de 55°C.

Analisando a Figura 4.25 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos. Para esta temperatura foi possível ajustar as Equações 3.1 e 3.2, porém a Equação 3.2 apresentou menor valor da soma dos quadrados dos desvios e maior valor do coeficiente de determinação com parâmetros significativos fisicamente e estatisticamente. Os parâmetros ajustados para este modelo estão representados na Equação 4.9.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,5161).e^{(-0,0134)t} + 0,5161 \quad (4.9)$$

A Figura 4.26 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.27 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.26 nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática para a Equação 3.2

apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.27 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

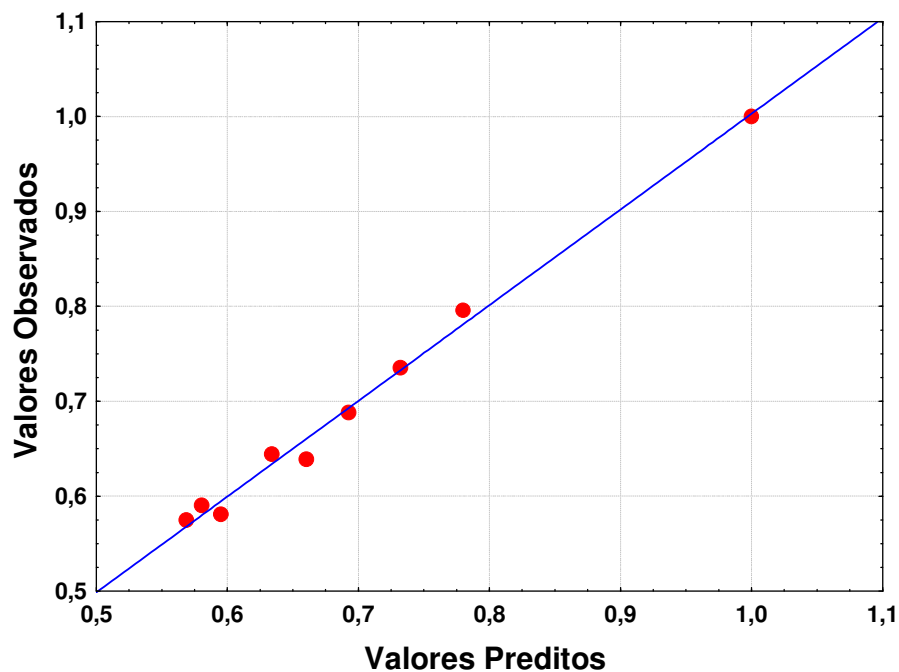


Figura 4.26 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

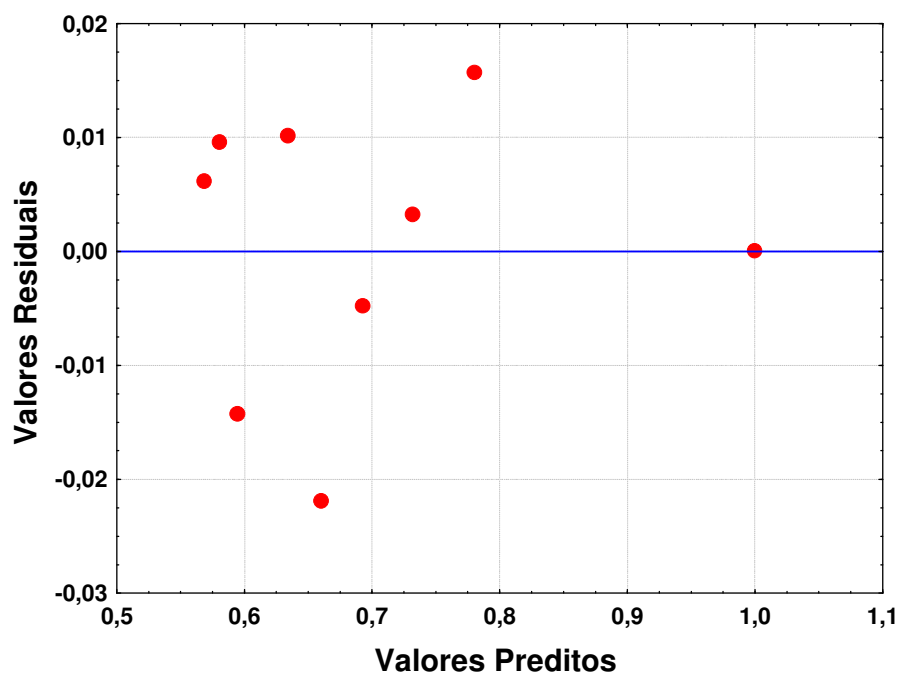


Figura 4.27 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.8 são apresentados os ajustes dos parâmetros para a temperatura de 53°C.

Tabela 4.8 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 53°C

	Método	k ₁ valor- p	k ₂ valor- p	α ₁ valor- p	α ₂ valor- p	R ²	Σ(V- V _{modelo}) ²
Eq3.1	Levenberg	0,0015 0	-----	----	-----	94,7%	0,004
Eq3.2	Levenberg	0,0061 0,006	-----	0,6094 0	-----	99,15%	0,0006
Eq3.3	quasi	0,0015	45415,53	-45684,3	0,0015	94,89%	0,004

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.28.

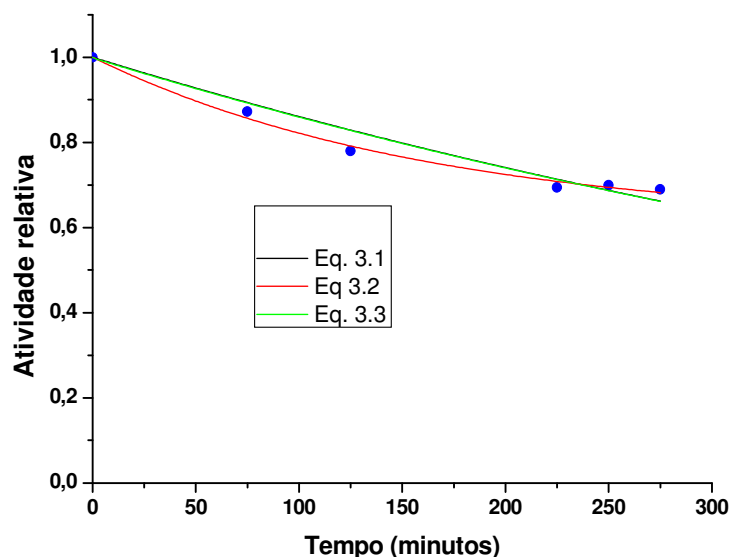


Figura 4.28 – Perfil da desativação térmica à temperatura de 53°C.

Analisando a Figura 4.28, verifica-se um ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos para o modelo da Equação 3.2. Para esta temperatura foi possível ajustar as Equações 3.1, 3.2 e 3.3, porém na Equação 3.3, os valores obtidos dos parâmetros k_2 e α_1 apresentaram significados físicos incoerentes (k_2 apresentou valor extremamente alto e α_1 apresentou valor negativo). Entre as Equações 3.1 e 3.2, a segunda apresentou menor valor da soma dos quadrados dos desvios e o maior valor do coeficiente de determinação com parâmetros significativos (valor-p menor que 10%) e fisicamente coerentes. Os parâmetros ajustados para a Equação 3.2 a 53°C estão representados na Equação 4.10.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,6094) \cdot e^{(-0,0061)t} + 0,6094 \quad (4.10)$$

A Figura 4.29 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.30 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.29 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.30 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

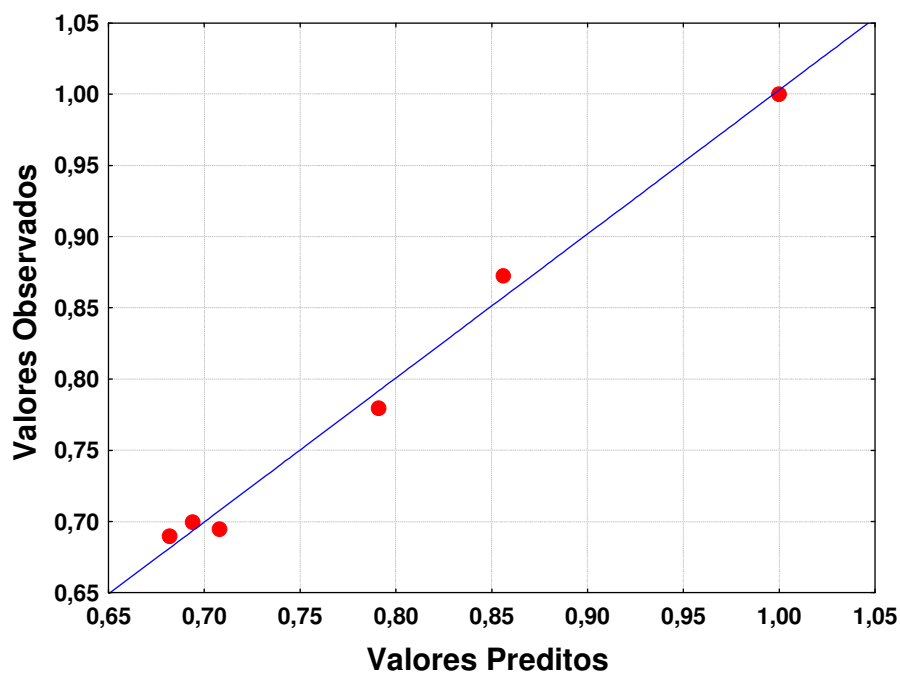


Figura 4.29- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

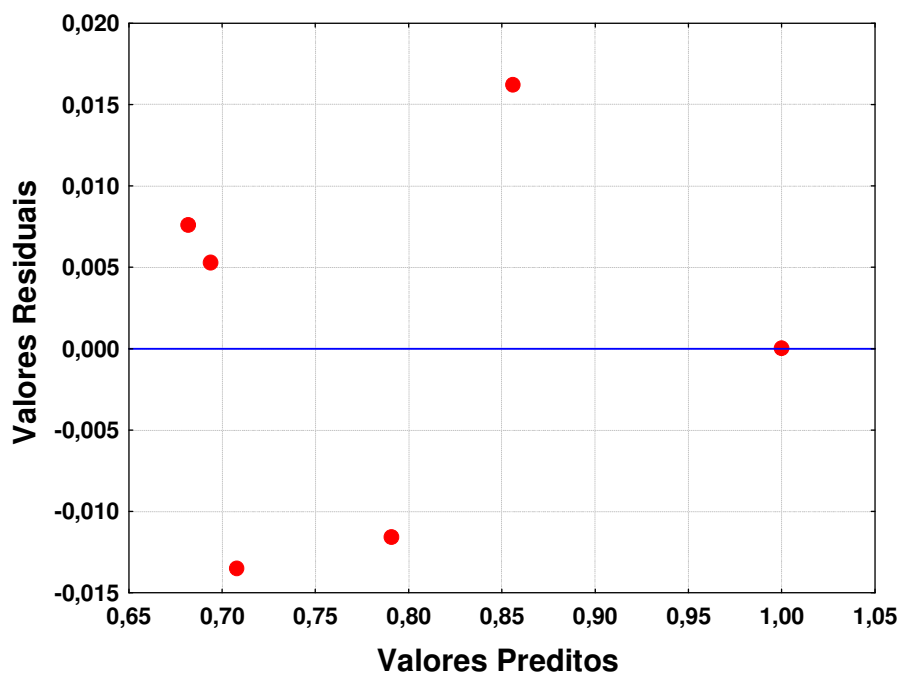


Figura 4.30 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando os resultados obtidos para a modelagem de desativação térmica em série representada pela Equação 3.3, esta não se ajustou bem, não apresentando significado físico para nenhuma das 7 temperaturas estudadas. Para a maior temperatura (65°C), o melhor ajuste se deu para a cinética de desativação de primeira ordem (Equação 3.1). Para as temperaturas de 63 e 61°C, o ajuste da Equação 3.1 poderia ter sido utilizado, mas os valores dos parâmetros ajustados para a modelagem de desativação em série em passo simples (“única etapa”, Equação 3.2) apresentaram-se significativos estatisticamente (maior R^2 e menor soma de quadrados dos desvios) e com coerência física dos parâmetros ajustados ao modelo, que apresentaram valores melhores quando comparados ao da Equação 3.1. Para a temperatura de 59°C os valores do parâmetro k_1 possui nível de significância maior que 10% de acordo com o teste *t-Student*, tornando inviável o uso da Equação 3.2 para o ajuste. Sendo assim, para esta temperatura, os parâmetros de desativação térmica se ajustaram ao modelo de primeira ordem. Para a temperatura de 57°C, os valores de R^2 e a soma dos quadrados dos desvios foram bastante próximos entre as Equações 3.1.e 3.2, mas o parâmetros α_1 possui nível de significância maior que 10% para a Equação 3.2. Portanto, para esta temperatura, foi adotado o ajuste da Equação 3.2, o que já era de se esperar, pois para baixas temperaturas esta equação se ajusta melhor quando comparados aos outros modelos cinéticos estudados. Além disso, quanto maior a temperatura maior o parâmetro da constante da velocidade de desativação térmica (k_d), o que realmente deveria acontecer, pois de acordo com a Equação de Arrhenius, k_d é diretamente proporcional à temperatura. Utilizando as constantes de ativação do processo de desativação térmica (k_{d1}) conforme item 3.4.4 dos modelos ajustados, foram calculados os tempos de meia-vida apresentados na Tabela 4.9 para cada temperatura, utilizando a Equação 3.4.

Tabela 4.9 – Tempo de meia vida para cada temperatura.

Temperatura (°C)	k_d (min ⁻¹)	R^2	Equação do Modelo	$t_{1/2}$ (min)
65	0,2881	97,8%	4.4	2,4
63	0,1419	99,14%	4.5	11,24
61	0,0721	98,8%	4.6	12,16
59	0,018	99,5%	4.7	38,5
57	0,0124	98,3%	4.8	55,9
55	0,0134*	99,1%	4.9*	----
53	0,0061*	99,15%	4.10*	----

- Não foi possível calcular o tempo de meia-vida pelos resultados experimentais e pelo modelo ajustado, indicando tempo de meia-vida alto.

Não foi possível calcular os tempos de meia vida para as temperaturas de 53 e 55°C, pelos modelos das Equações 4.9 e 4.10, como pode ser notado na Tabela 4.9, pois apresentaram significados físicos incoerentes. Assim, foi utilizado o modelo de primeira ordem para todas as temperaturas, embora para algumas delas não fosse o melhor ajuste estatístico, entretanto apresentaram significado físico para todas as temperaturas estudadas conforme Tabela 4.10. Desta forma o modelo de desativação térmica em série com uma etapa não se mostrou satisfatório para descrever a desativação térmica da enzima na faixa de temperatura estudada.

Tabela 4.10 – Tempo de meia vida para cada temperatura utilizando modelo de primeira ordem de desativação térmica

Temperatura (°C)	k_d (min ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (min)
65	0,2881	97,8%	2,40
63	0,0593	97,6%	11,68
61	0,0519	97,6%	13,59
59	0,018	99,5%	38,50
57	0,0124	98,3%	57,70
55	0,004	90,6%	177,70
53	0,0015	94,7%	463,00

No trabalho de GAUR *et al.* (2006), foi encontrado para as temperaturas de 55, 60 e 65 °C, respectivamente, os valores de tempos de meia vida 14,6, 2,26 e 0,52 horas. Observa-se grande diferença entre os valores obtidos na literatura e no presente trabalho. Isso pode ser justificado pelo fato do autor anteriormente mencionado utilizar como substrato ONPG. Observa-se ainda, discrepância nos valores encontrados para k_d que foram da ordem de 0,06; 0,19 e 0,88 (h⁻¹) para as temperaturas de 55, 60 e 65°C respectivamente.

Pela regressão linear com os resultados de k_d em função da temperatura, obtidos para os modelos de primeira ordem (Tabela 4.10), foi possível determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica com a equação de Arrhenius (Equação 3.5), como pode ser observado na Figura 4.31 e pela Equação 4.11.

$$\ln(k_d) = -44471 * \frac{1}{R T} + 130,04 \quad (4.11)$$

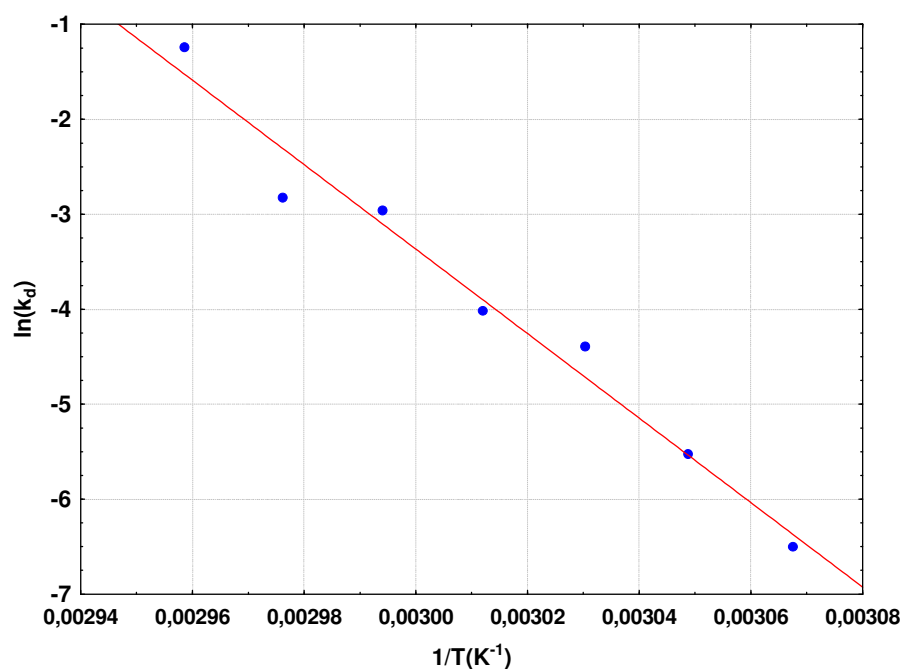


Figura 4.31 – Regressão linear da equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido alcançou coeficiente de determinação de 97,325% . Assim a energia de ativação do processo de desativação foi da ordem de 88,14 kcal/mol. No trabalho de PAPAYANNAKOS *et al.* (1993) o valor da energia de ativação do processo de desativação obtido utilizando β -galactosidase de *Aspergillus niger* utilizando como substrato lactose foi de 82,30 kcal/ mol.

4.2.6 – Influência da concentração inicial de glicose, galactose e lactose na atividade da enzima livre

Os resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase na forma solúvel em presença de glicose (G) e galactose (Ga) foram apresentados segundo as condições experimentais do item 3.4.6. Conforme descrito no Capítulo 3, após definida a matriz do planejamento, foram feitos os experimentos e determinadas as respostas das atividades da hidrólise da lactose. Esta etapa foi feita com o objetivo de analisar qualitativamente qual ou quais produtos de reação comportavam-se como inibidor da reação enzimática. A Tabela 4.11 apresenta os resultados obtidos para as atividades iniciais dos 16 experimentos.

Tabela 4.11 – Atividades enzimáticas em presença de glicose, galactose e lactose

Exp.	Valor real (valor codificado)			Atividade (U _L)
	Lactose (g/L)	Glicose(g/L)	Galactose (g/L)	
1	15 (-1)	1,25 (-1)	1,25 (-1)	0,918±0,036
2	15 (-1)	1,25 (-1)	10 (+1)	0,283±0,012
3	15 (-1)	10 (+1)	1,25 (-1)	2,001±0,076
4	15 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	0,597±0,033
5	50 (+1)	1,25 (-1)	1,25 (-1)	1,919±0,089
6	50 (+1)	1,25 (-1)	10 (+1)	1,668±0,079
7	50 (+1)	10 (+1)	1,25 (-1)	2,305±0,11
8	50 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	1,525±0,05
9	10 (- α)	5,63 (0)	5,63 (0)	0,914±0,051
10	55 (+ α)	5,63 (0)	5,63 (0)	1,838±0,11
11	32,5 (0)	0 (- α)	5,63 (0)	1,177±0,052
12	32,5 (0)	11,26 (+ α)	5,63 (0)	1,413±0,066
13	32,5 (0)	5,63 (0)	0 (- α)	1,828±0,071
14	32,5 (0)	5,63 (0)	11,26 (+ α)	0,975±0,054
15	32,5 (0)	5,63 (0)	5,63 (0)	1,064±0,06
16	32,5 (0)	5,63 (0)	5,63 (0)	0,975±0,05

Observa-se pela Tabela 4.11 que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,597U_L à 2,305U_L. Os maiores valores de atividade alcançados foram nos experimentos 3, 5 e 7, correspondentes às concentração de glicose dos níveis +1 (50g/L) e -1(15g/L), e em todos, a concentração de galactose manteve-se a 1,25 g/L, (nível -1). Analisando apenas os experimentos 5 e 7, observa-se que a concentração de glicose ao variar do menor para o maior nível, apresentou pequena influência na atividade enzimática, tendo um aumento no valor da atividade enzimática da ordem de 16,65%.

A partir dos resultados obtidos para as atividades analisadas, efetuou-se uma regressão múltipla, tendo como fatores os termos isolados, as interações e os termos

quadráticos das três variáveis. Após a realização da regressão múltipla no *software Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.12 na forma completa:

$$Y = 1,1125 + 0,04248X_1 + 0,1718X_2 - 0,3682X_3 + 0,1173X_1^2 + 0,0684X_2^2 + 0,1326X_3^2 - 0,144X_1X_2 + 0,126X_1X_3 - 0,1623X_2X_3 \quad (4.12)$$

O coeficiente de determinação obtido foi de $R^2 = 97,4\%$, a soma dos resíduos possui valor igual zero, indicando um ajuste adequado dos dados experimentais na atividade, mostrando que 97,4% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação empírica. A Tabela 4.12 ilustra o valor dos coeficientes da regressão juntamente com seu respectivo nível de confiança.

Tabela 4.12 – Análise estatística das variáveis

Fator	Parâmetros	Nível de significância
Intercepto	1,112548	0,000010
X_1 (lactose)	0,04248	0,000056
X_1^2 (lactose ²)	0,1173	0,101160
X_2 (glicose)	0,1718	0,006575
X_2^2 (glicose ²)	0,0684	0,302368
X_3 (galactose)	-0,3682	0,000126
X_3^2 (galactose ²)	-0,1326	0,071276
X_1X_2 (interação lactose e glicose)	-0,144	0,028532
X_1X_3 (interação lactose e galactose)	0,126	0,045941
X_2X_3 (interação galactose e glicose)	-0,1623	0,017873
$F_{\text{(calculado)}} = 25,4$		$F_T = 5,67$

Devido a grande variedade inerente aos processos bioquímicos que envolvem enzimas, foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). Eliminou-se então, os parâmetros com nível de significância do teste t de *Student* superiores a 10%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Assim, foi desprezado apenas o termo X_2^2 , ou seja, a interação quadrática da variável glicose. Ao refazer a análise estatística, sem a interação quadrática da variável 2, o novo coeficiente de determinação obtido foi de $R^2 = 96,9\%$, com soma dos quadrados dos resíduos igual zero,

indicando ajuste adequado dos dados experimentais na atividade, mostrando que 96,9% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação empírica.

A Equação 4.13 ilustra o valor dos coeficientes da regressão obtidos pela regressão múltipla sem o termo da interação quadrática da variável 2.

$$Y = 1,1608 + 0,04247X_1 + 0,1718X_2 - 0,3682X_3 + 0,1173X_1^2 + \quad (4.13) \\ + 0,1326X_3^2 - 0,144X_1X_2 + 0,126X_1X_3 - 0,1623X_2X_3$$

A Tabela 4.13 ilustra os valores dos coeficientes da regressão juntamente com seus respectivos níveis de confiança (valor-p)

Tabela 4.13 – Análise estatística das variáveis significativas.

Fator	Parâmetros	Nível de significância
Intercepto	1,160862	0,000001
X ₁ (lactose)	0,424769	0,000023
X ₁ ² (lactose ²)	0,117316	0,099402
X ₂ (glicose)	0,171835	0,005236
X ₃ (galactose)	-0,368243	0,000059
X ₃ ² (galactose ²)	0,132659	0,068922
X ₁ X ₂ (interação lactose e glicose)	-0,143954	0,026035
X ₁ X ₃ (interação lactose e galactose)	0,125989	0,043343
X ₂ X ₃ (interação galactose e glicose)	-0,162254	0,015696
	F _(calculado) = 27,35	F _T = 2,75

Pela análise de variância (ANOVA) para a regressão, visualizada na Tabela 4.13, verifica-se que o resultado para o teste F de Fisher ilustrou que o F_{calculado} (F_c) foi maior que o F_{tabelado} (F_T) para um nível de significância menor que 10% (valor-p = 0,000131), concluindo assim a significância do modelo.

Tabela 4.14 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	4,585113	8	0,573139	27,35585	0,000131
Resíduos	0,146659	7	0,020951		
Total	4,731772				

$$F_T = F_{8, 7; 0,1} = 2,75$$

Esta comparação pode ser interpretada por um teste de hipótese, onde a hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero, e a hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo, ou seja, pelo menos um dos parâmetros possui valor diferente de zero. Logo, o resultado do teste mostrou que se poderia desprezar a hipótese de nulidade com uma confiabilidade de 90%. A Figura 4.32, ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.33 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

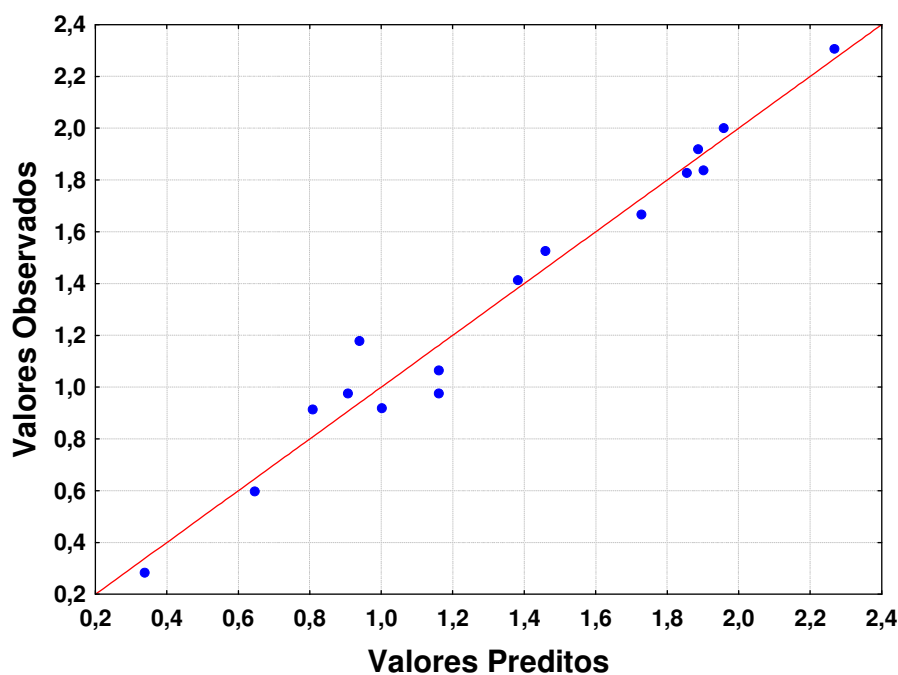


Figura 4.32 – Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

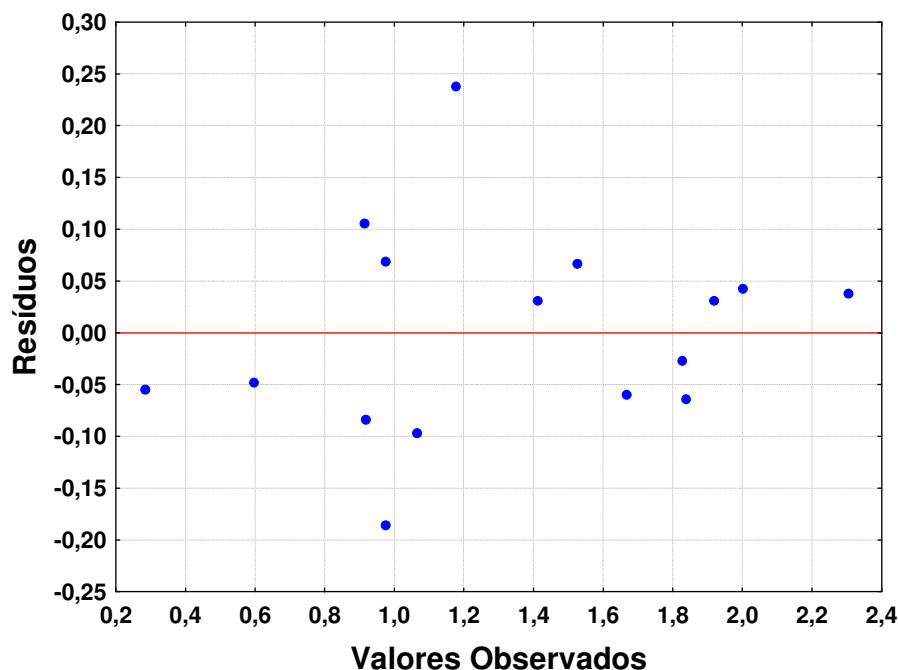


Figura 4.33 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a resposta de atividade enzimática

Observando a Figura 4.33 verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.32 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica, fato este justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação ($R^2=97,4\%$). Como o modelo foi significativo construiu-se as superfícies de respostas, analisadas duas a duas, e definiu-se a regiões de interesse. As Figuras 4.34, 4.36 e 4.38 representam as superfícies de resposta relacionando as variáveis duas a duas com a atividade inicial obtida e as Figuras 4.35, 4.37 e 4.39 as respectivas superfícies de contorno.

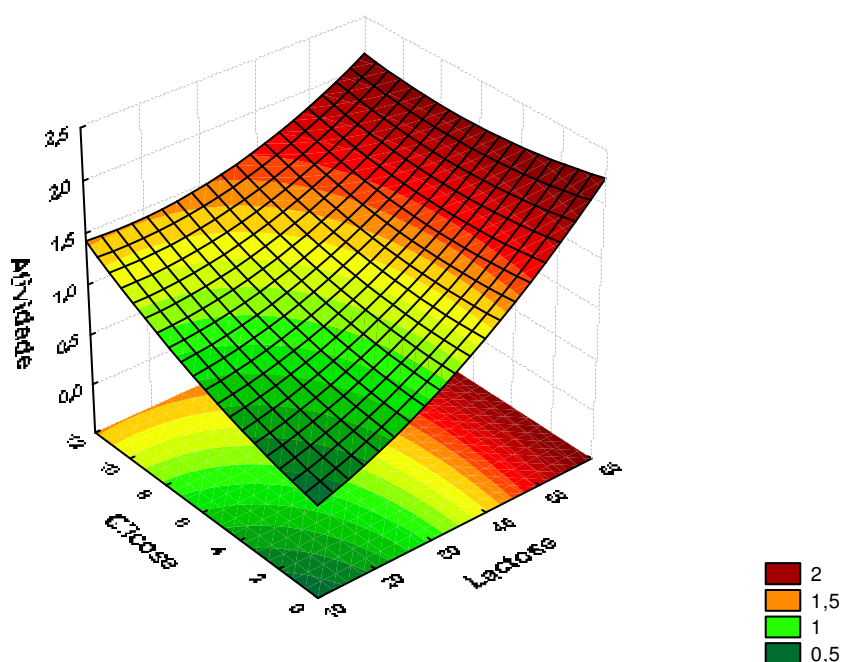


Figura 4.34 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis lactose e glicose

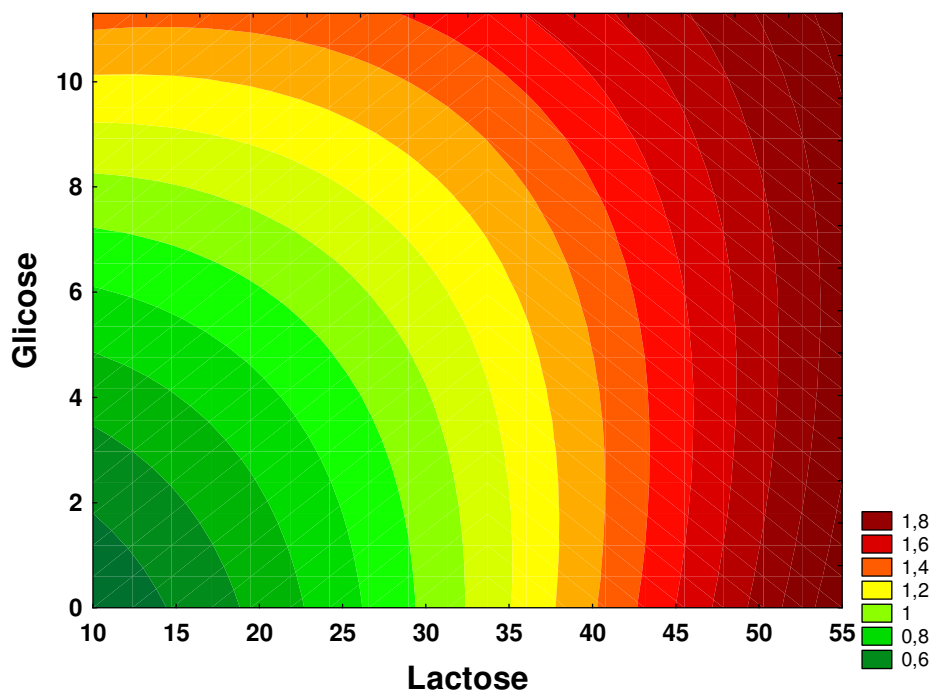


Figura 4.35 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis lactose e glicose

Observa-se nas Figuras 4.34 e 4.35, que para os níveis altos de concentração de lactose ocorre a região de máxima atividade, o que era de se esperar pois a máxima concentração de lactose utilizada foi próxima a 50g/L, valor este que conforme item 3.4.2

ainda não atingiu a faixa de inibição pelo substrato. Observa-se ainda que na região de máxima atividade a concentração de lactose é a maior estudada independente da concentração de glicose; assim pode-se afirmar que a glicose não interferiu na maximização da atividade enzimática, apenas a concentração de lactose. Pode-se supor ainda que a glicose esteja atuando como um ativador, ou seja, na faixa estudada ela contribui para o aumento da atividade enzimática.

As Figuras 4.36 e 4.37 ilustram o comportamento da concentração de galactose na atividade enzimática. Observa-se que nos baixos níveis de galactose é onde ocorre a faixa de maior atividade enzimática, ou seja, a galactose em altas concentrações interfere de modo a diminuir a variável resposta. As Figuras 4.38 e 4.39 mostram o efeito inibidor da galactose onde as altas atividades ocorrem nos maiores níveis de concentração de glicose e nos baixos níveis da concentração de galactose. Com isto, verifica-se que apenas a galactose possui efeito inibidor na hidrólise de β -galactosidase em sua forma solúvel.

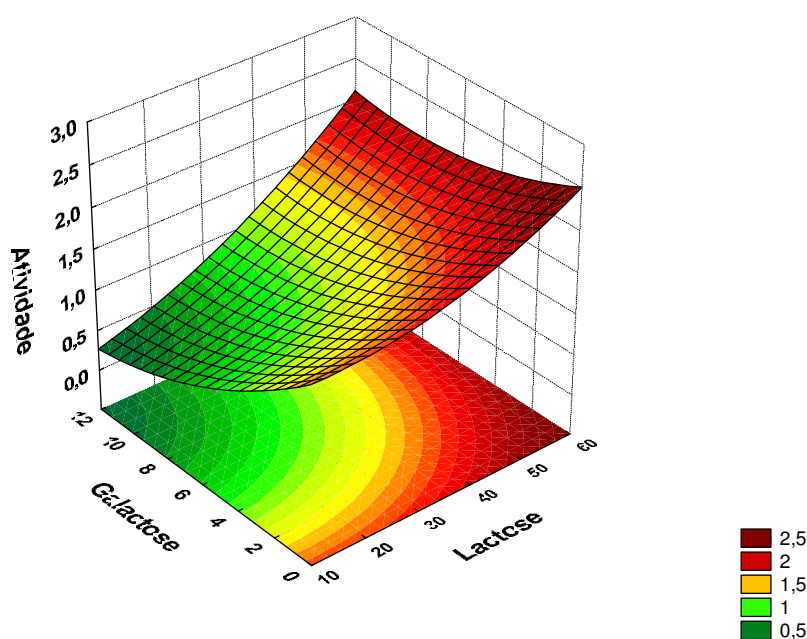


Figura 4.36 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis lactose e galactose

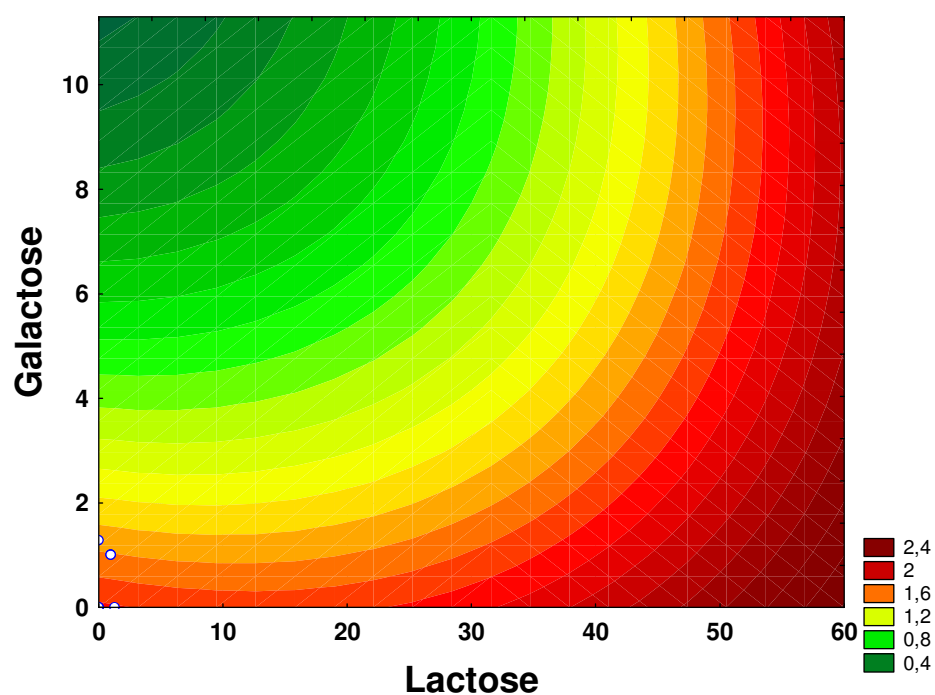


Figura 4.37 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis lactose e galactose

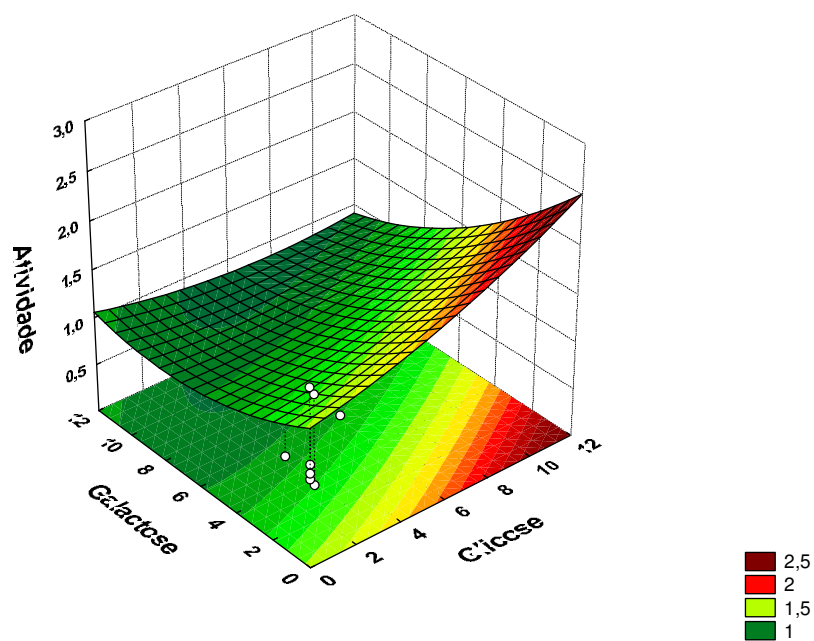


Figura 4.38 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glicose e galactose

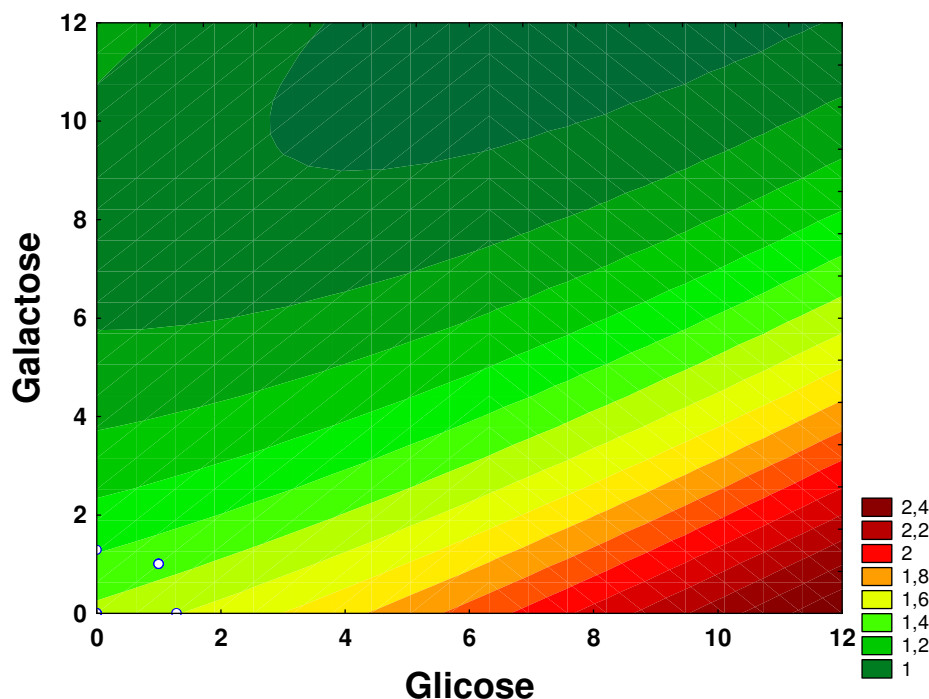


Figura 4.39 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glicose e galactose

HATZINIKOLAOU *et al.* (2005) utilizaram β -galactosidase de *Aspergillus niger* para hidrolisar permeado de lactose de soro ácido e também encontraram como inibidor competitivo somente a galactose. JURADO *et al.* (2002 e 2004) obtiveram também como inibidor competitivo apenas a galactose utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* na hidrólise de lactose.

4.2.7 - Influência da concentração de galactose na atividade da enzima livre

Os resultados da análise da influência dos produtos da reação na atividade enzimática, item 4.2.6 mostraram que a galactose tem um efeito inibidor significativo sobre a atividade de β -galactosidase. A glicose não apresentou efeito inibidor, portanto neste estudo será analisada apenas a influência da concentração da galactose na atividade da enzima.

Os resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise da lactose por enzima β -galactosidase na forma solúvel em presença de galactose (Gal) são apresentados na Tabela 4.15. As condições experimentais seguiram o item 3.4.7.

Tabela 4.15 - Resultados experimentais de velocidade de reação em função das concentrações iniciais de galactose (inibidor) e lactose (substrato) no meio reacional.

Experimento	Substrato (g/L)	Inibidor (g/L)	Atividade (U _L)
1	5	0	0,562±0,033
2	5	2,5	0,366±0,021
3	5	5	0,248±0,015
4	5	7,5	0,200±0,012
5	5	10	0,158±0,009
6	20	0	1,175±0,08
7	20	2,5	0,698±0,039
8	20	5	0,488±0,032
9	20	7,5	0,299±0,016
10	20	10	0,287±0,019
11	40	0	1,584±0,11
12	40	2,5	0,979±0,048
13	40	5	0,726±0,045
14	40	7,5	0,480±0,028
15	40	10	0,434±0,027
16	60	0	2,049±0,11
17	60	2,5	1,406±0,083
18	60	5	1,173±0,057
19	60	7,5	1,016±0,069
20	60	10	0,672±0,044
21	80	0	2,223±0,153
22	80	2,5	1,233±0,075
23	80	5	0,945±0,062
24	80	7,5	0,830±0,046
25	80	10	0,600±0,036
26	100	0	2,049±0,119
27	100	2,5	1,406±0,087
28	100	5	1,173±0,064
29	100	7,5	1,016±0,068
30	100	10	0,672±0,037

Os resultados da Tabela 4.15 foram ajustados por uma regressão não linear, realizados pelo software *Statistica 7.0*, utilizando o método de Levenberg-Marquardt ou o método de Quasi-Newton, aos modelos cinéticos de Inibição Competitiva, Inibição Não Competitiva, Inibição Acompetitiva, Inibição Mista Linear e Inibição Parcialmente Não Competitiva, representados pelas Equações 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 e 3.20, respectivamente. A escolha do método numérico adotado foi baseado em dois itens: primeiramente o significado físico dos parâmetros fornecidos e em seguida o método que forneceu melhor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a menor soma de quadrados dos desvios.

Na Tabela 4.16 estão apresentados os parâmetros ajustados com as respectivas análise de *t-Student*, os coeficientes de determinação e a somatória dos quadrados dos desvios, para o efeito de inibição dado pela galactose.

Tabela 4.16 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de galactose como inibidor

Modelos de inibição I = Galactose		V_m (U _L)	K_m (g/L)	K_i (g/L)	α	β	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	R^2
Competitiva*	Parâmetros	2,40	17,61	1,015	-	-	0,255	96,35%
	Nível-p	0	0,0001	0,0	-	-		
Não Competitiva**	Parâmetros	3,14	34,34	4,19	-	-	0,200	97,34%
	Nível-p	0	0	0	-	-		
Acompetitiva***	Parâmetros	4,05	62,17	2,09	-	-	0,311	95,72%
	Nível-p	0,00	0,0011	0	-	-		
Mista Linear****	Parâmetros	2,55	21,0	1,99	4,34	-	0,182	97,4%
	Nível-p	---	--	--	--	-		
Parcialmente Não Competitiva*****	Parâmetros	3,11	39,06	4,42	-	-0,14	0,37	95,7%
	Nível-p	0,0	0,0003	0,0069	-	0,22		

* - Utilizou-se aqui o método Levenberg-Marquardt - os resultados dos experimentos de números 2,18,19 e 21 foram eliminados das análises por apresentarem alto valor de resíduo;

** - Utilizou-se aqui o método Levenberg-Marquardt -os resultados dos experimentos de números 14,18,19 e 26 foram eliminados das análises por apresentarem alto valor de resíduo;

*** - Utilizou-se aqui o método Levenberg-Marquardt -os resultados dos experimentos de números 9,18, 19 e 26 foram eliminados das análises por apresentarem alto valor de resíduo;

****- Utilizou-se aqui o método Quasi - Newton - os resultados dos experimentos de números 18, 19, 21 e 22 foram eliminados das análises por apresentarem alto valor de resíduo;

***** - Utilizou-se aqui o método Levenberg-Marquardt - os resultados dos experimentos de números 1, 9, 19 e 29 foram eliminados das análises por apresentarem alto valor de resíduo;

Com base nos resultados da Tabela 4.16, os parâmetros com nível de significância menor que 10% pela análise *t-Student* foram considerados significativos. Analisando o ajuste na determinação dos parâmetros do modelo de inibição mista linear verifica-se que entre todos, este foi o que apresentou melhor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a menor valor da soma dos quadrados dos desvios, porém, apresentou o valor do parâmetro α muito alto, o que não condiz com o significado físico do modelo. Para o modelo de inibição parcialmente não competitivo, verifica-se que o parâmetro β apresentou valor negativo e nível de significância (valor-p) maior que 10%, o que o torna estatisticamente igual a zero. Com

isto, eliminou-se este tipo de inibição como o ajuste ideal para a modelagem de inibição pela galactose. Observando os resultados obtidos para a inibição incompetitiva, apesar de todos os parâmetros apresentarem valores significativos estatisticamente, verifica-se um valor muito alto para V_m e também para K_m , em relação ao modelo de Michaelis-Menten. Entre os dois modelos restantes, o modelo de inibição não competitiva apresenta o maior valor de R^2 e a menor soma de quadrados de desvios e todos os parâmetros significativos estatisticamente. Porém, observa-se que os valores dos parâmetros V_m e K_m apresentaram valores altos quando comparados com os valores obtidos por Michaelis-Menten (Figura 4.4). Sabe-se que no modelo de inibição não competitiva não se alcança o valor de V_m quando comparado com Michaelis-Menten (BAILEY, 1986), assim, o valor de V_m obtido que foi de $3,14U_L$ está muito alto quando comparado com o valor de $2,56U_L$ obtido na Equação 4.3. Já o modelo de inibição competitiva pode alcançar o valor de V_m quando comparado com Michaelis-Menten, o que realmente foi observado. Com isto, pela análise dos coeficientes de determinação, pelos valores das somas dos quadrados dos desvios, pela significância dos parâmetros pela análise *t-Student* e pelo significado físico dos mesmos, o modelo que melhor se ajustou foi o de inibição competitiva pela galactose. O ajuste do modelo de inibição competitiva (Equação 4.14) pela galactose está apresentado na Figura 4.40 na forma de superfície de resposta. Na Figura 4.41 observa-se que os valores observados experimentalmente estão próximos aos preditos pelo modelo. A Equação 4.14 ilustra a equação do modelo de inibição competitivo com os valores dos parâmetros obtidos.

$$v = \frac{(2,40 * S)}{(S + 17,61 * (1 + (Gal/1,015)))} \quad (4.14)$$

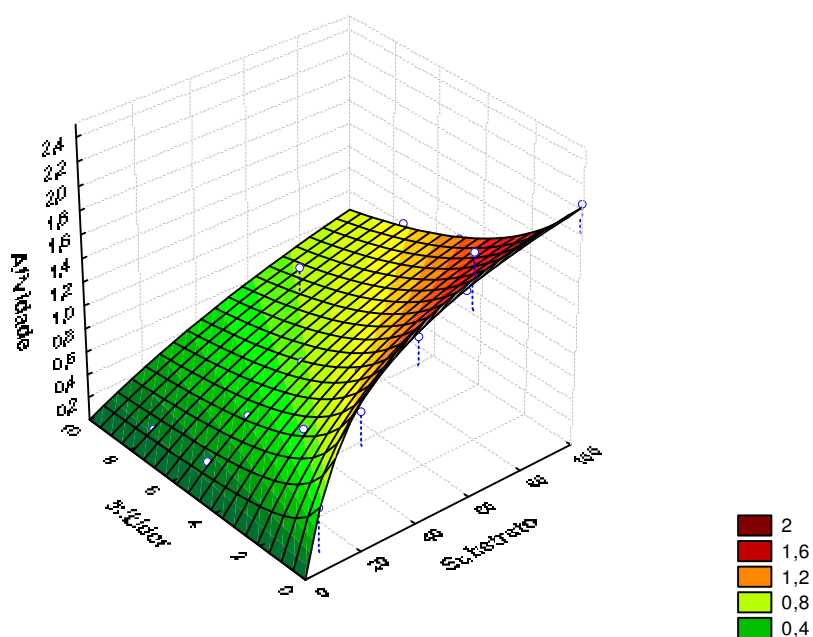


Figura 4.40 – Perfil da influência da concentração de galactose na atividade da enzima livre, pelo modelo de inibição competitiva.

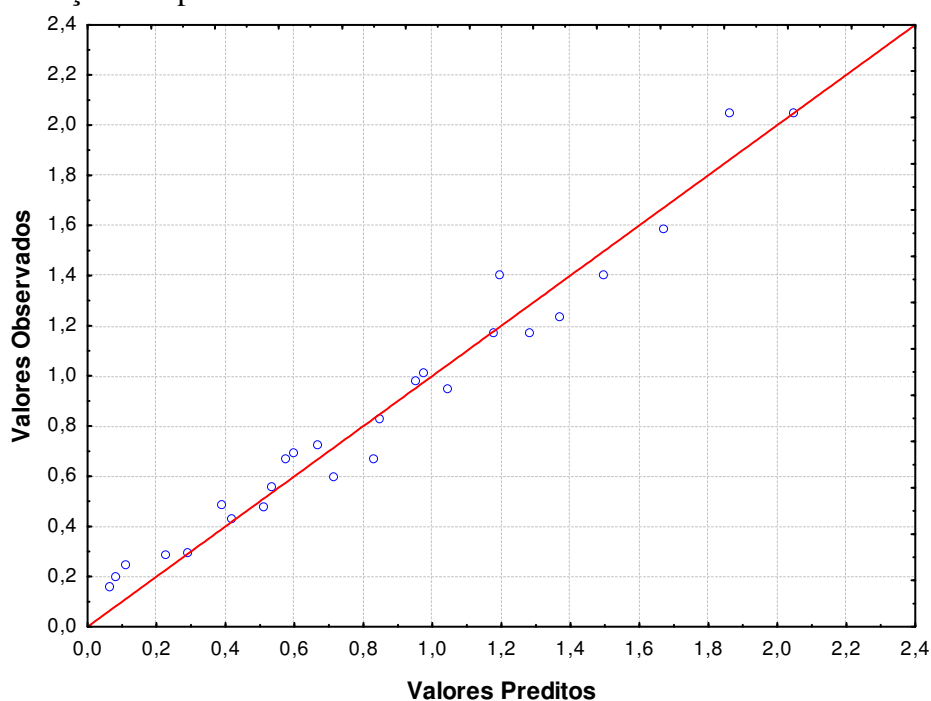


Figura 4.41 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática.

Os valores dos parâmetros K_m e K_i obtidos neste trabalho foram 51,49 e 5,63 mM respectivamente. HATZINIKOLAOU *et al.* (2005) encontraram os valores de K_m e K_i de 31,8 e 6,56 mM respectivamente para o modelo de inibição competitivo pela galactose para β -galactosidase de *Aspergillus niger*. MATEO *et al.* (2004) utilizando β -galactosidase de

Kluyveromyces lactis encontraram inibição competitiva por galactose obtendo K_m igual a 3,6 mM e K_i de 758 mM.

Com o objetivo de confirmar o modelo cinético obtido, realizou-se um experimento (em duplicata) nas mesmas condições operacionais citadas nos item 3.3, onde foi determinado o perfil de concentração de lactose em função do tempo. Utilizando o *software* Scilab, implementou-se um algoritmo que compara os valores experimentais obtidos com os preditos pelo modelo de inibição competitiva. A Tabela 4.17 e a Figura 4.42 ilustram os valores de concentração de substrato, experimentais e os previstos pelo modelo.

Tabela 4.17 – Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima solúvel.

Tempo (minutos)	S Previsto (g/L)	S experimental (g/L)	P Previsto (g/L)	P experimental (g/L)	Erro (%)
0	50	50	0	0	0
30	44,87	42,33	5,13	7,67	6,87
90	38,88	35,42	11,12	14,58	7,18
210	31,71	29,29	18,29	20,71	6,24
330	26,95	22,26	23,05	27,74	5,53
450	23,37	18,04	26,63	31,96	2,44
570	20,53	14,41	29,47	35,59	39,87
690	18,18	14,69	31,82	35,31	31,05

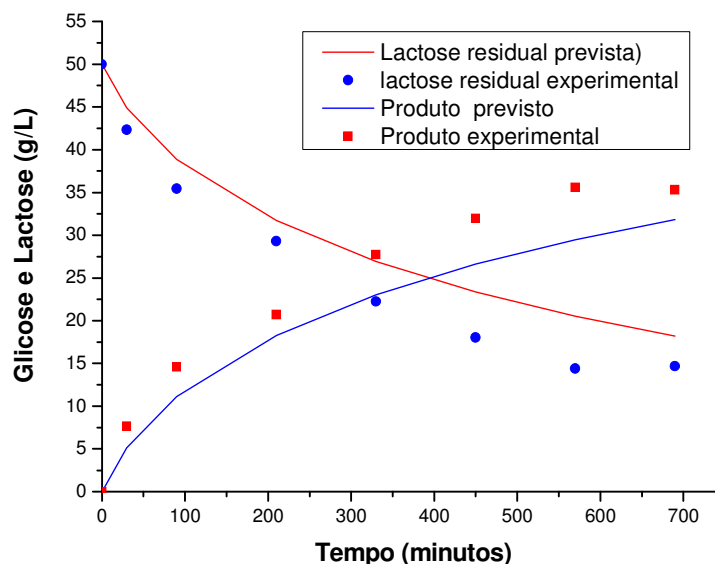


Figura 4.42 - Comprovação do modelo cinético de inibição competitiva para a enzima solúvel

Observa-se bom ajuste para os dados experimentais podendo-se verificar que o modelo obtido de inibição competitiva pela galactose representa bem a cinética de hidrólise

de lactose pela ação da enzima na forma livre. O modelo cinético permite calcular o tempo de reação do processo visando atingir a conversão desejada.