



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



**Imobilização de α -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca
iônica Duolite A-568**

**Henrique Coutinho de
Barcelos Costa**

**UBERLÂNDIA - MG
2012**



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



**Imobilização de α -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca
iônica Duolite A-568**

**Henrique Coutinho de
Barcelos Costa**

Orientadores:

Dra. Miriam Maria de Resende

Dr. Eloízio Julio Ribeiro

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da 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
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

- C837i
2012 Costa, Henrique Coutinho de Barcelos, 1985-
 Imobilização de α -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca
 iônica Duolite A-568 / Henrique Coutinho de Barcelos Costa. - 2012.
 103 f. : il.
 Orientadores: Miriam Maria de Resende e Eloízio Julio Ribeiro.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Enzimas - Aplicações industriais -
 Teses. 3. Enzimas imobilizadas - Teses. I. Resende, Miriam Maria de. II.
 Ribeiro, Eloízio Julio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
 de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 27/07/2012.

BANCA EXAMINADORA:



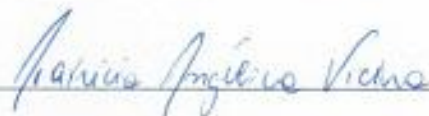
Prof^ª. Dr^ª. Miriam Maria de Resende
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Coorientador (FEQUI/UFU)



Prof^ª. Dr^ª. Vicelma Luiz Cardoso
Professora (FEQUI/UFU)



Prof^ª. Dr^ª. Patricia Angélica Vieira
Professora (FEQUI/UFU)



Prof^ª. Dr^ª. Mônica Hitomi Okura
Professora (UFTM)

Dedico este trabalho à minha família e minha namorada.

AGRADECIMENTOS

Vencer mais esta etapa não foi uma tarefa fácil. Não poderia deixar de agradecer em primeiro lugar à Deus e ao meu Senhor, Jesus Cristo. Este Homem nasceu pobre, teve uma vida simples e humilde. Não ocupava cargos importantes e muito menos gozava de privilégios. No entanto foi o Único e Verdadeiro Mestre que a História já conheceu. Não há cientista e nem tão pouco descobertas que superem a Grandeza e o Feito deste Homem para a Humanidade.

Agradeço aos meus pais Rômulo e Célida pela educação. Ao meu pai que me ensinou o valor do trabalho e à minha mãe por ter ensinado os verdadeiros valores da vida. Agradeço à Tia Tei pelo carinho e aos meus irmãos, Eduardo e Alexandre pela amizade. Aos meus avós, Joval e Naná, verdadeiros exemplos de vida.

É mais do que justo fazer um agradecimento especial à minha namorada Betânia, que esteve presente durante praticamente todo o mestrado, dando apoio, força e incentivo nas horas certas e incertas. Muito deste trabalho devo à sua incansável colaboração. Você é muito especial! Muito, muito obrigado!

Agradeço à professora orientadora Miriam Resende pela orientação, apoio incondicional e paciência. Ao professor orientador Eloízio Ribeiro pelos conselhos e informações prestadas à este trabalho. À professora Vicelma Cardoso pela colaboração.

Aos colegas de trabalho do Núcleo de Bioquímica, que em algum momento estiveram presentes durante a etapa de elaboração dos meus experimentos: Alex, Bruna, Carla, Cida, Diego, Fernanda, Francielle, Helisângela, Janaína, Larissa, Líbia, Magno, Maurielem, Nattácia, Ocinéria, Rafael, Rodrigo, Romina, Ruy, Taís, Tammayne, Verônica, Wesley e Wilson. A presença de vocês foi importante nos momentos de intermináveis experimentos. Aos amigos Luiz Carlos e Maurício.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química: Silvino, Cecília, Thiago e Cléo pela disposição e colaboração.

À Universidade Federal de Uberlândia e à FEQUI pela oportunidade concedida e ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Cada um de nós compõe a
sua própria história e cada
ser em si carrega o dom de
ser capaz, de ser feliz”.

Almir Sater e Renato Teixeira

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	3
2.1 – Geral.....	3
2.2 – Específico.....	3
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 – Enzimas.....	4
3.2 – α-galactosidase.....	7
3.2.1 – Estrutura da α -galactosidase.....	7
3.2.2 – Fontes de α -galactosidade.....	9
3.2.3 – Aplicações da α -galactosidade.....	11
3.3 – Enzimas imobilizadas.....	12
3.4 – Métodos de imobilização de enzimas.....	15
CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 – Material.....	21
4.1.1 – Enzima.....	21
4.1.2 – Suportes para imobilização.....	21
4.1.3 – Substrato.....	23
4.1.4 – Agente reticulante.....	23
4.1.5 – Unidade Experimental.....	23
4.2 – Metodologia.....	24
4.2.1 – Determinação de açúcares redutores.....	24
4.2.2 – Dosagem de proteína.....	25
4.2.3 – Determinação da atividade de α -galactosidase pelo método das taxas iniciais.....	25
4.2.4 – Etapas experimentais.....	27
4.2.5 – Seleção do suporte de imobilização.....	29
4.2.6 – Estudo do uso de glutaraldeído como agente reticulante para o processo de imobilização enzimática.....	29

4.2.6.1 – Efeito do glutaraldeído na atividade da α -galactosidase imobilizada.....	29
4.2.6.2 – Estudo da concentração de glutaraldeído e do tempo no processo de reticulação.....	30
4.2.6.3 – Efeito do glutaraldeído na estabilidade operacional da α -galactosidase imobilizada.....	33
4.2.7 – Estudo preliminar do efeito da temperatura na imobilização.....	33
4.2.8 – Estudo da influência do pH, da concentração de α -galactosidase e do tempo no processo de imobilização.....	34
4.2.9 – Influência da temperatura na atividade da α -galactosidase.....	38
4.2.10 – Influência do pH na atividade da α -galactosidase.....	38
4.2.11 – Estabilidade ao pH.....	39
4.2.12 – Estabilidade térmica.....	39
4.2.13 – Estudo da Cinética sem Inibição.....	41
4.2.14 – Estudo da influência da concentração do substrato juntamente com os produtos de hidrólise da rafinose na atividade da α -galactosidase imobilizada.....	42
4.2.15 – Influência da concentração inicial de galactose na inibição da atividade da α -galactosidase imobilizada.....	44
4.2.16 – Estabilidade da enzima α -galactosidase imobilizada em relação ao tempo de estocagem.....	45
 CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 46
5.1 – Seleção do suporte de imobilização.....	46
5.2 – Estudo do glutaraldeído como agente de reticulação na imobilização da α -galactosidase.....	47
5.2.1 – Efeito do glutaraldeído na atividade da α -galactosidase imobilizada.....	47
5.2.2 – Estudo da concentração de glutaraldeído e do tempo no processo de reticulação.....	47
5.2.3 – Efeito do glutaraldeído na estabilidade operacional da α -galactosidase imobilizada.....	49
5.3 – Estudo preliminar do efeito da temperatura na imobilização.....	50
5.4 – Estudo das variáveis pH, concentração de enzima e tempo na imobilização.....	51
5.5 – Influência da temperatura na atividade da α -galactosidase livre e imobilizada.....	56
5.6 – Energias de ativação para α -galactosidase livre e imobilizada.....	57
5.7 – Influência do pH na atividade da enzima α -galactosidase livre e imobilizada.....	57
5.8 – Resistência da enzima α -galactosidase em relação ao pH.....	61
5.9 – Resistência térmica da enzima α -galactosidase.....	63
5.9.1 – Resistência térmica da α -galactosidase livre.....	63
5.9.1.1 – Cálculo do tempo de meia-vida.....	70
5.9.2 – Resistência térmica da α -galactosidase imobilizada.....	71
5.9.2.1 – Cálculo do tempo de meia-vida.....	78
5.10 – Efeito da concentração de substrato na atividade da enzima α -galactosidase.....	79

5.11 – Influência da concentração do substrato juntamente com os produtos de hidrólise da rafinose na atividade da α -galactosidase imobilizada.....	82
5.12 – Influência da concentração de galactose na cinética da α -galactosidase imobilizada.....	86
5.13 - Estocagem da α -galactosidase imobilizada.....	90
 CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	 91
 CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 93
 CAPÍTULO 8 – APÊNDICE.....	 102

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Diferentes substratos da α -galactosidase contendo ligações galactose α -1,6. (Fonte: REIS, 2007).....	7
Figura 3.2 – Estrutura tridimensional da α -galactosidase produzida por <i>Trchoderma reesei</i> (Fonte: GOLUBEV <i>et al.</i> , 2004).....	8
Figura 3.3 – Interação entre enzima e suporte (Adaptado de TISCHER e KASCHE,1999).....	16
Figura 3.4 – Molécula de glutaraldeído.....	19
Figura 3.5 – Oclusão de enzima em gel (a), fibra (b), cápsula (c), filme (d) e membrana (e). Fonte: CAO <i>et al.</i> , 2003.....	19
Figura 4.1 – Enzima α -galactosidase usada na hidrólise da rafinose.....	21
Figura 4.2 – Resina Duolite A-568 empregada para imobilização da enzima α -galactosidase.....	22
Figura 4.3 – Unidade experimental utilizada nos experimentos.....	24
Figura 4.4 – Fluxograma da etapa de determinação das condições de imobilização.....	27
Figura 4.5 – Fluxograma da etapa do estudo comparativo da enzima imobilizada com a enzima livre.....	28
Figura 5.1 – Superfície de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de reticulação na atividade da α -galactosidase imobilizada.....	49
Figura 5.2 – Atividade relativa (U/U_0) da α -galactosidase imobilizada com processo de reticulação com 1% de glutaraldeído (■) e sem processo de reticulação (♦).....	50
Figura 5.3 – Superfície de resposta da influência do pH e do tempo de imobilização na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.....	53
Figura 5.4 – Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.....	53
Figura 5.5 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e da concentração de enzima na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.....	53

Figura 5.6 – Superfície de resposta da influência do pH e do tempo de imobilização na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização.....	55
Figura 5.7 – Influência da temperatura na atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) (b) da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦) em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.....	56
Figura 5.8 – Ajuste linear sobre a equação de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação da enzima livre (a) (■) e imobilizada (b) (♦) em tampão acetato/ácido acético pH 5,0.....	58
Figura 5.9 – Influência do pH na atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) (b) a 40°C da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦).....	59
Figura 5.10 – Atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) (b) da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦) após incubação em diferentes pHs por 36 horas a 25°C. A atividade foi medida a 40°C em tampão acetato/ácido acético pH 5,0.....	61
Figura 5.11 – Atividades relativas da α -galactosidase livre após diferentes tempos de incubação a 60°C (▼), 63°C (▲) e 67°C (●). As atividades foram medidas a 40°C em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.....	63
Figura 5.12 – Ajuste da Equação 5.5 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 60 °C (▼).....	65
Figura 5.13 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 60°C ajustado pela Equação 5.5.....	66
Figura 5.14 – Ajuste da Equação 5.6 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 63 °C (▲).....	67
Figura 5.15 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 63°C ajustado pela Equação 5.6.....	68
Figura 5.16 – Ajuste da Equação 5.7 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C (●).....	69
Figura 5.17 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 67°C ajustado pela Equação 5.7.....	69
Figura 5.18 – Atividades residuais da α -galactosidase imobilizada após diferentes tempos de incubação a 60°C (▼), 65°C(▲) e 70°C(●). As atividades foram medidas a 40°C em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.....	72
Figura 5.19 – Ajuste da Equação 5.8 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 60°C (▼) da α -galactosidase imobilizada.....	73
Figura 5.20 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 60°C ajustado pela Equação 5.8 (▼).....	74

Figura 5.21 – Ajuste da Equação 5.9 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 65°C (▲) da α -galactosidase imobilizada.....	75
Figura 5.22 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 65°C ajustado pela Equação 5.9.....	75
Figura 5.23 – Ajuste da Equação 5.10 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 70°C (●) da α -galactosidase imobilizada.....	76
Figura 5.24 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 70°C ajustado pela Equação 5.10.....	77
Figura 5.25 – Efeito da concentração do substrato rafinose na atividade da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦) para hidrólises feitas a 40°C em pH 5,0. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a cinética da enzima livre (—) e imobilizada(—).....	80
Figura 5.26 – Distribuição dos resíduos dos dados experimentais da α -galactosidase livre (■) para o ajuste da cinética Michaelis-Menten.....	80
Figura 5.27 – Distribuição dos resíduos dos dados experimentais da α -galactosidase imobilizada (♦) para o ajuste da cinética de Michaelis-Menten.....	81
Figura 5.28 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de sacarose e rafinose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.....	85
Figura 5.29 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de galactose e rafinose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.....	85
Figura 5.30 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de galactose e sacarose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.....	85
Figura 5.31 – Atividade da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 em função das concentrações de rafinose e galactose.....	89
Figura 5.32 – Atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 para um período de até 145 dias de armazenamento a 4°C em tampão acetato pH 4,5.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Classificação das enzimas segundo o tipo de reação catalisada.....	5
Tabela 3.2 – Principais enzimas comercializadas e aplicadas na indústria de alimentos.....	6
Tabela. 4.1 – Características da resina Duolite A568 (Dow Chemical®).....	23
Tabela. 4.2 – Matriz do PCC 2^2 com os valores codificados e originais das variáveis concentração de glutaraldeído (X_1) e tempo (X_2) para otimização do processo de reticulação.....	32
Tabela. 4.3 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com os valores codificados e originais das variáveis para estudo do processo de imobilização.....	36
Tabela. 4.4 – Matriz do PCC 2^2 com os valores codificados e originais das variáveis para otimização do processo de imobilização.....	37
Tabela. 4.5 – Matriz do planejamento composto central 2^3 com os valores codificados e originais das variáveis concentração de rafinose, sacarose e galactose para o estudo da inibição da reação enzimática.....	43
Tabela. 4.6 – Variação das concentrações de substrato (rafinose) e inibidor (galactose) para determinação do modelo cinético de inibição.....	44
Tabela 5.1 – Resultados das atividades da α -galactosidase imobilizada em diferentes resinas de troca iônica.....	46
Tabela 5.2 – Efeito do agente reticulante na atividade da enzima.....	47
Tabela 5.3 – Resultados do PCC (2^2) realizados para o estudo das concentrações do glutaraldeído e do tempo de reticulação.....	48
Tabela 5.4 – Análise de variância com o valor de p -calculado para a análise da diferença de médias entre as temperaturas de 25°C e 40°C utilizadas na imobilização da α -galactosidase.....	51
Tabela 5.5 – Primeiro Planejamento Fatorial Completo: Análise das variáveis pH, concentração de enzima e tempo do processo de imobilização.....	51
Tabela 5.6 – Planejamento Composto Central: Otimização do pH e do tempo no processo de imobilização da α -galactosidase.....	54
Tabela. 5.7 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 60°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	65
Tabela. 5.8 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 63°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	67

Tabela. 5.9 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	69
Tabela 5.10 – Resultados dos tempos de meia vida para enzima livre a 60°C, 63°C e 67°C..	71
Tabela 5.11 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 60°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	73
Tabela 5.12 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 65°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	74
Tabela 5.13 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 70°C pelo método Levenberg-Marquadt.....	76
Tabela 5.14 – Resultados do tempo de meia vida para a enzima imobilizada para diferentes temperaturas.....	78
Tabela 5.15 – Influência do substrato rafinose na atividade da α -galactosidase em sua forma livre e imobilizada. As hidrólises foram realizadas a 40°C e pH 5,0.....	79
Tabela 5.16 – Valores estimados dos parâmetros $V_{m\acute{a}x}$, K_m e $V_{m\acute{a}x}.K_m^{-1}$ do modelo cinético de Michaelis-Menten para α -galactosidase livre e imobilizada em Duolite A-568.....	81
Tabela 5.17 – Planejamento Composto Central com os valores codificados e originais das variáveis concentração de rafinose, sacarose e galactose para o estudo da inibição da reação enzimática.....	84
Tabela 5.18 – Valores da atividade da enzima para diferentes concentrações de rafinose e galactose.....	87
Tabela 5.19 – Valores dos parâmetros $V_{m\acute{a}x}$, K_m e K_I para diferentes cinéticas de inibição estimadas por regressão linear não linear.....	88
Tabela 5.20 – Valores dos parâmetros α e β , coeficiente de determinação e soma do quadrado dos desvios para diferentes cinéticas de inibição estimadas por regressão linear não linear....	88

LISTA DE SÍMBOLOS

$b_j; b_{jm}; b_{jj}$ – parâmetros do modelo

E – atividade específica da enzima no estado inicial para os processos de desativação térmica em série

E_1 – atividade específica da enzima ao final da primeira etapa do processo de desativação térmica em série

E_2 – atividade específica da enzima ao final da segunda etapa do processo de desativação térmica em série

E_a – Energia de ativação térmica

G – número de pontos fatoriais no planejamento composto central

H_0 – Hipótese de nulidade do teste de *t-Student* de diferença de médias

H_1 – Hipótese alternativa do teste de *t-Student* de diferença de médias

I – concentração de inibidor em g/L

k – número de variáveis independentes no planejamento experimental

$k_1; k_2; k_d$ – constantes cinéticas de desativação térmica

K_I – constante de inibição

K_m – constante de *Michalis-Menten*

PCC – Planejamento composto central

PF – Planejamento fatorial

pI – ponto isoelétrico

R – constante dos gases ideais

R^2 – Coeficiente de determinação

rpm – Rotações por minuto

S – concentração de substrato

T – número de pontos adicionais no planejamento composto central

T – temperatura absoluta em Kelvin

$t_{1/2}$ – tempo de meia-vida do processo de inativação térmica

U/U_0 – Atividade relativa

U_0 – Atividade inicial

U^a – Atividade $g_{\text{açúcar redutor}}/(L \cdot \text{min} \cdot g_{\text{suporte}})$

U^b – Atividade $g_{\text{açúcar redutor}}/(L \cdot \text{min} \cdot g_{\text{enzima}})$

V – volume de solução de α -galactosidase utilizado na imobilização (L)

v – velocidade da reação

V_{max} – velocidade máxima da reação

X_{+1} – Valor da variável no nível superior no planejamento experimental

X_0 – Valor da variável no ponto central no planejamento experimental

X_1 – valor codificado da variável 1 no planejamento experimental

X_{-1} – Valor da variável no nível inferior no planejamento experimental

X_2 – valor codificado da variável 2 no planejamento experimental

X_3 – Valor codificado da variável 3 no planejamento experimental

X_n – valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$) no planejamento experimental

Y – atividade enzimática para o modelo de regressão múltipla

α_1 – razão entre a atividade específica da enzima ao final da primeira etapa do processo de desativação térmica em série (E_1) e a atividade inicial (E)

α_2 – razão entre a atividade específica da enzima ao final da segunda etapa do processo de desativação térmica em série (E_2) e a atividade inicial (E)

β_0 – valor médio da atividade no modelo de regressão múltipla

$\mu_{25^\circ\text{C}}$ – média de atividade da α -galactosidase imobilizada a 25°C

$\mu_{40^\circ\text{C}}$ – média de atividade da α -galactosidase imobilizada a 40°C

RESUMO

O uso de enzimas imobilizadas proporciona muitas vantagens em relação ao seu uso na forma livre. Dentre estas vantagens se destacam a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a sua fácil separação ao final do processo, a utilização em modo contínuo e o aumento de sua estabilidade. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de imobilizar a enzima α -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca iônica e avaliar a sua atividade catalítica. Inicialmente, foram feitos testes preliminares de imobilização em 5 tipos de resinas: Amberlite 252-Na, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C, Duolite A-568 e Duolite S-761. Pelos resultados obtidos, Duolite A-568 foi selecionada como melhor suporte e, portanto, estudos foram feitos para a otimização do processo de imobilização nesta resina. Glutaraldeído na concentração de 1% (v/v) foi utilizado anteriormente ao processo de adsorção da enzima e melhorou a estabilidade operacional da α -galactosidase imobilizada. Testes preliminares não indicaram diferença do processo de imobilização para temperaturas de 25 e 40°C. Realizou-se um planejamento fatorial completo e um planejamento composto central para estudar as melhores condições de imobilização variando-se o pH, concentração de α -galactosidase e tempo de imobilização. Os resultados obtidos levaram a utilizar as seguintes condições de imobilização: pH 4,5, concentração de α -galactosidase de 15 g/L e tempo de imobilização de 3 horas. A temperatura de máxima atividade enzimática foi 60°C tanto para a enzima livre quanto imobilizada. O valor da energia de ativação encontrado pelo ajuste linear da equação de Arrhenius foi de 5,66 kcal/mol para α -galactosidase solúvel e 4,48 kcal/mol para α -galactosidase imobilizada. A faixa de pH ótimo obtido para a enzima livre foi 4,0-6,0 e para a enzima imobilizada foi 3,0-6,0. O processo de imobilização melhorou a atividade da α -galactosidase para pHs mais alcalinos. A análise de resistência ao pH mostrou que ambas as formas da enzima foram resistentes para as faixas estudadas (3,5 a 7,5 para livre e 3,0 a 8,0 para imobilizada). No entanto, a resistência térmica do biocatalisador retido no suporte foi menor. O estudo cinético sem inibição apresentou valores de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) próximos para as duas formas da α -galactosidase (194,5 U para livre e 187,7 U para imobilizada), porém o K_m da forma imobilizada foi maior que o da livre (18,8 g/L e 12,5 g/L de rafinose, respectivamente). A reação de hidrólise da rafinose foi inibida pela adição dos produtos da reação, sacarose e galactose, sendo que os resultados de inibição por galactose apontam para o tipo de inibição competitiva. Por fim, testes de estocagem da α -galactosidase imobilizada mostraram que a enzima manteve sua atividade mesmo após 145 dias mantida a temperatura de 4°C.

Palavras-chave: α -galactosidase, imobilização de enzimas, resina de troca iônica, Duolite A-568, rafinose.

ABSTRACT

Immobilized enzymes provide many advantages when compared to the usage of their free forms. Among these ones, remarkable advantages are the possibility of the biocatalyst reusability, easy separation at the end of the process, its usage in continuous way and the enhancement of its stability. This work was performed aiming the immobilization of the α -galactosidase enzyme from *Aspergillus niger* in ion exchange resin and the evaluation of its catalytic activity. Firstly, tests were performed in five different resins: Amberlite 252-Na, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C, Duolite A-568 e Duolite S-761. According to the results, Duolite A-568 was chosen as the best support. Therefore, studies were done aiming the optimization of the immobilization process in this resin. Glutaraldehyde 1% (v/v) was used before the enzyme adsorption process and it enhanced the operational stability of the immobilized enzyme. Preliminary tests did not showed difference for the immobilization process at the temperatures of 25 and 40°C. A full factorial design and a central composite design were performed to study the best immobilization conditions varying the pH, the α -galactosidase concentration and the immobilization time. The results led to use the following immobilization conditions: pH 4.5; 15 g/L of α -galactosidase and 3 hours of immobilization. The temperature of maximum activity occurred at 60°C for both free and immobilized enzyme. The activation energy calculated by linear adjustment of *Arrhenius* equation was 5.66 kcal/mol for soluble α -galactosidase and 4.48 kcal/mol for immobilized α -galactosidase. The optimum pH range obtained for free enzyme was 4.0-5.0 and for immobilized enzyme it was 3.0-6.0. The immobilization process improved the α -galactosidase activity in alkaline pHs. Analysis of pH stability showed that both forms of enzyme were resistant for the pH ranges studied (3.5 to 7.5 for free and 3.0 to 8.0 for immobilized). However, the thermal stability of the biocatalyst immobilized in the support decreased. The kinetic studies without inhibition showed closed values of maximum speed (V_{max}) for both enzyme forms (194.5 U for free and 187.7 U for immobilized). Although, the *Michaelis-Menten* constant (K_m) of immobilized enzyme was higher than the free one (18.8 and 12.5 g/L, respectively). The hydrolysis reaction of raffinose was inhibited by the addition of the reaction products, sucrose and galactose, and the results of inhibition by galactose pointed for the competitive inhibition type. Then, storage tests of immobilized α -galactosidase showed that the enzyme maintained its activity even after 145 days when kept at the temperature of 4°C.

Key-words: α -galactosidase, enzyme immobilization, ion exchange resin, Duolite A-568, raffinose.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Enzimas são extraordinários catalisadores, capazes de utilizarem uma variedade de moléculas complexas como substratos e apresentarem alto grau de seletividade, inclusive para compostos enantiômeros. Esta alta seletividade proporciona eficiência catalítica aliada à produção de poucos subprodutos e isto faz das enzimas uma alternativa ecológica para a substituição de convencionais catalisadores químicos (SCHMID *et al.*, 2001).

A maioria das enzimas utilizadas em processos industriais apresentam ação hidrolítica, sendo utilizadas na degradação de diversas substâncias naturais. Dentro deste grupo, as proteases e as carbohidrolases estão entre as mais utilizadas devido à suas aplicações nas indústrias de detergente, têxteis e de alimentos (KIRK *et al.*, 2002). Na indústria alimentícia diversas enzimas são aplicadas aos processos de produção. A invertase é utilizada na produção de açúcar invertido, uma mistura de frutose e glicose (monossacarídeos) obtida a partir da hidrólise da sacarose (dissacarídeo). Os monossacarídeos apresentam algumas propriedades mais interessantes para processos industriais, tais como maior poder adoçante, maior solubilidade e baixa viscosidade (MARQUEZ, 2007). A β -galactosidase é utilizada na hidrólise da lactose presente em produtos lácteos produzindo glicose e galactose. A remoção da lactose melhora a digestibilidade destes produtos em pessoas que apresentam intolerância à lactose (FREITAS *et al.*, 2011).

Uma alternativa às pessoas que apresentam intolerância à lactose é a substituição de produtos lácteos por aqueles à base de soja. Como exemplo, já existem no mercado leite de soja, creme de leite e leite condensado de soja e até mesmo chocolate feito desta leguminosa. A soja por sua vez contém oligossacarídeos da família da rafinose que quando ingeridos podem causar desconfortos gastrointestinais, uma vez que estes carboidratos são fermentados por micro-organismos presentes na mucosa intestinal com consequente produção excessiva de gases. A enzima α -galactosidase hidrolisa a ligação glicosídica galactose α -1,6 presentes nestes oligossacarídeos e produz açúcares facilmente digeridos pelo organismo humano (OKUTUKU *et al.*, 2010). Portanto, esta enzima apresenta um grande potencial de aplicação em indústrias alimentícias que fabricam alimentos à base de soja (BRASIL *et al.*, 2010; NAGANAGOUDA e MULIMANI, 2006; VIANA *et al.*, 2005). A α -galactosidase também pode ser aplicada ao processo de produção de açúcar de beterraba. A presença natural da

rafinose neste vegetal dificulta o processo de cristalização da sacarose no melaço. Portanto a utilização desta enzima na fabricação deste açúcar remove altas concentrações da rafinose e consequentemente aumenta o rendimento do processo (PESSELA *et al.*, 2008; NAGANAGOUDA e MULIMANI, 2006; LINDEN, 1982).

O uso da α -galactosidase não se restringe apenas às indústrias alimentícias. Na medicina, pesquisas vêm sendo realizadas para o tratamento da doença de Fabry, que ocorrem em pessoas deficientes desta enzima, a qual é responsável pela remoção do glicosfingolípídeo globotriaosilceramida. O acúmulo desta substância proporciona diversos problemas renais, cardíacos e cerebrais (LINTHORST *et al.*, 2004). Esta enzima também pode ser utilizada para conversão do sangue tipo B em sangue tipo O pela remoção da molécula de galactose ligada ao antígeno do sangue B. Esta aplicação atenuaria os problemas de falta de bancos de sangue para transfusão (HOBBS *et al.*, 1995).

Os processos catalíticos envolvendo o uso de enzimas são restringidos devido ao alto custo do biocatalisador, dificuldades de sua recuperação ao final do processo e instabilidade. Uma alternativa à estes problemas é a imobilização enzimática. A retenção do biocatalisador em um suporte permite a sua reutilização, possibilidade de operar sistemas em modo contínuo, redução de custos de processos e em alguns casos aumento da estabilidade enzimática. As técnicas apropriadas de imobilização envolvem o estudo de diversos suportes e das variáveis que influenciam na imobilização, uma vez que o comportamento da enzima no suporte é difícil de ser previsto (LOPEZ *et al.*, 2010; OZDURAL *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 - Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o desempenho da enzima α -galactosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em suporte de troca iônica. Os objetivos específicos são apresentados abaixo:

2.2 - Específicos

- Avaliar a influência das variáveis temperatura, pH, concentração de enzima e tempo no processo de imobilização;
- Avaliar o efeito do glutaraldeído como agente reticulante do processo de imobilização da enzima;
- Comparar a cinética, atividade e estabilidade da α -galactosidase em sua forma livre com a forma imobilizada em função do pH e temperatura;
- Estudar a cinética da reação de hidrólise da rafinose para α -galactosidase imobilizada na presença de produtos da reação;
- Determinar a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao tempo de estocagem.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Enzimas

As enzimas são polímeros biológicos que catalisam a conversão de um ou mais substratos em compostos (produtos) diferentes mediante a aceleração da velocidade da reação não catalisada correspondente por fatores da ordem de pelo menos 10^6 (MURRAY *et al.*, 2007). Assim como todos os catalisadores, estas biomoléculas não são consumidas ao final da reação.

A reação enzimática ocorre em um local específico da enzima, denominado sítio ativo. O poder catalítico de determinada enzima depende da integridade da sua estrutura conformacional nativa. Com exceção de algumas moléculas de RNA, denominadas ribozimas, todas enzimas são de natureza proteica e portanto, a eficiência das enzimas dependem das suas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. O peso molecular das enzimas, assim como de outras proteínas varia entre aproximadamente 12 kDa até 1000 kDa (NELSON e COX, 2000).

As enzimas têm sido utilizadas desde a antiguidade, principalmente nos processos fermentativos de produção de pães, queijos, vinhos, cervejas, vinagre e na produção de manufaturados como couro e linho (KIRK *et al.*, 2002).

Atualmente as enzimas são amplamente utilizadas em escala industrial em diferentes processos: síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e antibióticos, tecnologia de alimentos, aplicações farmacêuticas, bioconversão, potencialidade energética e outras (CABRAL, 1982). O sucesso de aplicação dos biocatalisadores em escala industrial se explica devido às diversas vantagens que estes apresentam quando comparados aos catalisadores químicos convencionais. Dentre estas, podem-se destacar o alto nível de eficiência e alta especificidade, o que permite às enzimas serem aplicadas em processos sem que ocorram perturbações devido a outras reações indesejáveis resultando na produção de um produto específico. Isto favorece um alto rendimento e proporciona a redução de custos adicionais. Além disso, as enzimas geralmente operam sob condições brandas de pH, temperatura e pressão com taxas de reação da ordem daquelas alcançadas por catalisadores químicos convencionais em condições extremas. Isto faz com que ocorra economia com gastos

energéticos e, portanto, redução de custos. Os biocatalisadores também praticamente não apresentam problemas com relação a seu descarte uma vez que são facilmente biodegradáveis (COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; KRAJEWSKA, 2004; SCHIMIDT *et al.*, 2001).

A União Internacional de Bioquímicos desenvolveu um sistema de nomenclatura para classificar as enzimas quanto ao tipo de reação que estas catalisam. Ao todo, existem seis grandes grupos de classificação, as quais estão apresentadas na Tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Classificação das enzimas segundo o tipo de reação catalisada.

Classe	Função
Oxidoredutases	Reações de oxidações e reduções
Transferases	Transferências de componentes como grupos glicosil, metila ou fosforila
Hidrolases	Clivagem hidrolítica de ligações C-C; C-O, C-N e outras
Liases	Clivagem de ligações C-C; C-O; C-N e outras mediante a eliminação de átomos, o que resulta em ligações duplas
Isomerases	Catalisam alterações geométricas ou estruturais no interior de uma molécula
Ligases	Catalisam a união de duas moléculas acoplada à hidrólise de ATP

Fonte: MURRAY *et al.*, 2007.

As enzimas são comumente utilizadas na indústria de alimentos. Isto se justifica não apenas pelas características de alta seletividade e condições brandas de aplicação, mas também porque devido à sua natureza proteica podem ser considerados mais seguros do que aditivos químicos convencionais. Inúmeros são os usos de enzimas na tecnologia de alimentos e entre as principais aplicações, estão o uso de amilases, peptidases, pectinases e isomerases. A Tabela 3.2 apresenta algumas destas aplicações.

Tabela 3.2 – Principais enzimas comercializadas e aplicadas na indústria de alimentos.

Enzima	Aplicação
α -amilase, amilo—glicosidase, β -amilase	Sacarificação do amido, em panificação ou produção de xaropes
Catalase	Eliminação da água oxigenada no processamento de alimentos
Celulases, β -glicanases, α -amilases, peptidases, amilases maltogênicas	Liquefação, clarificação e suplementação das enzimas do malte na produção de cerveja
Lipase	Desdobramento de óleos e gorduras, principalmente em laticínios
Glicose-isomerase	Produção de isoglucanase (<i>High Fructose Syrup</i>)
Hemicelulases ou xilanases	Hidrólise da hemicelulose no uso de resíduos celulolíticos
Invertase	Inversão da sacarose
Lactase	Hidrólise da lactose (laticínios)
Renina ou coalho microbiano	Precipitação da caseína do leite, produção de queijo
Naringinase	Remoção do amargo em cítricos
Pectinases	Fermentação do cacau, extração de óleo de oliva, clarificação e extração de sucos e vinhos, maceração de polpas, extração de óleos vegetais
Celulases	Produção de açúcares, solubilização de parede celular, extração de óleos vegetais
Peptidases, tripsina, aminopeptidases	Produção de proteína hidrolisada, maturação de queijos, tenderização, cura de carnes e hidrólise de vários produtos à base de proteínas

Fonte: BON *et al.*, 2008

Indústrias têxteis também têm aplicado biocatalisadores em seus processos com o objetivo de reduzir o consumo de água, o gasto energético e a carga poluidora (CHEN *et al.*, 2007). As enzimas ainda se aplicam nas indústrias de detergentes, que representam as maiores

consumidoras destes bioprodutos, na produção de etanol a partir de fontes de amido e também em indústrias de óleos e gorduras (KIRK *et al.*, 2002).

3.2 - α -galactosidase

A enzima α -galactosidase (α -D-galactosil galactohidrolase E.C.3.2.1.22) é uma exo-glicosidase que hidrolisa ligações galactose- α -1,6, as quais estão presentes em inúmeros substratos tais como oligossacarídeos da família da rafinose (Figura 3.1), polissacarídeos e substratos sintéticos como o p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo. Esta enzima ainda atua em glicoconjugados, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos. Alguns tipos de α -galactosidase catalisam reações de transgalactosilações, principalmente em altas concentrações de substrato. Esta enzima é de particular interesse nas áreas de tecnologia de alimentos, medicina e síntese enzimática (GOTE *et al.*, 2006).

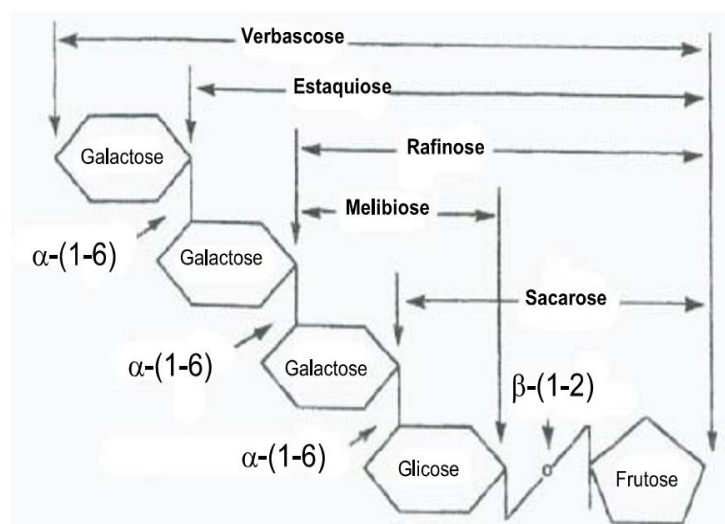


Figura 3.1 – Diferentes substratos da α -galactosidase contendo ligações galactose α -1,6.

Fonte: REIS (2007).

3.2.1 – Estrutura da α -galactosidase

Existem inúmeras formas e tipos de enzimas que hidrolisam as ligações galactose α -1,6 e que por isso recebem o nome de α -galactosidase. A estrutura e o peso molecular assim como as características físico-químicas variam dependendo da fonte produtora. Em alguns casos, uma mesma fonte produz formas multimoleculares da enzima. Quatro tipos desta enzima produzidos pelo fungo *Aspergillus niger* foram identificados. As α -galactosidases II, III e IV são formadas por duas subunidades de 64 kDa cada e pertencem à família 27 do

grupo das glicosil hidrolases. Estas três α -galactosidases são muito similares e apresentam valores de faixa de pH ótimo e pontos isoelétricos muito próximos. No entanto, este fungo produz um tipo desta enzima com características muito diferentes. A α -galactosidase I é formada por quatro subunidades de 94 kDa cada e apresenta atividade ótima para pHs mais alcalinos quando comparada às formas II, III e IV. Seu ponto isoelétrico (pI) é o mais distante das demais α -galactosidase. Além disso, a atividade catalítica da α -gal-I é muito diferente das formas α -gal-II, III e IV para diferentes substratos (ADEMARK *et al.*, 2001). Lee *et al.* (1970) já havia previsto a presença de mais de um tipo de α -galactosidase de *A. niger* e verificaram que os pontos isoelétricos destas variavam entre 4,1 a 4,7.

Alani *et al.* (1989) também observaram diferentes formas de α -galactosidase em *Vigna unguiculata* e novamente as enzimas apresentaram diferenças em suas atividades.

Estudos com α -galactosidase produzidas pelos fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796 e *Trichoderma reesei* RUT C-30 apresentaram massas moleculares de 77,3 kDa, 67,5 kDa e 50 kDa, respectivamente (FERREIRA, 2007; SHIVAM e MISHRA, 2010; ZEILINGER *et al.*, 1993).

A α -galactosidase de *Penicillium oxalicum* SO apresentou peso molecular de 124 kDa (KURAKEKE *et al.*, 2011).

Gote *et al.* (2006) verificaram que *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) produz uma α -galactosidase que contém duas subunidades de 80 kDa e 166 kDa.

A estrutura da α -galactosidase de *Trichoderma reesei* foi estudada por Golubev *et al.* (2004), que verificaram a presença de 417 aminoácidos, 17 resíduos de monossacarídeos e quatro sítios de N-glicosilação no domínio catalítico da enzima. Esta estrutura está apresentada pela Figura 3.2.

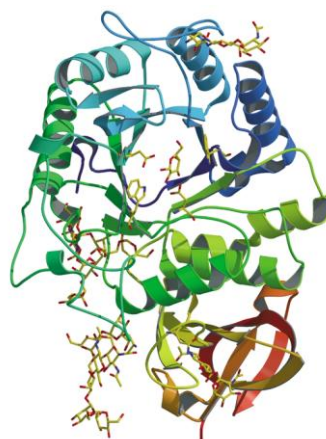


Figura 3.2 – Estrutura tridimensional da α -galactosidase produzida por *Trichoderma reesei* (GOLUBEV *et al.*, 2004).

3.2.2 – Fontes de α -galactosidase

- **Micro-organismos**

A α -galactosidase pode ser extraída de diversas espécies de fungos, leveduras e bactérias. Estas diferentes fontes têm sido estudadas por diversos autores (HU *et al.*, 2011; BAKUNINA *et al.*, 2006; GOTE *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2007; ADEMARK *et al.*, 2001; PUCHART *et al.*, 2000). Micro-organismos apresentam como vantagem em relação à outras fontes, alto rendimento na obtenção de enzimas (MANZANARES *et al.*, 1998).

A produção da enzima α -galactosidase por micro-organismos ocorre em meio de cultura seletivo, geralmente meio mineral líquido contendo uma fonte de carbono indutora da atividade enzimática. Açúcares como galactose, melibiose, rafinose e estaquiose já foram descritos como indutores da atividade de α -galactosidase (FERREIRA, 2007; REZENDE *et al.*, 2005)

As bactérias *Thermus* sp. (FILHO *et al.*, 2008) e *Pseudoalteromonas* sp. (BAKUNINA *et al.*, 2006) já foram utilizadas para produção de α -galactosidase.

Gote *et al.* (2006) purificaram α -galactosidase de *Bacillus sterothermophilus* (NCIM-5146) e estudaram suas características estruturais, parâmetros cinéticos e especificidade de substratos utilizando melibiose, rafinose, estaquiose e o substrato sintético p-Nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo. A enzima purificada foi capaz de hidrolisar ligações α -1-3, α -1-4 e α -1-6 de grupos galactosídeos.

Em muitos casos, a produção de enzimas de origem bacteriana é maior do que a de origem fúngica. Porém, as últimas são mais convenientes em aplicações tecnológicas principalmente em razão da sua produção ser extracelular. Esta característica facilita o processo de obtenção e purificação. Além disto, as enzimas de origem fúngica são mais estáveis e apresentam atividade ótima em pH ácido, o que também contribui para a sua utilização em processos industriais (MANZANARES *et al.*, 1998; GÓES e RIBEIRO, 2002).

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos sobre obtenção e utilização de biocatalisadores de diversos fungos. Puchart *et al.* (2000) produziram e purificaram α -galactosidase a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* utilizando glicose como principal fonte de substrato. Thippeswamy e Mulimani (2002) imobilizaram α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* para remoção de oligossacarídeos em extrato hidrossolúvel de soja. Cao

et al. (2007) obtiveram α -galactosidase de *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795 altamente resistente à ação de proteases, apresentando portanto, um grande potencial de aplicação em indústrias de alimentos. Os trabalhos de Kurakeke *et al.* (2011) e Falkoski *et al.* (2006) foram feitos utilizando fungos do gênero *Penicillium* para produção da enzima.

Fungos, em particular do gênero *Aspergillus* são capazes de secretar grandes quantidades de enzimas e são fontes de produção de biocatalisadores comercialmente importantes. Diversas espécies do gênero *Aspergillus* são produtoras de α -galactosidases. Entre estas espécies são citadas na literatura *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. niger* (RÍOS *et al.*, 1993; REIS, 2007; SHIVAM e MISHRA, 2010; SHANKAR e MULIMANI, 2007; SCIGELOVA e CROUT, 2000). Estas duas últimas espécies são as mais comumente utilizadas em processos tecnológicos para produção de produtos farmacêuticos, ingredientes de alimentos e enzimas (HU *et al.*, 2011). *A. niger* é amplamente utilizado na indústria para a produção de ácidos orgânicos e enzimas, dentre estas as α -galactosidases.

Diversos autores estudaram propriedades e características desta enzima proveniente do fungo *Aspergillus niger* (ADEMARK *et al.*, 2001; SCIGELOVA e CROUT, 2000; MANZANARES *et al.*, 1998; SOMIARI e BALOGH, 1995; LEE e WACEK, 1970).

- **Plantas**

Alfa-galactosidases também estão presentes em muitas plantas, as quais contêm grupos galactosil em oligossacarídeos. Estes açúcares são encontrados principalmente em sementes, onde desempenham a função de fontes energéticas primárias. Dentre estes sacarídeos podem estar presentes rafinose, estaquiose, melibiose e verbascose, os quais quando hidrolisados, produzem açúcares mais simples que podem ser facilmente metabolizados pela planta (DEY *et al.*, 1985).

A α -galactosidase também catalisa reações de transglicosilação para produção destes oligossacarídeos a partir de sacarídeos menores. A rafinose, por exemplo, pode ser utilizada como precursora para a síntese de estaquiose e verbascose. A enzima pode também estar presente em sementes maduras, onde atua na hidrólise enzimática da hemicelulose (ZEILINGER *et al.*, 1993).

Geralmente, as plantas apresentam diferentes formas moleculares desta enzima. Uma mesma espécie também pode produzir diferentes tipos de α -galactosidase. Estudos já foram feitos em diversos vegetais, como por exemplo em feijão (*Vigna unguiculata*) (ALANI *et al.*,

1989), grão de bico (*Cicer arietinum*) (MITTAL e SHARMA, 1991), *Tachigali multijuga* (FIALHO *et al.*, 2008), uva (*Vitis vinifera*) (KANG e LEE, 2001), arroz (*Oryza Sativa*) (KIM *et al.*, 2002) e café (MARRACCINI *et al.*, 2005).

Soh *et al.* (2006) caracterizaram α -galactosidase de papaia (*Carica papaya L.*). Os autores verificaram um aumento da concentração deste biocatalisador durante o amadurecimento do fruto. A enzima atuou na despolimerização e aumento da solubilidade da pectina. A correlação entre as mudanças de textura e o aumento da atividade e concentração da enzima assim como sua capacidade de modificar paredes celulares intactas indicaram que a α -galactosidase contribuiu no amadurecimento e amolecimento do fruto.

3.2.3 – Aplicações da α -galactosidase

Produtos à base de soja e de outras leguminosas como, por exemplo, feijão, contêm naturalmente galacto-oligossacarídeos da família da rafinose, que incluem além deste sacarídeo outros como estaquiase e verbascose. A α -galactosidase apresenta grande eficiência de remoção de grupos galactosil da cadeia molecular destes carboidratos.

O organismo humano não contém a enzima α -galactosidase em seu trato digestivo e portanto é incapaz de digerir os galacto-oligossacarídeos. Por sua vez, quando ingeridos, estes açúcares são fermentados por micro-organismos presentes na mucosa do intestino podendo promover a formação excessiva de gases, o que leva a desconfortos gastrointestinais e flatulência. Portanto, a α -galactosidase apresenta um grande potencial de aplicação na indústria alimentícia de produtos à base de soja, como por exemplo, leite de soja. A remoção dos oligossacarídeos pela ação da α -galactosidase melhora a digestibilidade destes produtos e consequentemente a aceitação destes por parte dos consumidores (PUCHART *et al.*, 2000; PESSELA *et al.*, 2008; NAGANAGOUDA e MULIMANI, 2006).

Girigowda e Mulimani (2006) compararam o percentual de remoção de oligossacarídeos de rafinose em leite de soja utilizando α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em suas formas livre e imobilizada. Quando incubadas por duas horas no leite de soja, as enzimas na forma livre e imobilizada reduziram o teor de oligossacarídeos em 88 e 75%, respectivamente. O desempenho da α -galactosidase imobilizada também foi testada em um reator de leiteo fluidizado em diferentes vazões, sendo obtida redução de até 92% destes açúcares para uma vazão de 25 mL.min⁻¹.

Viana *et al.* (2005) conseguiram remover 72 e 89% de rafinose e estaquiose, respectivamente, em farelo de soja após sua incubação a 40°C por 6 horas em solução contendo α -galactosidase. Brasil *et al.* (2010) estudaram os efeitos nutricionais da remoção de galacto-oligossacarídeos em farelo de soja utilizando α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1. Após 36 horas de tratamento enzimático houve redução total destes carboidratos. A dieta deste farelo apresentou maior digestibilidade em ratos quando comparados à dieta sem remoção dos oligossacarídeos.

Indústrias produtoras de açúcar de beterraba também apresentam grande potencial de aplicação da α -galactosidase. A formação de rafinose em beterraba é ativada a baixas temperaturas e, portanto, a quantidade deste carboidrato é maior em plantações de países de clima frio. Durante o processo de produção, a presença de rafinose inibe a taxa de cristalização da sacarose, prejudicando a obtenção do açúcar. Além disto, a forma do cristal de sacarose é modificada na presença de rafinose, sendo esta forma menos aceita pelos consumidores. Portanto, a aplicação de α -galactosidase em melaço de beterraba aumenta o rendimento do açúcar final e melhora a aceitação do produto pelos consumidores (LINDEN, 1982; PESSELA *et al.*, 2008).

Na medicina, a enzima apresenta um grande potencial no tratamento da doença de Fabry, que se caracteriza pelo acúmulo do glicoesfingolípido globotriaosilceramida nas células do corpo devido à deficiência da α -galactosidase A. Conforme Linthorst *et al.*, 2004, a falta da enzima fatalmente leva o paciente a uma esquemia cardíaca, cerebrovascular ou renal.

A α -galactosidase presente em alguns eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose da ligação α -1,3 terminal de glucanas utilizadas na conversão do sangue grupo B para sangue do grupo O. O que diferencia estes grupos sanguíneos é a presença de um resíduo terminal α -D-galactosil presente no antígeno B ligado à membrana do eritrócito. A hidrólise deste resíduo converte o antígeno B em H, característico do sangue O. Esta reação catalisada pela α -galactosidase transforma então, o sangue B em O. Portanto, esta enzima tem um grande potencial de uso na terapia de transfusão sanguínea (REIS, 2007; HOBBS *et al.*, 1995).

3.3 - Enzimas imobilizadas

Para que a aplicação de enzimas em processos industriais tenha sucesso é necessário que estas apresentem estabilidade e funcionabilidade. Estas características estão interligadas e dependem das condições do meio reacional. Fatores como pH, temperatura e força iônica do

meio podem modificar as ligações intramoleculares da proteína que compõe a enzima. Esta alteração modifica a estrutura conformacional da enzima e como consequência a atividade enzimática também pode ser alterada. Além disso, para que o uso de biocatalisadores em escala industrial seja viável, é importante que a recuperação destes ao final da reação seja possível, uma vez que enzimas apresentam um custo relativamente alto (DAVID *et al.*, 2006; GIRELLI e MATTEI, 2005; CAO *et al.*, 2003)

Uma alternativa eficiente para viabilizar o uso destas macromoléculas nas indústrias é a sua imobilização em um suporte insolúvel. As vantagens desta tecnologia aplicada incluem redução de custos, maior controle do processo, possibilidade de trabalhar em operação contínua e aumento da estabilidade enzimática (DAVID *et al.*, 2006; LÓPEZ *et al.*, 2010). No entanto, algumas alterações nas propriedades cinéticas da enzima imobilizada podem ocorrer (MARQUEZ *et al.*, 2008).

A imobilização enzimática consiste na retenção física do biocatalisador em um determinado suporte, com consequente retenção de sua atividade catalítica. Esta tecnologia permite a reutilização da enzima assim como a possibilidade de se operar um sistema de catálise enzimática em processo contínuo (CHIBATA, 1978). O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na sua forma solúvel (BON *et al.*, 2008).

A primeira imobilização enzimática de que se tem conhecimento ocorreu de forma inusitada quando Nelson e Griffin (1916) utilizaram carvão ativado com o intuito de purificar a solução biológica capaz de inverter a sacarose. Os pesquisadores verificaram que o carvão mantinha atividade de inversão do açúcar mesmo após diversas lavagens.

Em meados da década de 1960, pesquisadores perceberam que as enzimas poderiam ser utilizadas como catalisadores industriais para obtenção de alto rendimento e especificidade no processo. Para que isto fosse possível, novos suportes de melhor resistência química e mecânica foram desenvolvidos. Também foram estudados diferentes métodos de imobilização e observou-se que determinada enzima poderia apresentar diferentes atividades e cinética catalítica dependendo dos protocolos estabelecidos e suportes de imobilização utilizados. Foi neste período que iniciou-se a aplicação de enzimas em biorreatores contínuos de leito fixo e fluidizado (VIETH, 1994).

O uso de enzimas em tecnologia de processos é restrito devido à seu elevado custo, dificuldade de recuperação ao final do processo e instabilidade sob condições de operação. As enzimas solúveis são portanto, na maioria das vezes, economicamente inviáveis (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Através da imobilização o biocatalisador torna-se insolúvel devido à sua fixação em suportes sólidos obtendo como resultado um sistema heterogêneo. A heterogeneidade permite a recuperação e reutilização da enzima e separação dos produtos da reação (KRAJEWSKA, 2009).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em relação às enzimas solúveis são praticamente as relativas à catálise heterogênea. São vantagens do uso de enzimas imobilizadas (COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; BON *et al.*, 2008; BAKUNINA *et al.*, 2006; BERGAMASCO *et al.*, 2000):

- a) Aproveitar maior atividade catalítica por um maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo;
- b) Maior controle das variáveis do processo devido à possibilidade de operar o sistema de forma contínua, uma vez que o biocatalisador é retido no interior do reator e o substrato passa pelo leito catalítico em escoamento contínuo. Como alternativa, o sistema também pode ser operado em bateladas repetidas. Neste caso, a enzima imobilizada uma vez utilizada é transferida para o reator contendo nova solução de substrato;
- c) Facilidade de separação do catalisador ao final do processo, uma vez que a enzima fica retida no suporte insolúvel no meio de reação. Desta forma, é possível a retirada do substrato não convertido e dos produtos sem haver contaminação com a enzima ao final da reação;
- d) Aumentar a produtividade do processo. O uso de enzimas imobilizadas permite operar o sistema com uma alta concentração enzimática em menor volume de reator. Desta forma, o tempo de reação pode ser menor, o que contribui também para a não formação de produtos indesejáveis e contaminação do meio de reação;
- e) Em alguns casos, a retenção da enzima no suporte confere maior estabilidade ao pH e à temperatura;
- f) A reação em modo contínuo pode contribuir para redução dos efeitos de inibição pelo substrato e produto, uma vez que estes são removidos continuamente do reator;
- g) Facilitar a interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão, pela remoção do biocatalisador, se o sistema está em batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência se o processo é estabelecido continuamente.

Apesar de todas estas vantagens, o uso de enzimas imobilizadas pode apresentar alguns obstáculos. Dentre estes, podem ser citados (BON *et al.*, 2008; MARQUEZ, 2007; GIRIGOWDA e MULIMANI, 2006):

- a) Diminuição da atividade durante o processo de imobilização. A interação entre suporte e enzima envolve interações intermoleculares, podendo ser estas forças de Van Der Waals, ligações covalentes ou iônicas. Estas forças de atração ou repulsão entre o suporte e a enzima provocam alterações conformacionais da sua estrutura. Além disto, dependendo da orientação da ligação entre enzima e suporte, o sítio ativo pode ficar obstruído, dificultando a ligação com o substrato;
- b) Restrição do acesso do substrato ao sítio ativo. Como a imobilização reduz a mobilidade do biocatalisador no meio reacional, a acessibilidade ao substrato pode ser restringida. Também poderá ocorrer acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, o que possivelmente afetará a cinética de reações por efeitos de inibição pelo produto ou por alterações do pH no microambiente da enzima. Estes defeitos podem ser evitados ou diminuídos pela escolha do tipo de suporte e pelas condições operacionais do reator;
- c) Dificuldades operacionais do biorreator. O suporte poderá promover elevada queda de pressão ao longo do leito do reator. Além disto, substâncias em suspensão presentes no meio contendo o substrato podem se adsorver ao suporte e dificultar o acesso ao substrato, além de bloquear a passagem do fluido no reator.

3.4 – Métodos de imobilização de enzimas

Existem inúmeros métodos de imobilização enzimática. Cada metodologia deve atender essencialmente a duas funções: não catalítica e catalítica. A primeira consiste em obter um sistema enzima-suporte de fácil separação no processo, enquanto que a segunda se resume na capacidade de conversão dos substratos em produtos num tempo e espaço desejados. Estas duas particularidades direcionam a viabilidade de aplicação de determinada enzima imobilizada. A diversidade do processo, tais como diferentes tipos de substrato, tipos de reações, configurações do reator e características de escoamento exige determinada metodologia de imobilização que atenda às necessidades do processo (CAO, 2005).

Portanto, não existe um método universal de imobilização enzimática. O método deve-se basear na escolha de um suporte adequado ao processo, condições do meio de imobilização como por exemplo, pH, temperatura e força iônica e o tipo de enzima a ser utilizada. Para esta última variável, é importante saber que existem diferentes fontes de determinada enzima e as características como estabilidade, pH e temperatura ótima e atividade podem variar de uma fonte para outra (COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

As propriedades da enzima imobilizada são estabelecidas pelas interações das propriedades da enzima e do suporte. Esta interação proporciona características químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas para a enzima imobilizada (Figura 3.3).

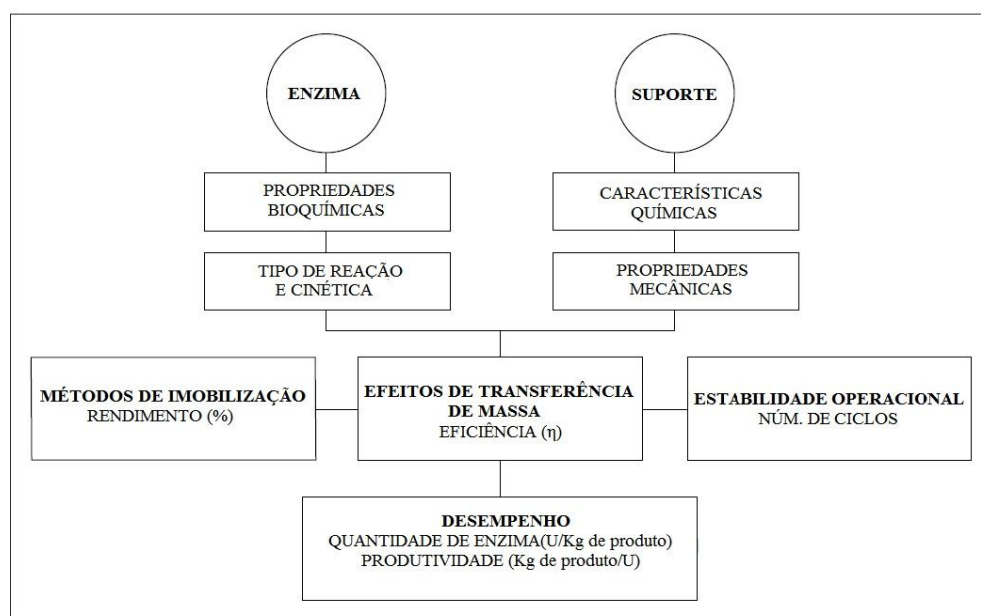


Figura 3.3 – Interação entre enzima e suporte (Adaptado de TISCHER e KASCHE,1999).

De modo geral, suportes de natureza hidrofóbica apresentam maior capacidade de retenção da molécula enzimática do que suportes hidrofílicos. Esta diferença se deve ao fato de que suportes hidrofílicos tendem a competir com a enzima pela água disponível no meio de reação (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Quanto à porosidade, os suportes podem ser classificados em dois grandes grupos: suportes de microporos, que são aqueles que apresentam tamanhos de poros menores que 100 nm, e suportes de macroporos, em que o tamanho dos poros é maior que 100 nm (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Os suportes porosos apresentam vantagens de apresentar elevada área de superfície e isto por sua vez favorece um maior percentual de retenção de enzima por grama de suporte.

No entanto, limitações à transferência de massa podem ocorrer. Já os suportes com baixa porosidade não apresentam esta desvantagem, uma vez que a difusão ocorre mais facilmente. Porém a pequena área de superfície específica pode resultar em baixas concentrações de enzima imobilizada por grama de suporte e isto por sua vez, pode levar à redução da atividade catalítica (KILINC *et al.*, 2002; TAVARES, 1998).

Existem inúmeros métodos de imobilização, e estes podem ser classificados em dois grandes grupos: (a) imobilização por ligação química e (b) imobilização por retenção física. No entanto, há protocolos que combinam as duas técnicas.

a) Imobilização por ligação química

As imobilizações por métodos químicos incluem principalmente a ligação enzima-suporte por (i) ligações covalentes e (ii) ligações cruzadas (*cross-linking*).

i) Ligações covalentes:

Envolvem normalmente grupos amino e carboxílicos dos aminoácidos e regiões com cargas eletrostáticas do suporte (MARTINS, 2007). É o método de imobilização mais aplicado, pois geralmente confere alta estabilidade à molécula de enzima, que pode apresentar maior resistência térmica, ao pH e à solventes orgânicos quando comparada à sua forma livre. Como a ligação covalente é forte, perdas de enzima por desprendimento ao suporte são minimizadas (CHIBATA, 1978).

O principal inconveniente do uso de protocolos que proporcionam a formação de ligações covalentes é a possível alteração da estrutura conformacional da enzima e do seu sítio ativo, levando à redução ou até mesmo perda total da atividade catalítica e mudanças na especificidade ao substrato (CHIBATA, 1978).

ii) Ligações cruzadas:

Envolvem ligações intercruzadas das moléculas de enzima para formação de uma estrutura tridimensional complexa. Em processos químicos estas ligações podem ser favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais. Um destes agentes é o glutaraldeído.

b) Imobilização por retenção física

Os métodos de retenção física podem ser divididos em (i) adsorção, (ii) ligação iônica e (iii) oclusão.

i) Adsorção:

Consiste na adsorção física da enzima na superfície de um suporte insolúvel em água por meio de interações intermoleculares do tipo de Van der Waals, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CHIBATA, 1978).

A adsorção geralmente envolve protocolos simples de imobilização. Além disto, é um método eficiente e não proporciona grandes alterações conformacionais da estrutura proteica. Porém, devido às fracas interações entre a enzima e o suporte, apresenta como desvantagem a possibilidade de ocorrer desprendimento do biocatalisador (KRAJEWSKA, 2009).

ii) Ligação iônica:

Este processo de imobilização envolve a interação de cargas dos resíduos de aminoácidos da enzima com grupos iônicos de cargas opostas do suporte. É um método simples de imobilização e comparável à adsorção com a exceção de que as forças das ligações enzima-suporte são mais fortes do que aquelas obtidas para adsorção física. As interações iônicas geralmente não provocam grandes mudanças na estrutura da proteína e, portanto, a atividade catalítica é bem conservada na maioria das vezes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A principal desvantagem do uso deste método também está relacionada ao desprendimento do biocatalisador durante a reação devido às mudanças de pH ou aumento da força iônica. Este problema pode ser minimizado com uso de agentes reticulantes, que proporcionam a formação de ligações covalentes enzima-suporte (FILHO *et al.*, 2008).

Um agente reticulante amplamente utilizado em protocolos de imobilização é o glutaraldeído (Figura 3.4). Este reagente funcional pode ser utilizado em imobilização iônica principalmente de duas maneiras: primeiramente pode ser feita a imobilização e posteriormente o suporte contendo a enzima é tratado com glutaraldeído. Outra alternativa é realizar a ativação do suporte com o glutaraldeído e em seguida imobilizar a enzima. Em ambos tratamentos, a enzima será ligada ao suporte principalmente através dos resíduos de lisina (que contêm grupamentos amino), presentes nas regiões superficiais mais negativas da

molécula proteica (FILHO *et al.*, 2008). Embora os dois métodos pareçam seguir mecanismos similares, o segundo tratamento reduz as modificações químicas da enzima para somente os grupos de lisina envolvidos na ligação, enquanto que no primeiro toda a superfície da molécula de enzima pode ser alterada (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).



Figura 3.4 – Molécula de glutaraldeído

iii) Oclusão:

O confinamento de enzimas por oclusão consiste em sua retenção em espaços intersticiais, podendo ser utilizado géis, fibras, cápsulas, filmes ou membranas (Figura 3.5). Este tipo de imobilização além de ser simples, proporciona pouca ou nenhuma alteração da estrutura molecular da enzima, que fica protegida por uma substância de alto peso molecular (CHIBATA, 1978; FABER, 1997).

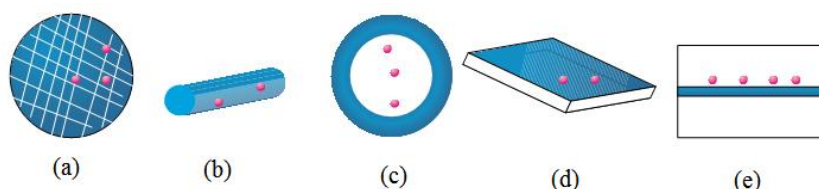


Figura 3.5 – Oclusão de enzima em gel (a), fibra (b), cápsula (c), filme (d) e membrana (e).
Fonte: CAO *et al.*, 2003.

A principal vantagem da oclusão de enzimas é que este método de imobilização proporciona poucas alterações de sua estrutura conformacional. Além disto, a proteção da enzima por substâncias de alto peso molecular pode aumentar a sua resistência à temperatura e à variações de pH ou aumento da força iônica do meio reacional. No entanto, poderão ocorrer limitações de transferência de massa do substrato e produtos da reação, o que diminui a eficiência catalítica da enzima (FABER, 1997; KENNEDY e CABRAL, 1987).

Naganagouda e Mulimani (2006) adsorveram α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em fibras de gelatina contendo alginato de cálcio. Os pesquisadores utilizaram glutaraldeído como agente reticulante.

Também são encontrados na literatura trabalhos de imobilização da α -galactosidase em gel de poliacrilamida (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002; THANANUNKUL *et al.*, 1976).

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 – Enzima

Utilizou-se a enzima α -galactosidase (E.C 3.2.1.22) StartMax[®] AGSL cedida pela empresa Prozyn Biosolutions[®] (Figura 4.1). Esta enzima é produzida por fermentação controlada de *Aspergillus niger*. O produto foi armazenado sob refrigeração a 6°C em recipientes fechados. Segundo especificações do fabricante, o pH ótimo da enzima está compreendido entre 4,5 a 5,5 e a faixa de temperatura ótima é de 55°C a 60°C.

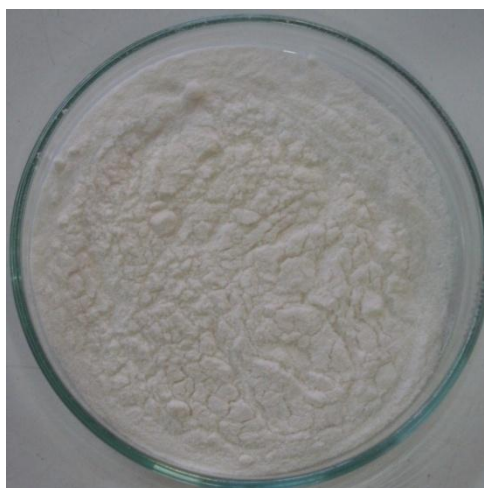


Figura 4.1- Enzima α -galactosidase usada na hidrólise da rafinose.

4.1.2 – Suportes para imobilização

Cinco tipos de suportes de troca iônica foram testados para seleção daquele que apresentasse maior atividade da α -galactosidase imobilizada: Amberlite 252-Na, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C, Duolite A-568, Duolite S-761. Estes suportes foram adquiridos da empresa Dow Chemical[®].

- Amberlite 252-Na: Trocador catiônico, baseado em ligação cruzada de poliestireno sulfonado. Comercialmente utilizada no tratamento de condensados, desmineralização, descalcificação e tratamento de soluções oxidantes.

- Dowex Marathon A: Resina fortemente básica com tamanho de partículas uniforme. É muito utilizada em aplicações de desmineralização.

- Dowex Marathon C: Trocador catiônico fortemente ácido com alto potencial de aplicações em indústrias de abrandamento e desmineralização.

- Duolite A-568: É um trocador aniônico fracamente básico, baseado em ligação cruzada de fenol-formaldeído usado como suporte de enzimas em aplicações de bioprocessos.

- Duolite S-761: É um trocador aniônico fracamente básico, utilizado para remoção de proteínas e impurezas orgânicas com aplicação comercial na purificação de fármacos.

Antes de realizar a imobilização enzimática, as resinas foram ativadas segundo procedimentos descritos abaixo, os quais foram estabelecidos pelo fabricante:

- Amberlite 252-Na e Dowex Marathon C: foram ativadas com cinco volumes de ácido sulfúrico 5% por volume de leito de resina.

- Dowex Marathon A: foi ativada com seis volumes de hidróxido de sódio 3% por volume de leito de resina.

- Duolite A-568 e Duolite S-761: foram ativadas com uma solução de ácido clorídrico 1M, seguido de hidróxido de sódio 1M utilizando nas duas etapas 10 volumes de solução por volume de resina.

As resinas foram lavadas com água destilada ao final de cada processo de ativação e entre as etapas de tratamento ácido e básico das resinas Duolite A-568 e Duolite S-761.

As principais características indicadas pelo fabricante do suporte Duolite A-568 (Figura 4.2), a qual foi selecionada como suporte de imobilização da α -galactosidase, estão apresentadas na Tabela 4.1.



Figura 4.2 – Resina Duolite A-568 empregada para imobilização da enzima α -galactosidase.

Tabela 4.1 – Características da resina Duolite A568 (Dow Chemical®).

Matriz	Fenol-formaldeído
Grupo Funcional	Amina terciária
Aspecto Físico	Grânulos de cor verde-cinza
Capacidade de Retenção de Água	62-67 %
Massa Específica	1,10-1,14 g/L
Tamanho da Partícula	0,15-0,85 mm
Diâmetro do Poro	30 – 50 nm
Volume do Poro	0,78 – 1,0 mL/g
Capacidade Total de Troca Iônica	1,20 equivalente/L

4.1.3 – Substrato

Nos ensaios de hidrólise utilizou-se rafinose-D(+) penta-hidratada de grau analítico 98% como substrato, a qual foi adquirida da empresa Vetec®.

4.1.4 – Agente reticulante

Glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante. Este foi adquirido da empresa Quimibrás S.A.® em frasco contendo solução a 25%.

4.1.5 – Unidade experimental

As reações enzimáticas foram realizadas utilizando um microrreator do tipo batelada, contendo uma camisa externa para controle da temperatura através de um banho termostático. O volume útil do reator era de 100 mL. O reator foi colocado sobre um agitador magnético para garantir uma homogeneização do meio de reação.

Um cesto de aço inox de mesh 100; 2,5 cm de diâmetro e altura de 5,0 cm foi colocado no interior do reator para conter a resina nas reações de hidrólise utilizando a enzima imobilizada. Um termômetro de mercúrio foi acoplado ao reator para conferir a temperatura do meio. A unidade experimental é mostrada na Figura 4.3.



Figura 4.3 – Unidade experimental utilizada nos experimentos.

4.2 – Metodologia

4.2.1 – Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método colorimétrico do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILER, 1959).

O método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico do sacarídeo a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom forte.

A análise consistiu na adição de 0,5 mL de amostra hidrolisada nos tubos Folin Wu juntamente com 1mL de DNS. A seguir as amostras foram aquecidas durante cinco minutos em banho com água fervente e em seguida, resfriadas em banho de gelo. Os volumes dos tubos foram completados para 12,5 mL e após homogeneização, a absorbância foi lida em espectrofotômetro modelo Shimadzu UVmini-1240 com comprimento de onda de 540nm, conforme Miller (1959). Os valores obtidos foram calculados com o auxílio de uma curva padrão, que correlacionava a concentração de proteína (enzima) com a absorbância (Apêndice A). As análises de cada ponto foram feitas em triplicata.

4.2.2 – Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada através do método de Lowry *et al.* (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. A curva de calibração foi feita utilizando soro de albumina bovina (BSA) e está apresentada no Apêndice A.

Para determinação da quantidade de enzima imobilizada no suporte, mediu-se a concentração de proteína presente no sobrenadante utilizado na imobilização antes e após o processo de imobilização ter sido concluído (Equação 4.1).

$$\alpha - \text{galactosidase}_{\text{suporte}} = ([\alpha - \text{galactosidase}_{\text{antes}}] - [\alpha - \text{galactosidase}_{\text{depois}}]) \cdot V \quad (4.1)$$

Em que:

α -galactosidase_{suporte} = quantidade de α -galactosidase retida no suporte (g);

$[\alpha$ -galactosidase_{antes}] = concentração de α -galactosidase no sobrenadante antes do processo de imobilização (g/L);

$[\alpha$ -galactosidase_{depois}] = concentração de α -galactosidase no sobrenadante depois do processo de imobilização (g/L);

V = volume de solução de α -galactosidase utilizado na imobilização (L).

4.2.3 – Determinação da atividade de α -galactosidase pelo método das taxas iniciais

A atividade enzimática foi mensurada pelo método das velocidades iniciais da reação de hidrólise da rafinose, a qual produz galactose e sacarose como produtos. O primeiro é um açúcar redutor enquanto que o segundo não.

As reações foram realizadas utilizando o microrreator da unidade experimental apresentada na Figura 4.3. Adicionou-se 50 mL de solução de rafinose a uma determinada concentração e pH. Ao atingir a temperatura desejada, adicionou-se a enzima, na forma livre ou imobilizada, para iniciar a reação. Para cada reação, foram tomadas sete amostras de 2 mL do meio reacional nos intervalos de tempos 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 25 min. Cada amostra foi

colocada em um tubo de ensaio, tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos para completa inativação da enzima, sendo depois colocado em um banho de gelo. Dosou-se o açúcar redutor formado pelo método DNS, conforme item 4.2.1. A taxa inicial de reação foi obtida pela inclinação da reta de concentração de açúcares redutores formados em função do tempo (Apêndice A).

Nos testes de hidrólise com α -galactosidase em sua forma solúvel, adicionou-se 2,5 mL de solução de enzima 10 g/L no meio de reação a fim de se atingir uma concentração de 0,48 g/L no reator. Quando α -galactosidase imobilizada foi empregada nas reações de hidrólise, utilizou-se 1,0 g da resina Duolite A-568 contendo a enzima imobilizada dentro do cesto no reator.

Até que fossem determinadas as condições ótimas de imobilização (resultados apresentados nos itens 5.1 a 5.4), a atividade foi definida como gramas de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de suporte (U^a) (Equação 4.2).

$$U^a = \frac{g_{\text{reductor}}}{L \cdot \text{min} \cdot g_{\text{suporte}}} \quad (4.2)$$

Uma vez determinadas as condições de imobilização, as atividades foram definidas como gramas de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de enzima (livre ou imobilizada) conforme Equação 4.3 (U^b). A quantidade de enzima imobilizada foi determinada pelo método de determinação de proteína descrito no item 4.2.2

$$U^b = \frac{g_{\text{reductor}}}{L \cdot \text{min} \cdot g_{\text{enzima}}} \quad (4.3)$$

A atividade relativa apresentada no decorrer deste trabalho é expressa por:

$$\text{Atividade relativa} = \frac{U}{U_0} \quad (4.4)$$

Em que:

U = Atividade observada

U_0 = Atividade de referência

As reações de hidrólise realizadas para os itens 4.2.6 a 4.2.8 foram feitas utilizando concentração de 6 g/L de rafinose no reator. Para todos os demais itens, esta concentração foi de 3 g/L. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.2.4 – Etapas experimentais

Todo este presente trabalho foi subdividido em duas etapas. A primeira consistiu na determinação das melhores condições de imobilização da α -galactosidase. Nesta etapa, foi feita a seleção do suporte de imobilização, estudo do glutaraldeído como agente reticulante e análise do efeito das variáveis temperatura, pH, tempo de imobilização e concentração de enzima no processo de imobilização da enzimática (Figura 4.4).

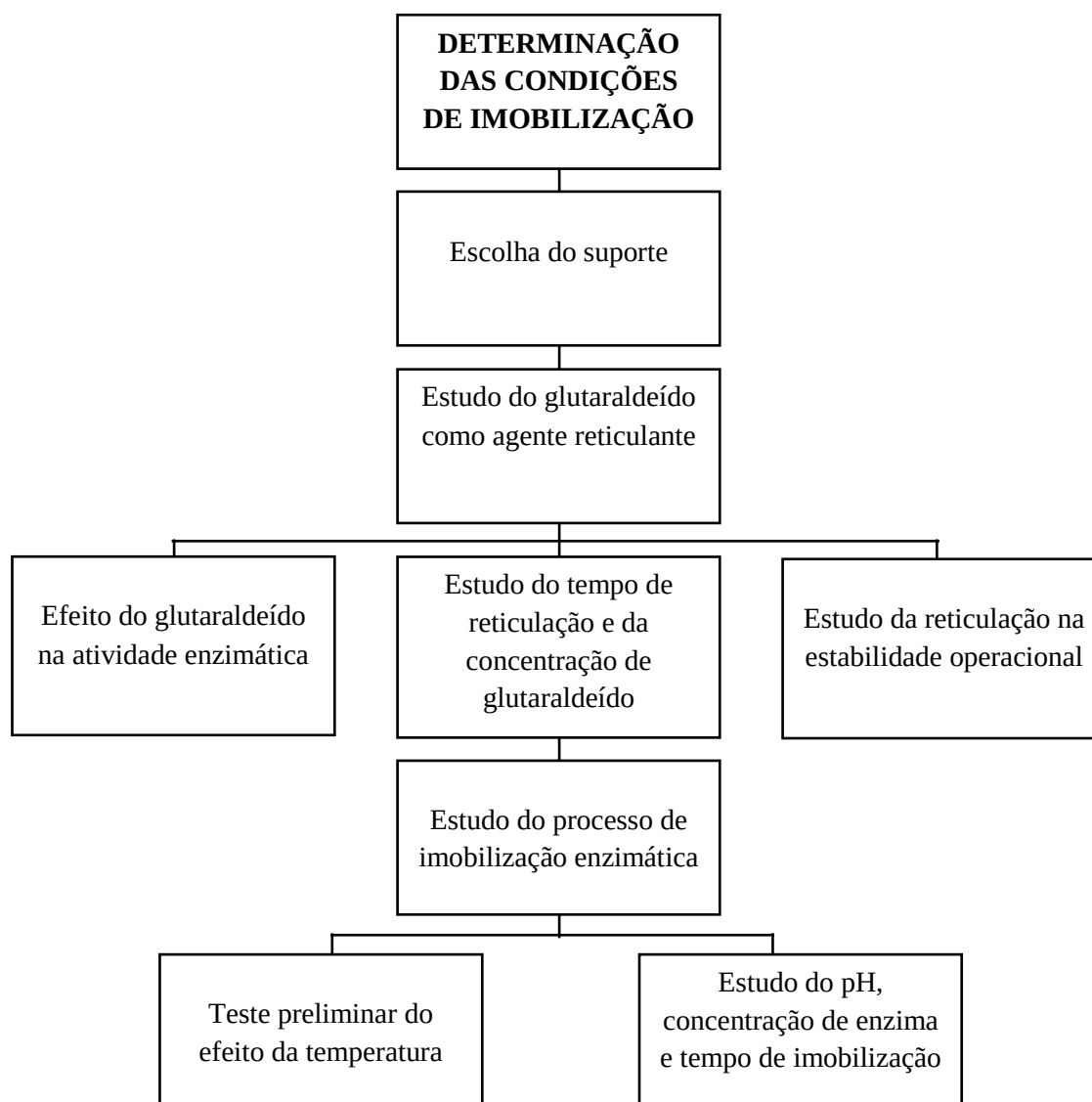


Figura 4.4 – Fluxograma da etapa de determinação das condições de imobilização

Uma vez, determinadas as condições de imobilização, procedeu-se a segunda etapa do trabalho, o qual consistiu no estudo comparativo da enzima livre e imobilizada em relação à atividade e estabilidade em função da temperatura e do pH, além do estudo da cinética sem inibição do modelo de Michaelis-Menten para as duas formas da α -galactosidase. Por fim, realizou-se um estudo da cinética de inibição da atividade do biocatalisador pelo produto galactose e análise da estabilidade de estocagem para a enzima imobilizada (Figura 4.5).

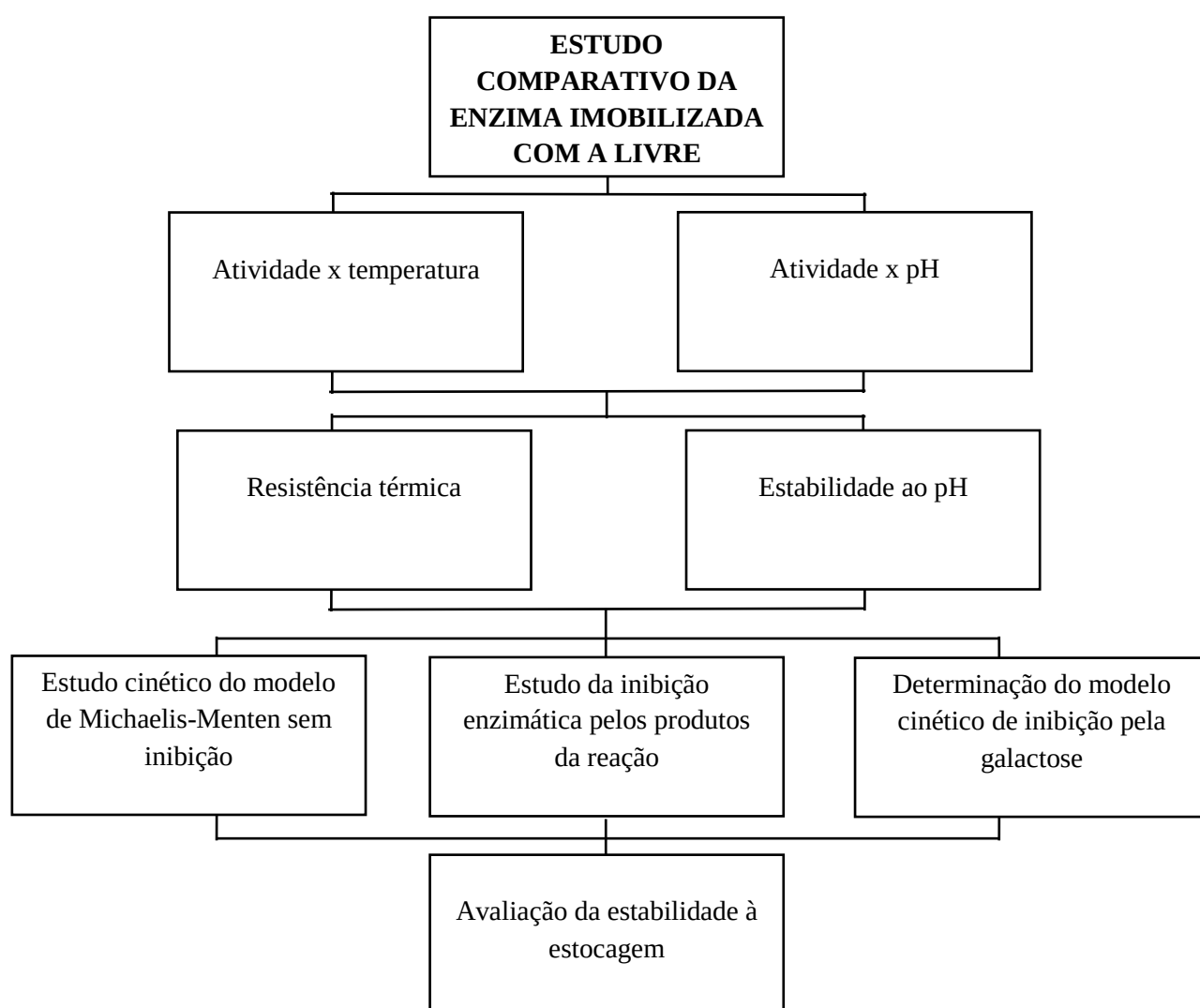


Figura 4.5 – Fluxograma da etapa do estudo comparativo da enzima imobilizada com a enzima livre

4.2.5 – Seleção do suporte de imobilização

Para escolha do melhor suporte de imobilização, pesou-se 1,0 g de cada resina em béqueres contendo 20 mL de solução da enzima a 5 g/L em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e posteriormente estes foram colocados em mesa agitadora a 120 rpm e mantidos a 40°C por 8 horas. Em seguida, as resinas foram filtradas e lavadas com a solução tampão pH 5,0 e em seguida, colocadas em dessecador para secagem. Após 48 horas, as atividades de cada amostra foram medidas a 40°C e pH 5,0 conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.6 – Estudo do uso de glutaraldeído como agente reticulante para o processo de imobilização enzimática

4.2.6.1 – Efeito do glutaraldeído na atividade da α -galactosidase imobilizada

Para verificar se o processo de ligação cruzada tinha algum efeito sobre a atividade da α -galactosidase imobilizada, foi realizado um estudo preliminar da influência do glutaraldeído para quatro tratamentos diferentes. Os tratamentos se diferenciaram quanto à sequência do método de imobilização/reticulação conforme descrito abaixo:

- Primeiro tratamento (sem glutaraldeído): Adicionou-se 1g de resina em um béquer contendo 20 mL de solução de enzima a 10g/L em tampão acetato pH 5,0 e em seguida colocou-se o sistema em mesa agitadora por 3 horas a 120 rpm.
- Segundo tratamento (glutaraldeído com enzima): Adicionou-se 1g de resina em um béquer contendo 20 mL de solução de enzima a 10g/L e glutaraldeído 1% (v/v) em tampão acetato pH 5,0. Em seguida colocou-se o sistema em mesa agitadora por 3 horas a 120 rpm.
- Terceiro tratamento (glutaraldeído antes da imobilização): Adicionou-se 1g de resina contida em um béquer contendo 20 mL de glutaraldeído 1% (v/v) em tampão acetato pH 5,0 a 120 rpm em mesa agitadora por 3 horas. Em seguida, a resina foi filtrada e lavada com o tampão pH 5,0. Posteriormente, foi realizado o processo de imobilização descrito no primeiro tratamento.
- Quarto tratamento (glutaraldeído depois da imobilização): Primeiramente foi realizado o processo de imobilização descrito no primeiro tratamento. Em seguida a resina foi filtrada e lavada com o tampão pH 5,0 e adicionou-se 20 mL de glutaraldeído 1% (v/v). O sistema foi colocado em mesa agitadora a 120 rpm por 3 hora.

Ao final de cada tratamento, mediu-se a atividade enzimática conforme especificado no item 4.2.3.

A faixa de concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação utilizados neste experimento preliminar foram escolhidos com base nos trabalhos de Filho *et al.* (2008), Girigowda e Mulimani (2006), Nanba *et al.* (1999) e Linden (1982);

Pelos resultados apresentados, realizou-se um novo experimento para determinação da concentração de glutaraldeído e do tempo de reticulação a ser utilizado no processo.

4.2.6.2 – Estudo da concentração de glutaraldeído e do tempo no processo de reticulação

Com o objetivo de otimizar a concentração de glutaraldeído e o tempo no processo de reticulação, elaborou-se um Planejamento Composto Central (PCC).

Este método científico de planejamento permite obter experimentos significativos e confiáveis com as vantagens de reduzir o tempo de experimentação assim como custo relativo à execução dos ensaios, uma vez que permite a otimização do número de experimentos. Além disto, o planejamento composto central permite uma otimização multivariada, minimiza o erro experimental e não requer conhecimentos elevados em estatística (OLIVEIRA, 2004).

Este tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada com 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) e cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de modo a se obter um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978)

O PCC, portanto, foi elaborado para duas variáveis (concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação) a dois níveis (2^2) com três réplicas no ponto central e 4 pontos axiais, totalizando 11 experimentos. Os níveis superiores (+1) para concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação foram 5,8 % (v/v) e 5,0 horas, respectivamente. Os níveis inferiores (-1) foram 0,4 % (v/v) e 1,0 hora para concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação, respectivamente. As faixas de tempo e concentração de glutaraldeído estão de acordo com o trabalho de Guidini (2009) que imobilizou β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na resina Duolite A-568. O alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,14744.

O processo de reticulação consistiu na adição de 1,0 g de Duolite A-568 em béquer contendo 20 mL de solução de glutaraldeído nas concentrações estabelecidas em tampão acetato pH 5,0. Os béqueres foram colocados em mesa agitadora a 120 rpm a temperatura de 25°C pelo tempo determinado no planejamento experimental.

Os cálculos dos valores codificados para as variáveis apresentadas são apresentadas pela Equação 4.5.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (4.5)$$

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$)

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

X_{+1} = valor da variável no nível superior;

X_{-1} = valor da variável no nível inferior.

O valor de α é calculado através da Equação 4.6 (BOX *et al.*, 1978) e foi automaticamente determinado pelo software *Statistica* 7.0.

$$\alpha = \frac{(QG)^{1/4}}{4} \quad (4.6)$$

Em que:

$$Q = [(G + T)^{1/2} - G^{1/2}]^2$$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no PCC; $T = 2k$ + número de réplicas centrais.

k = número de variáveis

O planejamento composto central está apresentado na Tabela 4.2

As Equações 4.7 e 4.8 são as equações codificadas para cada variável estudada no planejamento.

$$X_1 = \frac{(\text{Glutaraldeído}\%(\text{v/v}) - 3,1)}{\left[\frac{5,8 - 0,4}{2} \right]} \quad (4.7)$$

$$X_2 = \frac{([\text{tempo} - 3])}{\left[\frac{5 - 1}{2} \right]} \quad (4.8)$$

Tabela 4.2 – Matriz do PCC 2^2 com os valores codificados e originais das variáveis concentração de glutaraldeído (X_1) e tempo (X_2) para otimização do processo de reticulação.

Exp.	Valor Real (Valor Codificado)	
	X_1 Glutaraldeído % (v/v)	X_2 tempo de reticulação (h)
1	5,8 (+1)	1 (-1)
2	0,4 (-1)	1 (-1)
3	5,8 (+1)	5 (+1)
4	0,4 (-1)	5 (+1)
5	3,1 (0)	0,7 (- α)
6	3,1 (0)	5,3 (+ α)
7	0 (- α)	3 (0)
8	6,2 (+ α)	3 (0)
9	3,1 (0)	3 (0)
10	3,1 (0)	3 (0)
11	3,1 (0)	3 (0)

Uma vez realizado o processo de reticulação, as resinas foram filtradas e lavadas com tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e em seguida realizou-se o processo de imobilização utilizando 20 mL de solução de α -galactosidase a 10 g/L, 120 rpm, 40°C e tempo de imobilização de três horas. Finalizado o processo, as resinas foram filtradas e lavadas com o tampão e as atividades foram determinadas mantendo as condições do microrreator em pH 5,0 e 40°C.

Um teste *t-Student* foi aplicado à Equação 4.9 gerada pelo modelo para determinação do nível de significância de cada parâmetro, sendo aceitos como estatisticamente significativos somente aqueles que apresentaram valor-p maior que 10%. Pela análise estatística também foi possível obter o coeficiente de determinação (R^2) para constatação da significância do modelo ou não.

Superfícies de respostas foram geradas pelo software *Statistica 7.0*, utilizando a Equação 4.9 contendo somente os parâmetros significativos. A partir dessas superfícies foi

possível verificar uma região ótima para a atividade enzimática, a qual corresponde à combinação de uma faixa de valores das variáveis estudadas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} X_j X_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_j^2 \quad (4.9)$$

Em que:

Y = atividade enzimática

β_0 = valor médio da atividade;

k = número de variáveis independentes;

X = variáveis independentes

$b_j; b_{jm}; b_{jj}$ = parâmetros do modelo

4.2.6.3 – Efeito do glutaraldeído na estabilidade operacional da α -galactosidase imobilizada

Pelos resultados apresentados no item 4.2.5.2, decidiu-se estudar o efeito do glutaraldeído na estabilidade operacional da enzima ligada ao suporte de troca iônica.

Utilizando 1,0 g de Duolite A-568 contida em um béquer de 50 mL, realizou-se o processo de reticulação com 20 mL de solução de glutaraldeído 1 % (v/v) para um tempo de 1 hora de agitação a 120 rpm em mesa agitadora e 25°C. Após filtração e lavagem das resinas, procedeu-se a imobilização utilizando solução de α -galactosidase a 10 g/L, 120 rpm e 40°C.

Ao término do processo, a resina foi adicionada ao meio reacional sob agitação por 72 horas, sendo retirada nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 28, 48 e 72 horas para medição da atividade enzimática. Um experimento controle para a resina contendo a enzima imobilizada sem o processo de reticulação foi feito em paralelo. As condições do meio reacional foram mantidas a 40°C e pH 5,0.

4.2.7 – Estudo preliminar do efeito da temperatura na imobilização

Para verificar a influência da temperatura na imobilização da α -galactosidase foi realizado um experimento testando duas temperaturas diferentes de imobilização: 25°C e 40°C. Os experimentos foram feitos em triplicata e o teste *t-Student* de diferença de médias foi aplicado para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os dois tratamentos. O teste baseou-se nas análises da hipótese de nulidade (H_0) e hipótese alternativa (H_1) (Equação

4.10) a partir do valor de probabilidade (p-valor) calculado com o auxílio do software *Statistica 7.0*. O nível de significância determinado para este teste foi 5%. Portanto, para p menor ou igual a 5%, a hipótese H_0 , que afirma que a média de atividade para os dois tratamentos são iguais, deve ser rejeitada. Isto conseqüentemente leva a aceitação de H_1 . Por outro lado, para p maior que 5%, a hipótese H_0 é aceita e conseqüentemente, rejeita-se a hipótese H_1 .

$$H_0: \mu_{25^\circ\text{C}} \geq \mu_{40^\circ\text{C}} \quad (4.10)$$

$$H_1: \mu_{25^\circ\text{C}} < \mu_{40^\circ\text{C}}$$

Em que:

$\mu_{25^\circ\text{C}}$ = média de atividade da α -galactosidase imobilizada a 25°C

$\mu_{40^\circ\text{C}}$ = média de atividade da α -galactosidase imobilizada a 40°C

4.2.8 – Estudo da influência do pH, da concentração de α -galactosidase e do tempo no processo de imobilização

Com o propósito de obter experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um tratamento estatístico dentro de um planejamento fatorial (PF) para selecionar as melhores faixas de imobilização da α -galactosidase em relação às variáveis pH, concentração de enzima e tempo de imobilização. Adotou-se um teste de hipótese *t-Student* com área de rejeição de 10%.

Dois planejamentos foram realizados: Primeiramente realizou-se um planejamento fatorial completo a dois níveis e três variáveis (2^3) com três réplicas no ponto central, totalizando 11 experimentos. As variáveis para o planejamento estudado foram: pH, concentração de α -galactosidase e tempo de imobilização. Utilizou-se o software *Statistica 7.0* para análise dos dados. Os valores de nível superior (+1) para as variáveis pH, concentração de α -galactosidase e tempo foram 9,0; 15 g/L e 3 horas respectivamente. Os valores de nível inferior (-1) foram 5,0; 5 g/L e 1 hora para pH, concentração de enzima e tempo de imobilização, respectivamente. O intervalo de pH abrange a faixa de pH ótimo da enzima assim como a faixa de pH da resina Duolite A-568 de acordo com seus respectivos fabricantes. A faixa de concentração de enzima utilizada foi utilizada devido aos resultados obtidos nos itens 4.2.4, 4.2.5 e 4.2.6, em que se utilizaram concentrações de 5 g/L, 10 g/L e 15

g/L de α -galactosidase, respectivamente. A faixa de tempo foi escolhida de acordo com resultados obtidos em testes preliminares.

Os valores codificados das variáveis estudadas foram determinados a partir da Equação 4.5 e estão apresentadas pelas Equações 4.11, 4.12 e 4.13.

$$X_1 = \frac{(\text{pH} - 7,0)}{\left[\frac{9,0 - 5,0}{2} \right]} \quad (4.11)$$

$$X_2 = \frac{([\alpha - \text{galactosidase}] - 10)}{\left[\frac{15 - 5}{2} \right]} \quad (4.12)$$

$$X_3 = \frac{(\text{tempo} - 2)}{\left[\frac{3 - 1}{2} \right]} \quad (4.13)$$

O planejamento fatorial está apresentado pela Tabela 4.3. A regressão múltipla realizada pelo planejamento fatorial não levou em consideração o termo quadrático da Equação empírica apresentada no planejamento composto central (Equação 4.9). Foram considerados apenas as variáveis nos seus termos lineares e as interações entre estas (Equação 4.14).

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} X_j X_m \quad (4.14)$$

Em que:

Y = atividade enzimática

β_0 = valor médio da atividade;

k = número de variáveis independentes;

X = variáveis independentes

$b_j; b_{jm}$ = parâmetros do modelo

Tabela 4.3 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com os valores reais e codificados das variáveis para estudo do processo de imobilização.

Exp.	Valor Real (Valor Codificado)		
	X ₁ pH	X ₂ α -galactosidase (g/L)	X ₃ tempo de imobilização (h)
1	5 (-1)	5 (-1)	1 (-1)
2	9 (+1)	5 (-1)	1 (-1)
3	5 (-1)	15 (+1)	1 (-1)
4	9 (+1)	15 (+1)	1 (-1)
5	7 (0)	10 (0)	2 (0)
6	7 (0)	10 (0)	2 (0)
7	7 (0)	10 (0)	2 (0)
8	5 (-1)	5 (-1)	3 (+1)
9	9 (+1)	5 (-1)	3 (+1)
10	5 (-1)	15 (+1)	3 (+1)
11	9 (+1)	15 (+1)	3 (+1)

Foram considerados significativos apenas os parâmetros com nível de significância menor que 10% e superfícies de respostas foram geradas pelo software *Statistica 7.0*.

Pelos resultados obtidos pelo planejamento fatorial completo, decidiu-se estabelecer uma concentração de 15 g/L de enzima no processo de imobilização, uma vez que as atividades medidas para a enzima imobilizada nesta condição foram atisfatórias.

A análise dos dados apresentados para o primeiro planejamento levou a elaboração de um Planejamento Composto Central (PCC) para otimização das variáveis pH e tempo de imobilização.

As variáveis pH e tempo de imobilização foram estudadas neste novo PCC para dois níveis (2^3), sendo utilizadas três réplicas no ponto central e 4 pontos axiais, totalizando 11 experimentos. Os níveis superiores (+1) para pH e tempo de imobilização foram 7,0 e 6,0 horas, respectivamente. Os níveis inferiores (-1) foram 2,0 e duas horas para pH e tempo de imobilização, respectivamente. As faixas de pH e tempo de imobilização foram determinadas de acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial realizado anteriormente. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de modo a se obter um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978). O valor do alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,14744.

As Equações 4.15 e 4.16 são as equações codificadas para as variáveis estudadas no planejamento composto central e foram obtidas a partir da Equação 4.5.

$$X_1 = \frac{(\text{pH} - 4,5)}{\left[\frac{7,0 - 2,0}{2} \right]} \quad (4.15)$$

$$X_2 = \frac{(\text{tempo} - 4,0)}{\left[\frac{6,0 - 2,0}{2} \right]} \quad (4.16)$$

O planejamento composto central para otimização das faixas de pH e tempo do processo de imobilização está apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Matriz do PCC 2² com os valores codificados e originais das variáveis para otimização do processo de imobilização.

Exp.	Valor Real (Valor Codificado)	
	X ₁ pH	X ₂ tempo de imobilização (h)
1	2 (-1)	2 (-1)
2	2 (-1)	6 (+1)
3	7 (+1)	2 (-1)
4	7 (+1)	6 (+1)
5	1,63 (-α)	4 (0)
6	7,37 (+α)	4 (0)
7	4,5 (0)	1,7 (-α)
8	4,5 (0)	6,3 (+α)
9	4,5 (0)	4 (0)
10	4,5 (0)	4 (0)
11	4,5 (0)	4 (0)

Todos os experimentos foram conduzidos a 40°C e as atividades determinadas de acordo com o item 4.2.3. Superfícies de respostas foram geradas pelo software *Statistica 7.0* utilizando a Equação 4.9 de regressão múltipla contendo apenas os parâmetros significativos ($p < 10\%$).

A análise das superfícies de respostas permitiu verificar faixas de pH e tempo de imobilização de maior atividade e através destas, determinou-se as melhores condições de imobilização com relação à estas variáveis.

4.2.9 – Influência da temperatura na atividade da α -galactosidase

Para o estudo da influência da temperatura na atividade da α -galactosidase, foram realizadas hidrólises em meio reacional com temperatura na faixa de 25 a 71°C para a enzima livre e de 30 a 76°C para a enzima imobilizada. As atividades em cada temperatura foram medidas conforme item 4.2.3.

O pH do meio reacional foi mantido em 5,0 utilizando tampão acetato/ácido acético 0,1 M, o qual esteve compreendido na faixa de pH ótimo para a enzima tanto em sua forma livre como imobilizada.

As energias de ativação para as faixas de ativação térmica da enzima livre e imobilizada foram calculadas pela regressão linear dos valores de $\ln(k_d)$ em função de $1/T$ ajustados pela equação de *Arrhenius*, apresentada na Equação 4.17.

$$\ln(k_d) = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4.17)$$

Em que:

k_d = constante cinética de desativação térmica

A = constante pré-exponencial

E_a = Energia de ativação térmica

R = constante dos gases ideais

T = temperatura absoluta em Kelvin

4.2.10 – Influência do pH na atividade da α -galactosidase

Para o estudo da influência do pH na atividade da α -galactosidase, foram realizadas reações de hidrólises em meio reacional com pH na faixa de 3,5 a 7,5 para a enzima livre e de

3,0 a 8,0 para a enzima imobilizada. Utilizou-se estas faixas por abrangerem intervalos de pH além da faixa de pH ótimo da enzima fornecida pelo fabricante.

Para pH 3,0 e 3,5 utilizou-se tampão citrato/fosfato 0,1 M. Tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M foi utilizado para faixa de pH de 4,0 a 5,5 e fosfato de sódio monobásico/bibásico 0,1 M foi utilizado para faixa de pH entre 6,0 e 8,0.

As atividades em cada pH foram medidas conforme item 4.2.3. A temperatura do meio reacional foi mantida a 40 °C, a qual foi escolhida por apresentar boa atividade e estar afastada da região de desnaturação térmica.

4.2.11 – Estabilidade ao pH

Nas análises de resistência ao pH da enzima livre, preparou-se 10 g/L de α -galactosidase em soluções tampões nos respectivos pHs: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. Uma alíquota de 10 mL das soluções da enzima foram contidas em tubos de ensaio e posteriormente mantidas em banho termostatzado a 25°C por 36 horas. Após este período, a atividade de cada enzima incubada foi determinada conforme item 4.2.3 a 40°C.

Para a análise de resistência ao pH da α -galactosidase imobilizada, colocou-se 1,0 g da resina contendo a enzima previamente imobilizada em tubos de ensaio contendo 20 mL de soluções tampões de respectivos pHs: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. Os tubos contendo o suporte com a enzima foram mantidos em banho termostatzado a 25°C por 36 horas. Após este tempo, as resinas foram filtradas e adicionadas ao microrreator contendo solução de rafinose para determinação da atividade conforme descrito no item 4.2.3 a 40°C. Para pH 3,0 e 3,5 utilizou-se tampão citrato/fosfato 0,1 M. Tampão acetato/ácido acético 0,1 M foi utilizado para faixa de pH de 4,0 a 5,5 e fosfato de sódio monobásico/bibásico 0,1 M foi utilizado para faixa de pH entre 6,0 e 8,0.

4.2.12 – Estabilidade térmica

Nas análises de resistência térmica da enzima livre incubaram-se, em tubos de ensaio, 20 mL de soluções de α -galactosidase 10 g/L em tampão acetato/ácido acético pH 5,0 nas seguintes temperaturas com respectivos tempos: 60°C (60, 120, 240, 360 min); 63°C (30, 60, 120, 240 min) e 67°C (5, 10, 15, 20 min). Em cada tempo estipulado, uma amostra de 3 mL de solução de enzima contida no tubo de ensaio foi retirada e adicionada a outro tubo de ensaio e imediatamente resfriada em banho de gelo. Em seguida, a atividade da enzima foi

determinada conforme descrito no item 4.2.3 a 40°C e pH 5,0, que estão dentro da faixa de boa atividade para ambas as formas da enzima.

Para as análises de resistência térmica da α -galactosidase imobilizada, incubou-se 1,0 g da resina com a enzima imobilizada em tubos de ensaio contendo 20 mL de tampão acetato/ácido acético pH 5,0 nas seguintes temperaturas com respectivos tempos: 60°C (30, 60, 120, 180 min); 65°C (5, 10, 15, 30 min) e 70°C (3, 6, 10, 20 min). Posteriormente os tubos de ensaio foram retirados e imediatamente resfriados em banho de gelo. As resinas foram filtradas e adicionadas ao reator para determinação da atividade conforme descrito no item 4.2.3 fixando-se a temperatura em 40°C e pH 5,0.

Os resultados de atividade enzimática em função do tempo de incubação obtidos foram analisados pelo modelo de desativação térmica de primeira ordem e pela modelagem de desativação enzimática em série com dois estágios (Equações 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21), realizando regressões não lineares aplicadas às Equações 4.19, 4.20 e 4.21, para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos (HENLEY e SADANA, 1985)



$$\frac{A}{A_0} = \exp(-k_1.t) \quad (4.19)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1). \exp(-k_1.t) + \alpha_1 \quad (4.20)$$

$$\frac{A}{A_0} = \alpha_2 + \left(1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1}\right) \cdot \exp(-k_1.t) - \left(\frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1}\right) \cdot \exp(-k_2.t) \quad (4.21)$$

Sendo:

$$\frac{U}{U_0} : \text{atividade relativa}$$

$\alpha_1 = \frac{E_1}{E}$: razão entre a atividade específica do estado final (E_1) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial E .

$\alpha_2 = \frac{E_2}{E}$: razão entre a atividade específica do estado final (E_2) para uma modelagem de inativação em série com duas etapas e a atividade inicial E .

$k_1; k_2$: constantes cinéticas de desativação térmica.

Os dados experimentais obtidos pela curva de desativação térmica foram utilizados para o cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da enzima para cada temperatura, considerando as equações que melhor se ajustaram aos dados experimentais (Equações 4.22 e 4.23).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (4.22)$$

$$t_{1/2} = \frac{-1}{k_d} \cdot \ln \left[\frac{0,5 - \alpha}{1 - \alpha} \right] \quad (4.23)$$

Em que:

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida

$\alpha = \frac{E_1}{E}$: razão entre a atividade específica do estado final (E_1) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial E (Equação 4.20).

4.2.13 – Estudo da cinética sem inibição

Para determinação do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática utilizou-se diferentes concentrações de rafinose no meio reacional. Nenhum outro substrato, inibidor ou produto da reação de hidrólise por α -galatcosidase foi adicionado ao meio de reação.

A temperatura e pH foram fixados em 40°C e 5,0, respectivamente. As concentrações de rafinose utilizadas foram: 3, 6, 10, 25, 50 e 70 g/L tanto para a enzima livre quanto imobilizada.

Através dos dados experimentais, foi feita uma análise de regressão não linear utilizando o software *Statistica 7.0* a partir da equação cinética de *Michaelis-Menten* (Equação 4.24) para determinação da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e da constante cinética de *Michaelis-Menten* (K_m).

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (4.24)$$

Em que:

v = velocidade da reação

V_{max} = velocidade máxima da reação

S = concentração de substrato

K_m = constante de *Michaelis-Menten*

4.2.14 – Estudo da influência da concentração do substrato juntamente com os produtos de hidrólise da rafinose na atividade da α -galactosidase imobilizada

Um planejamento composto central foi realizado para estudar a influência da concentração da sacarose e galactose juntamente com a concentração do substrato rafinose na atividade da α -galactosidase imobilizada. As três variáveis foram estudadas em dois níveis (2^3) e o PCC foi complementado com mais 3 réplicas no ponto central e 6 experimentos no ponto axial, totalizando 17 experimentos. O α de ortogonalidade foi de 1,35313 e foi calculado pelo software *Statistica 7.0*.

As respostas para o planejamento estudado foram concentração de rafinose, sacarose e galactose. Utilizou-se o software *Statistica 7.0* para análise dos dados. Os valores de nível superior (+1) para as variáveis concentração de rafinose, sacarose e galactose foram 10,0 g/L, 7,0 g/L e 3,0 g/L respectivamente. Os valores de nível inferior (-1) foram 3,0 g/L, 2,0 g/L e 1,0 g/L para rafinose, sacarose e galactose, respectivamente.

Todos os experimentos foram conduzidos a 40°C e pH 5,0. O planejamento composto central está apresentado na Tabela 4.5.

Para análise dos resultados utilizou-se o software *Statistica 7.0* para determinação dos parâmetros da equação empírica de regressão múltipla.

A superfície de resposta foi gerada a partir da equação empírica contendo somente parâmetros com nível de significância menores que 10%. Através desta, foi possível verificar regiões de alta e baixa atividades correspondentes à faixas de concentração dos açúcares estudados.

As Equações codificadas 4.25, 4.26 e 4.27 são as equações para cada variável estudada neste PCC e foram obtidas a partir da Equação 4.5.

$$X_1 = \frac{([Rafinose] - 6,5)}{\left[\frac{10 - 3}{2} \right]} \quad (4.25)$$

$$X_2 = \frac{([Sacarose] - 4,5)}{\left[\frac{7 - 2}{2} \right]} \quad (4.26)$$

$$X_3 = \frac{([Galactose] - 2,0)}{\left[\frac{3 - 1}{2} \right]} \quad (4.27)$$

Tabela 4.5 – Matriz do planejamento composto central 2³ com os valores codificados e originais das variáveis concentração de rafinose, sacarose e galactose para o estudo da inibição da reação enzimática.

Exp.	Valor Real (Valor Codificado)		
	X ₁	X ₂	X ₃
	Rafinose (g/L)	Sacarose (g/L)	Galactose (g/L)
1	3 (-1)	2 (-1)	1 (-1)
2	3 (-1)	2 (-1)	3 (+1)
3	3 (-1)	7 (+1)	1 (-1)
4	3 (-1)	7 (+1)	3 (+1)
5	10 (+1)	2 (-1)	1 (-1)
6	10 (+1)	2 (-1)	3 (+1)
7	10 (+1)	7 (+1)	1 (-1)
8	10 (+1)	7 (+1)	3 (+1)
9	1,76 (-α)	4,5 (0)	2 (0)
10	11,24 (+α)	4,5 (0)	2 (0)
11	6,5 (0)	1,12 (-α)	2 (0)
12	6,5 (0)	7,88 (+α)	2 (0)
13	6,5 (0)	4,5 (0)	0,65 (-α)
14	6,5 (0)	4,5 (0)	3,35 (+α)
15	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)
16	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)
17	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)

4.2.15 – Influência da concentração inicial de galactose na inibição da atividade da α -galactosidase imobilizada

Um planejamento experimental foi realizado variando as concentrações de rafinose de 3 a 20g/L e de galactose de 0 a 20 g/L no meio reacional, totalizando 18 experimentos, conforme apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Variação das concentrações de substrato (rafinose) e inibidor (galactose) para determinação do modelo cinético de inibição

Experimento	[Rafinose] (g/L)	[galactose] (g/L)
1	3	0
2	3	5
3	3	10
4	6	0
5	6	5
6	6	10
7	10	0
8	10	5
9	10	10
10	10	20
11	15	0
12	15	5
13	15	10
14	15	20
15	20	0
16	20	5
17	20	10
18	20	20

As taxas de reação foram determinadas à temperatura de 40°C e pH 5,0. Uma regressão não linear foi realizada com os dados experimentais para determinação dos parâmetros cinéticos dos modelos de inibição apresentados nas Equações 4.28, 4.29, 4.30, 4.31 e 4.32.

Inibição Competitiva

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (4.28)$$

Inibição não-competitiva

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (4.29)$$

Inibição Acompetitiva

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (4.30)$$

Inibição Mista Linear

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (4.31)$$

Inibição Parcialmente Não Competitiva

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S \cdot \left(1 + \frac{\beta \cdot I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (4.32)$$

4.2.16 – Estabilidade da enzima α -galactosidase imobilizada em relação ao tempo de estocagem

Para avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em Duolite A-568 em relação ao tempo de estocagem, 9 amostras de 1,0 g de resina contendo a enzima previamente imobilizada foram colocadas em béqueres de 100 mL contendo 25 mL de tampão acetato/ácido acético 1M pH 5,0 e armazenadas a 4°C. Amostras foram retiradas no intervalo de tempo compreendido entre 0 e 145 dias para determinação da atividade. As reações para determinação da atividade ocorreram em pH 5,0 e a temperatura de 40°C, conforme descrito no item 4.2.3.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Seleção do suporte de imobilização

A única resina que se mostrou eficiente no processo de imobilização foi a Duolite A-568. Todas as demais resinas não apresentaram nenhuma atividade mesmo após 1 hora em meio de reação. A atividade medida para Duolite A-568 foi 0,035 U^a em solução tampão acetato pH 5,0 e a 40°C (Tabela 5.1). Este resultado sugere que o processo de imobilização com as resinas de troca iônica para a enzima em estudo não foi o mais adequado. Para aprofundamento no estudo, foi utilizado a Duolite A-568 para imobilização de α -galactosidase.

Tabela 5.1 – Resultados das atividades da α -galactosidase imobilizada em diferentes resinas de troca iônica.

Suporte	Atividade (U ^a)
Marathon Dowex A	0
Marathon Dowex C	0
Amberlite 252 Na	0
Duolite A-568	0,035 $\pm$ 0,004
Duolite S-761	0

$$U^a = \text{g}_{\text{açúcar redutor}} / (\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{suporte}})$$

Guidini (2009) e Marquez (2007) estudaram a imobilização de β -galactosidase e invertase, respectivamente, para estas mesmas resinas de troca iônica e também obtiveram melhores resultados para Duolite A-568.

5.2 – Estudo do glutaraldeído como agente de reticulação na imobilização da α -galactosidase

5.2.1 – Efeito do glutaraldeído na atividade da α -galactosidase imobilizada

Os resultados do efeito do agente reticulante glutaraldeído na atividade da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 estão apresentados na Tabela 5.2.

Pelos resultados obtidos verifica-se que as maiores atividades ocorreram para o uso da enzima imobilizada sem o processo de reticulação e também para o processo de imobilização após a reticulação. O uso do glutaraldeído após a imobilização e juntamente com a enzima diminuiu a atividade do biocatalisador.

Tabela 5.2 – Efeito do agente reticulante na atividade da enzima.

Método	Atividade (U ^a)
Sem glutaraldeído	0,038 $\pm$ 0,003
Glutaraldeído com enzima	0,019 $\pm$ 0,001
Glutaraldeído antes da imobilização	0,035 $\pm$ 0,004
Glutaraldeído depois da imobilização	0,016 $\pm$ 0,003

U^a = g_{açúcar redutor}/(L.min.g_{suporte})

Segundo López-Gallego *et al.* (2005) a pré ativação do suporte com glutaraldeído antes do processo de imobilização reduz as modificações químicas da enzima para somente os grupos de lisina envolvidos na ligação, enquanto que no primeiro toda a superfície da molécula de enzima pode ser alterada. Portanto, esta provável pequena modificação na estrutura da enzima para o processo de reticulação antes da imobilização pode ter sido o motivo da atividade enzimática obtida neste tratamento ser melhor quando comparada aos outros dois tratamentos com o glutaraldeído.

Para otimizar a concentração de glutaraldeído e o tempo de reticulação foi feito um planejamento composto central.

5.2.2 – Estudo da concentração de glutaraldeído e do tempo no processo de reticulação

A Tabela 5.3 apresenta os resultados do planejamento composto central para o estudo da concentração do agente reticulante glutaraldeído e do tempo do processo de reticulação.

Tabela 5.3 – Resultados do PCC (2²) realizados para o estudo das concentrações do glutaraldeído e do tempo de reticulação.

Exp.	Valor Real (Valor Codificado)		Atividade (U ^a)
	X ₁ Glutaraldeído % (v/v)	X ₂ tempo de reticulação (h)	
1	5,8 (+1)	1 (-1)	0,053 ± 0,004
2	0,4 (-1)	1 (-1)	0,082 ± 0,005
3	5,8 (+1)	5 (+1)	0,067 ± 0,002
4	0,4 (-1)	5 (+1)	0,080 ± 0,008
5	3,1 (0)	0,7 (-α)	0,057 ± 0,002
6	3,1 (0)	5,3 (+α)	0,068 ± 0,006
7	0 (-α)	3 (0)	0,086 ± 0,004
8	6,2 (+α)	3 (0)	0,067 ± 0,001
9	3,1 (0)	3 (0)	0,068 ± 0,002
10	3,1 (0)	3 (0)	0,065 ± 0,002
11	3,1 (0)	3 (0)	0,069 ± 0,003

U^a = g_{açúcar redutor} / (L.min.g_{suporte})

Verifica-se pela Tabela 5.3 que a maior atividade ocorreu no experimento 7, onde não foi adicionado glutaraldeído para o processo de reticulação. Por outro lado a menor atividade foi observada para o experimento 1, que corresponde a uma concentração de glutaraldeído de 5,8% (v/v) e tempo de reticulação de 1 hora.

A análise de regressão múltipla realizada pelo software *Statistica 7.0* forneceu a Equação 5.1, que correlaciona a atividade obtida em função das variáveis concentração de glutaraldeído % (v/v) (X₁) e tempo de reticulação (X₂). Todos os parâmetros foram significativos ao nível de 10% de probabilidade pelo teste *t-Student*.

$$U^a = 0,0673 + 0,0037X_1 - 0,0037X_1^2 - 0,0096X_2 + 0,0068X_2^2 + 0,0040X_1X_2 \quad (5.1)$$

O coeficiente de determinação (R²) obtido na análise estatística foi de 0,98, sendo este valor satisfatório para o ajuste dos dados experimentais pelo modelo. A superfície de resposta gerada pela Equação 5.1 está apresentada na Figura 5.1

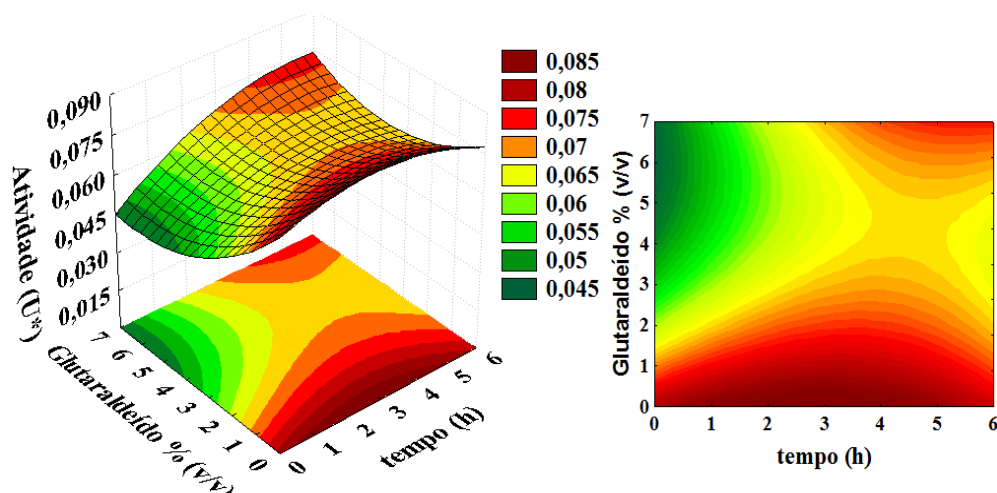


Figura 5.1 – Superfície de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de reticulação na atividade da α -galactosidase imobilizada.

Pela análise da Figura 5.1, verifica-se uma região de ótima atividade compreendida entre toda a faixa de tempo de reticulação para baixas concentrações de glutaraldeído (menor que 1,5% (v/v)).

Para validação do modelo (Equação 5.1) foi realizado um procedimento de reticulação utilizando 1% de glutaraldeído (v/v) e tempo de 1 hora de reticulação. Estes valores estão dentro da faixa de região ótima obtida no planejamento. Os testes foram feitos em triplicata e obteve-se uma atividade média de 0,079 U^a com desvio padrão de 0,007. O resultado está próximo ao valor calculado pelo modelo, que foi de 0,082.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da aplicação do glutaraldeído no processo de imobilização da α -galactosidase foi feito um estudo comparativo da estabilidade operacional da enzima imobilizada com e sem o processo de reticulação utilizando 1% (v/v) de glutaraldeído e tempo de reticulação de 1 hora.

5.2.3 – Efeito do glutaraldeído na estabilidade operacional da α -galactosidase imobilizada

O estudo da estabilidade operacional da α -galactosidase à resina Duolite A-568 foi feito conforme o item 4.2.5.3 e os resultados estão apresentados na Figura 5.2.

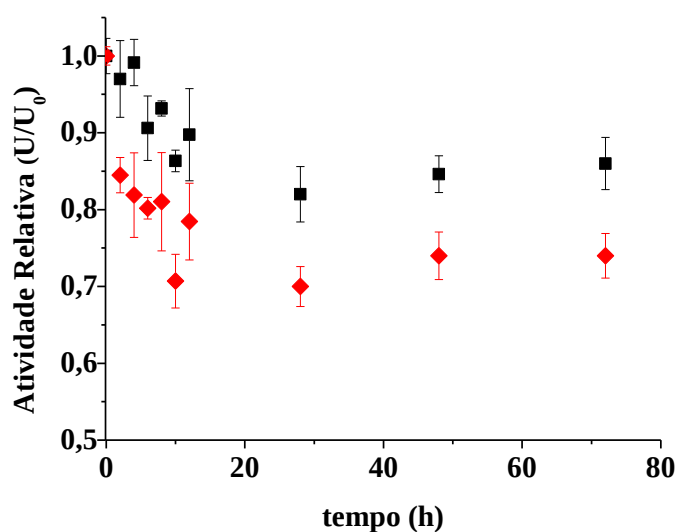


Figura 5.2 – Atividade relativa (U/U_0) da α -galactosidase imobilizada com processo de reticulação com 1% de glutaraldeído (■) e sem processo de reticulação (◆).

A atividade relativa (U/U_0) da enzima imobilizada sem o processo de reticulação reduziu muito já na segunda hidrólise realizada no reator (após 2 horas), perdendo cerca de 16% da atividade inicial, enquanto que para o tratamento com 1% (v/v) de glutaraldeído a perda foi de apenas 3%. Após 28 horas no reator sob agitação, observou-se uma estabilização da atividade relativa para ambos os tratamentos, sendo observados valores de atividades residuais entre 82 e 86% para o suporte ativado com glutaraldeído e 70 e 74% para o suporte sem tratamento de reticulação. Portanto, pode-se afirmar que o processo de reticulação anterior à imobilização da enzima ao suporte aumentou em cerca de 12% a atividade relativa da α -galactosidase após vários ciclos de reação e por isto decidiu-se utilizar o glutaraldeído na imobilização da α -galactosidase em Duolite A-568.

5.3 – Estudo preliminar do efeito da temperatura na imobilização

O teste de médias *t-Student* da análise estatística do efeito da temperatura no processo de imobilização da enzima α -galactosidase está apresentado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Análise de variância com o valor de *p*-calculado para a análise da diferença de médias entre as temperaturas de 25°C e 40°C utilizadas na imobilização da α -galactosidase.

Tratamento	Número de amostras	Média	Desvio-padrão	Variância	<i>p</i> -calculado
25°C	3	0,1319	0,0091	$8,28 \times 10^{-5}$	0,1949
40°C	3	0,1389	0,0087	$7,57 \times 10^{-5}$	

Verifica-se, por meio da Tabela 5.4, que o valor de *p*-calculado é maior que o nível de 5% de probabilidade estabelecido para o teste. Portanto a hipótese de nulidade (H_0) (Equação 4.10) foi aceita, e conclui-se, portanto, que não houve diferença significativa para as temperaturas de 25°C e 40°C utilizadas na imobilização enzimática.

Portanto, decidiu-se realizar o processo de imobilização à temperatura de 25°C e esta foi a temperatura utilizada em todos os demais experimentos apresentados a partir deste item.

5.4 – Estudo das variáveis pH, concentração de enzima e tempo na imobilização

A Tabela 5.5 apresenta os resultados do planejamento fatorial completo do processo de imobilização da α -galactosidase.

Tabela 5.5 – Primeiro Planejamento Fatorial Completo: Análise das variáveis pH, concentração de enzima e tempo do processo de imobilização.

Exp.	X ₁ pH	X ₂ tempo de imobilização (h)	X ₃ α -galactosidase (g/L)	Atividade (U ^a)
1	5 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	$0,0490 \pm 0,002$
2	9 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	$0,0137 \pm 0,001$
3	5 (-1)	1 (-1)	15 (+1)	$0,0770 \pm 0,005$
4	9 (+1)	1 (-1)	15 (+1)	$0,0309 \pm 0,002$
5	7 (0)	2 (0)	10 (0)	$0,0530 \pm 0,004$
6	7 (0)	2 (0)	10 (0)	$0,0580 \pm 0,005$
7	7 (0)	2 (0)	10 (0)	$0,0600 \pm 0,004$
8	5 (-1)	3 (+1)	5 (-1)	$0,0613 \pm 0,006$
9	9 (+1)	3 (+1)	5 (-1)	$0,0209 \pm 0,002$
10	5 (-1)	3 (+1)	15 (+1)	$0,110 \pm 0,008$
11	9 (+1)	3 (+1)	15 (+1)	$0,0467 \pm 0,002$

U^a = g_{açúcar redutor}/(L.min.g_{suporte})

A maior atividade observada na Tabela 5.5 ocorreu para pH 5,0, 15g/L de α -galactosidase e 3 horas de imobilização (experimento 10). A menor atividade foi observada para pH 9,0, 5,0 g/L de α -galactosidase e 1 hora de imobilização (experimento 2). Utilizando o software *Statistica 7.0*, uma análise de regressão múltipla foi realizada para obter a equação do modelo (Equação 5.2), que correlaciona a atividade obtida em função das variáveis codificadas X_1 , X_2 e X_3 , as quais representam pH, tempo e concentração de enzima, respectivamente.

$$U^a = 0,053 - 0,023X_1 + 0,009X_2 + 0,015X_3 \quad (5.2)$$

Todas as variáveis foram significativas ao nível de 10% de probabilidade determinado, porém não houve significância em nenhuma das interações ($p > 10\%$). O coeficiente de determinação encontrado foi 0,9394, o que indica um bom ajuste do modelo, uma vez que 93,94% da variabilidade dos dados é justificada pela equação empírica.

Os gráficos de superfícies de respostas gerados pelo *Statistica 7.0* para o planejamento fatorial completo são apresentados nas Figuras 5.3, 5.4. e 5.5.

Pelos gráficos apresentados, verifica-se que a atividade enzimática foi maior para tempos maiores de imobilização (acima de 2 horas) e menor pH (5,0 a 5,5). As taxas de hidrólise também foram maiores para maiores concentrações de enzima. A atividade enzimática obtida utilizando uma concentração de α -galactosidase a 15 g/L foi satisfatória. Por questões econômicas, decidiu-se estabelecer esta concentração para o processo de imobilização. Portanto, todos os demais resultados de atividade apresentados a partir deste item utilizaram esta concentração de enzima no processo de imobilização.

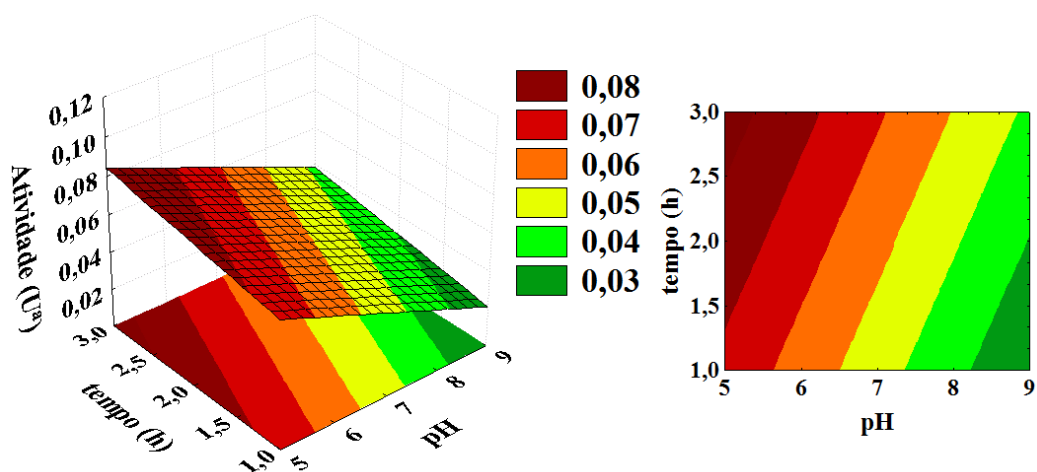


Figura 5.3 – Superfície de resposta da influência do pH e do tempo de imobilização na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.

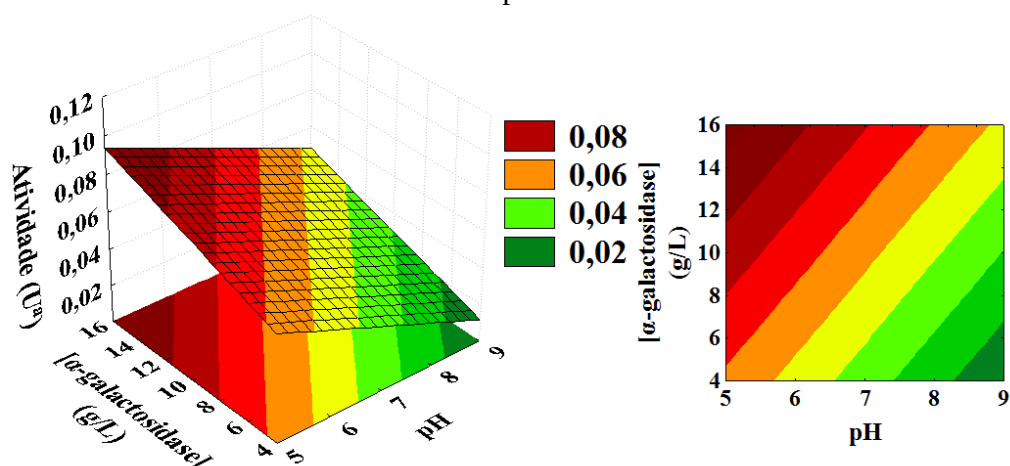


Figura 5.4 – Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.

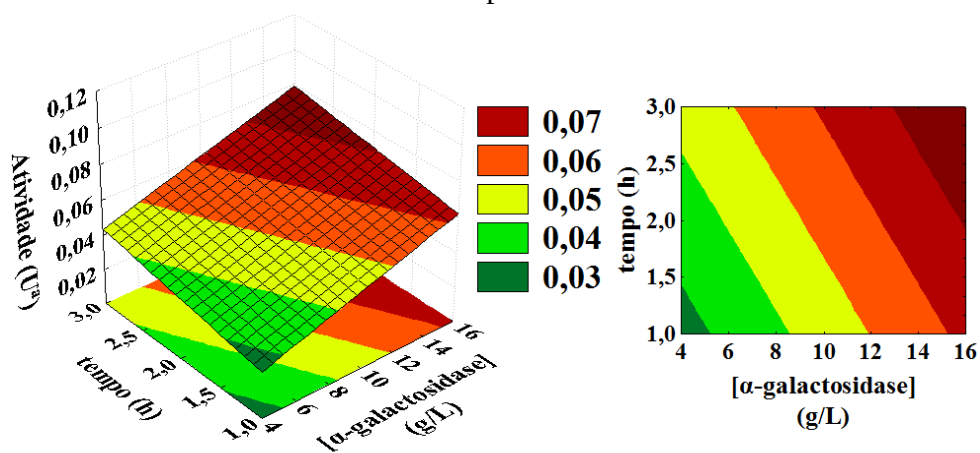


Figura 5.5 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e da concentração de enzima na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização para o planejamento fatorial completo.

A Tabela 5.6 mostra os resultados referentes ao Planejamento Composto Central realizado para otimizar o pH e o tempo do processo de imobilização conforme descrito no item 4.2.7.

Tabela 5.6 – Planejamento Composto Central: Otimização do pH e do tempo no processo de imobilização da α -galactosidase.

Exp.	X ₁ pH	X ₂ tempo de imobilização (h)	Atividade (U ^a)
1	2 (-1)	2 (-1)	0,093 ± 0,004
2	2 (-1)	6 (+1)	0,086 ± 0,004
3	7 (+1)	2 (-1)	0,099 ± 0,006
4	7 (+1)	6 (+1)	0,091 ± 0,002
5	1,63 (- α)	4 (0)	0,080 ± 0,005
6	7,37 (+ α)	4 (0)	0,087 ± 0,002
7	4,5 (0)	1,7 (- α)	0,118 ± 0,004
8	4,5 (0)	6,3 (+ α)	0,109 ± 0,004
9	4,5 (0)	4 (0)	0,123 ± 0,004
10	4,5 (0)	4 (0)	0,124 ± 0,002
11	4,5 (0)	4 (0)	0,121 ± 0,003

U^a = g_{açúcar redutor}/(L.min.g_{suporte})

As maiores atividades observadas (0,121; 0,123 e 0,124 U^a) ocorreu para pH 4,5 e 4 horas de imobilização (pontos centrais). A menor atividade (0,080 U^a) foi observada para pH 1,6313 e 4 horas de imobilização. A análise de regressão múltipla forneceu a Equação 5.3 em que X₁ e X₂ representam as variáveis pH e tempo de imobilização codificadas, respectivamente.

$$U^a = 0,121 + 0,0028X_1 - 0,026X_1^2 - 0,003X_2 - 0,004X_2^2 \quad (5.3)$$

Os termos lineares e quadráticos das variáveis pH e tempo de imobilização (X_1 e X_2 , respectivamente) foram significativos ao nível de 10% de probabilidade estabelecido. No entanto, a interação entre estas variáveis não foi significativa ($p>10\%$). O valor do coeficiente de determinação de 0,98 foi satisfatório para representação dos dados experimentais.

A superfície de resposta do planejamento composto central está apresentada pela Figura 5.6

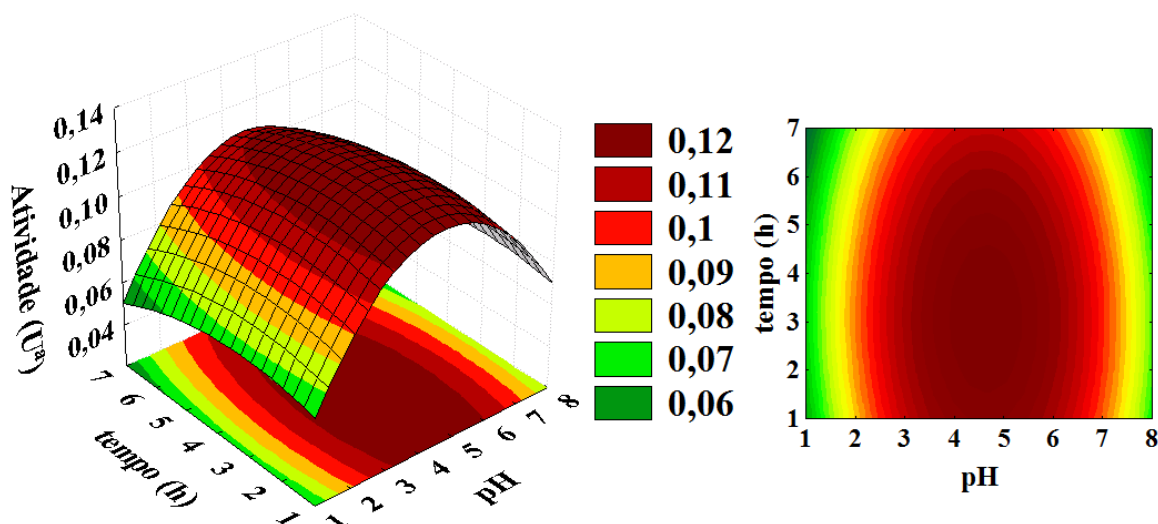


Figura 5.6 – Superfície de resposta da influência do pH e do tempo de imobilização na atividade da α -galactosidase no processo de imobilização.

A região ótima de pH esteve compreendida na faixa entre 4,0 e 5,0 e a região ótima para o tempo de imobilização esteve compreendida entre 2 e 4.

Para validação do modelo foi realizado um procedimento de imobilização utilizando concentração de α -galactosidase de 15 g/L, tempo de imobilização de 3 horas e pH 4,5, os quais estão dentro da região ótima apresentada pela superfície de resposta do PCC. Os testes foram feitos em triplicata e apresentaram média de atividade de 0,125 U^a com desvio padrão de 0,008. O valor obtido está próximo ao valor calculado pelo modelo nestas condições, que foi de 0,121 U^a .

Uma vez validado o modelo, decidiu-se realizar o procedimento de imobilização nas seguintes condições: concentração de α -galactosidase de 15 g/L, tempo de imobilização de 3 horas e pH 4,5.

5.5 – Influência da temperatura na atividade da α -galactosidase livre e imobilizada

O estudo do efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase em sua forma livre e imobilizada foram realizados conforme descrito nos itens 4.2.8 e os resultados estão apresentados na Figura 5.7.

Para α -galactosidase em sua forma solúvel, a faixa de ativação térmica esteve compreendida entre 25 e 60°C e a faixa de desativação térmica esteve compreendida entre 60°C e 71°C. A atividade foi máxima a 60°C, obtendo-se para esta temperatura 65,0 U^b. A atividade diminuiu acentuadamente para temperaturas acima da atividade ótima. As atividades para 65°C e 67°C foram respectivamente, 51,4 U^b e 12,5 U^b. A 71°C já não houve nenhuma atividade enzimática.

Para a enzima imobilizada na resina de troca iônica, a faixa de ativação térmica esteve compreendida entre 30°C e 60°C e a de desativação térmica ficou entre 60°C e 76°C. A atividade máxima obtida foi 54,0 U^b e ocorreu a 60°C. A 76°C a atividade observada foi de 3,0 U^b.

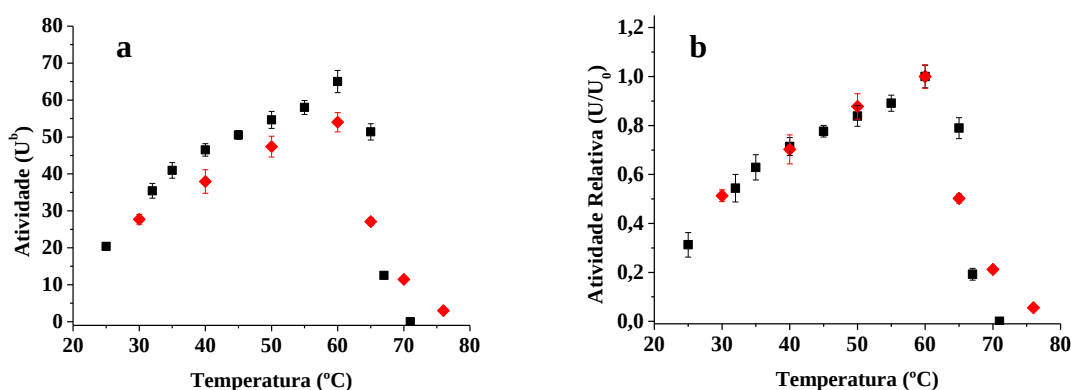


Figura 5.7 – Influência da temperatura na atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) (b) da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (◆) em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.

Com exceção das temperaturas acima de 70°C, a atividade da α -galactosidase livre foi melhor do que imobilizada para as faixas de temperatura estudadas. Para ambas as formas da enzima, a atividade máxima ocorreu a 60°C, que está de acordo com a faixa de temperatura ótima fornecida pelo fabricante, assim como com outros trabalhos disponíveis na literatura para diferentes fontes de α -galactosidase. (KATROLIA *et al.*, 2012; KURAKAKE *et al.*, 2011; PRASHANTH e MULIMANI, 2005; VIANA *et al.*, 2005; THIPPESWAMY e MULIMANI 2002; SCIGELOVA e CROUT, 2000).

A diminuição da atividade enzimática pode estar associada ao tipo de suporte e o tipo de imobilização realizada. Além disto, a enzima utilizada pode apresentar certo grau de impureza uma vez que se trata de um enzima comercial.

Os valores de atividade relativa (U/U_0) para a enzima livre e imobilizada mostram um mesmo comportamento de ativação térmica para as duas formas da enzima. No entanto, a α -galactosidase imobilizada apresentou um ligeiro aumento da faixa de desativação térmica.

Naganagouda e Mulimani (2006) imobilizaram α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em gelatina contendo alginato e verificaram que a imobilização também não afetou a temperatura ótima da enzima, a qual ocorreu a 50°C. No entanto, o processo de imobilização melhorou a atividade relativa da enzima para faixa de temperatura de desativação térmica.

Okutuku *et al.* (2010) também não observaram nenhum aumento de temperatura ótima para α -galactosidase extraída de tomates quando imobilizada em resina polimérica contendo galactose. No entanto, a atividade relativa da enzima foi melhor para as faixas de ativação e desativação térmica.

Alguns trabalhos mostraram aumento da temperatura de atividade ótima de α -galactosidases extraídas de diferentes fontes quando imobilizadas em diferentes suportes (BAYRAKTAR *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2007). Filho *et al.* (2008) obtiveram aumento de aproximadamente 5°C (de 65°C para 70°C) na temperatura ótima quando α -galactosidase de *Thermus* sp foi imobilizada em agarose e posteriormente tratada com glutaraldeído 1% (v/v). A imobilização também aumentou a atividade relativa para temperaturas acima da temperatura ótima.

5.6 – Energias de ativação para α -galactosidase livre e imobilizada

A partir dos dados obtidos para a etapa de ativação térmica, compreendida entre 25°C e 60°C, para a enzima livre e 30°C a 60°C para a enzima imobilizada (Figura 5.7), calculou-se as energias de ativação da α -galactosidase para as duas formas. A determinação de E_a foi feita por regressão linear com auxílio do software *Origin 8.0* utilizando a equação de *Arrhenius* linearizada (Equação 4.17). O resultado está apresentado na Figura 5.8.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram 0,87 e 0,98 para as formas livre e imobilizada, respectivamente, indicando bons ajuste dos dados com o modelo. O valor da energia de ativação encontrado pelo ajuste linear foi de 5,66 kcal/mol para α -galactosidase solúvel e 4,48 kcal/mol para α -galactosidase imobilizada. Verifica-se que estes valores são próximos, o que indica que a enzima nas formas livre e imobilizada apresentam

comportamento semelhante para a faixa de ativação térmica, o que realmente pode ser verificado na Figura 5.7.

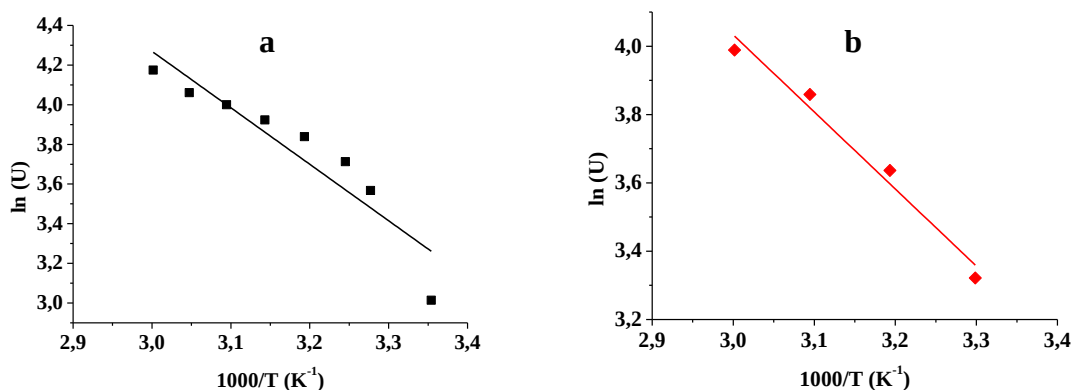


Figura 5.8 – Ajuste linear sobre a equação de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação da enzima livre (a) (■) e imobilizada (b) (♦) em tampão acetato/ácido acético pH 5,0.

Fialho *et al.* (2008) obtiveram uma energia de ativação de α -galactosidase livre proveniente de *Tachigali multijuga* de 4,75 kcal/mol em reações de hidrólise de rafinose para temperaturas no intervalo de 30°C a 50°C.

No trabalho de purificação e caracterização de α -galactosidase proveniente de *Bacillus stearothermophilus*, Gote *et al.* (2006) observaram um gráfico descontínuo da equação de Arrhenius para a energia de ativação da enzima livre. O ponto de descontinuidade ocorreu a 50°C e as energias de ativação encontradas foram 14,72 kcal/mol e 6,93 kcal/mol para os intervalos compreendidos entre 30 a 50°C e entre 50 e 70°C, respectivamente. Segundo os autores a descontinuidade do gráfico pode ocorrer devido à mudanças na fluidez da membrana lipídica do micro-organismo com a temperatura ou devido à presença de duas formas enzimáticas, cada uma com domínio em diferentes intervalos de temperatura.

5.7 – Influência do pH na atividade da enzima α -galactosidase livre e imobilizada

Os resultados do efeito do pH na atividade e atividade relativa da α -galactosidase em sua forma livre e imobilizada estão apresentados na Figura 5.9. Verifica-se pelos dados experimentais que a enzima solubilizada apresenta pH ótimo na faixa de 4,0 a 6,0 e sua maior atividade observada (45,6 U^b) ocorreu em pH 4,5. Estes valores são mais amplos que a faixa de pH ótimo estabelecida pelo fabricante, que é de 4,5 a 5,5. Para valores de pH inferiores ou

superiores a esta faixa houve uma redução drástica da atividade, sendo que para pH 7,5 não foi observada nenhuma atividade enzimática.

Quando α -galactosidase foi retida no suporte, a atividade máxima observada (38,0 U^b) ocorreu em pH 5,0. A enzima ainda apresentou boa atividade para a faixa de pH entre 3,0 a 6,0. Para valores de pH mais alcalinos (acima de 6,0) a atividade do biocatalisador reduziu consideravelmente, mas se manteve melhor do que quando não imobilizada. Analisando a tendência dos dados experimentais, uma regressão quadrática foi realizada utilizando o software *Origin 8.0* para representar matematicamente o comportamento da atividade da enzima imobilizada em função do pH (Equação 5.4).

$$U^b = -2,60X^2 + 23,45X - 15,05 \quad (5.4)$$

Em que:

U^b = Atividade da enzima imobilizada em g_{açúcar redutor}/(L.min.g_{enzima})

X = pH do meio de reação

O coeficiente de determinação da curva de regressão foi 0,98, o que indica um bom ajuste do modelo. A partir da Equação 5.4, calculou-se o valor do pH ótimo para a enzima imobilizada, sendo este valor pH 4,5.

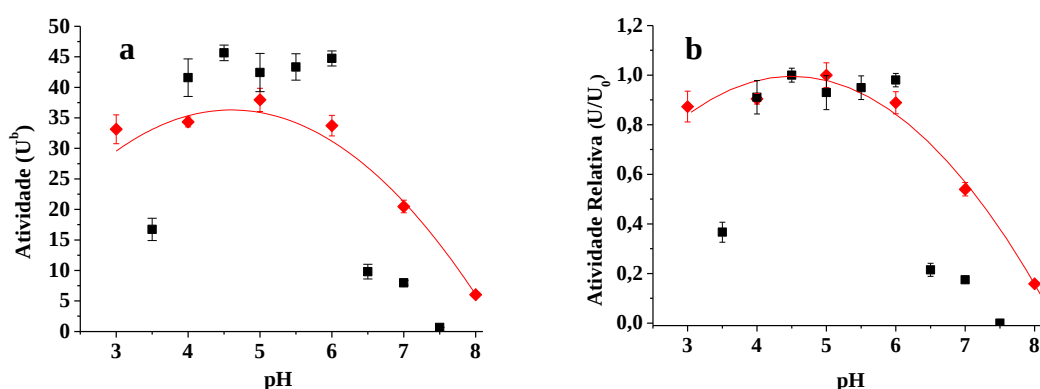


Figura 5.9 – Influência do pH na atividade (a) e atividade relativa (U/U₀) (b) a 40°C da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦).

Verifica-se que as atividade relativas tanto da enzima livre quanto imobilizada são próximas para o intervalo de pH de 4,0 a 6,0. Em solução, a atividade relativa da enzima esteve acima de 91% para esta faixa enquanto que quando retida no suporte esta percentagem

foi de 89%. Em pH 3,5 o biocatalisador livre perdeu 63% da atividade máxima observada, enquanto que para um pH ainda mais ácido (pH 3,0) a enzima imobilizada perdeu apenas 13%. Para pHs mais alcalinos a α -galactosidase imobilizada também apresentou atividades relativas melhores do que a quando em sua forma livre. Em pH 7,0 as atividades relativas foram 54% e 17% para as formas imobilizada e livre, respectivamente. Em pH 7,5 já não foi observada nenhuma atividade de α -galactosidase livre, enquanto que a imobilizada ainda apresentou atividade relativa de 16% para pH 8,0. Os resultados indicam que a imobilização da enzima melhorou a sua atividade para pHs mais alcalinos (acima de 6,0). É provável também que a α -galactosidase retida no suporte Duolite A-568 apresente uma extensão da faixa de pH ótimo para pHs mais ácidos. No entanto, para comprovar tal afirmação é necessário que medidas de atividade de ambas as formas da enzima sejam feitas para valores de pH abaixo de 3,0.

Ademark *et al.* (2001) purificaram e identificaram quatro diferentes tipos de α -galactosidases do fungo *Aspergillus niger*. Para todas estas enzimas, os autores observaram atividade máxima em pH 4,5 com tampão acetato 0,1 M. As análises foram feitas a 50°C utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*p*-NPG). Os pontos isoelétricos encontrados para cada tipo das quatro enzimas foram, 4,15; 4,5; 4,7 e 4,8.

Somiari e Balogh (1995) observaram máxima atividade de α -galactosidase impura e purificada de *Aspergillus niger* em pH 5,0 utilizando farelo de trigo e arroz como substratos.

Ferreira (2007) purificou e caracterizou α -galactosidase extraída do fungo *Aspergillus terreus*. Em seu estudo do efeito do pH na atividade enzimática, foi utilizado o substrato *p*-NPG e hidrólises foram feitas a 40°C para faixa de pH entre 3,0 e 7,6. A atividade relativa foi superior a 75% para o intervalo de pH entre 3,6 a 5,6 e a maior atividade foi encontrada em pH 5,0. Acima de pH 6,6 a atividade reduziu muito, sendo observados valores de atividade relativa inferiores a 22%.

Thippeswamy e Mulimani (2002) observaram 90% de atividade relativa de α -galactosidase proveniente de *Gibberella fujikuroi* para faixa de pH entre 4,0 e 6,3 tanto para sua forma livre quanto imobilizada em gel de poliacrilamida. Para pH 3,0 o processo de imobilização aumentou a atividade relativa em pelo menos 30%.

A α -galactosidase de *Cassia sericea*, *Humicola* sp. e *Cyamopsis tetragonalobus* apresentaram ótima atividade em pH 5,0 (BHASKAR *et al.*, 1990; SHIVANNA e RAMAKRISHNA, 1985; ALANI *et al.*, 1989).

No trabalho de Marquez (2007), utilizou-se a resina de troca iônica Duolite A-568 para imobilizar invertase (β -D-frutofuranosidase). Tanto a forma imobilizada quanto a forma

solúvel da enzima apresentaram praticamente o mesmo pH de atividade máxima. No entanto, o processo de imobilização aumentou a faixa de atividade ótima de 3,7 a 5,1 da enzima livre para 2,5 a 7,3 para a enzima retida em Duolite.

5.8 – Resistência da enzima α -galactosidase em relação ao pH

A análise de resistência da α -galactosidase solúvel e imobilizada em relação ao pH foi feita conforme descrito no item 4.2.10 e os resultados estão apresentados na Figura 5.10.

A maior atividade observada para a enzima solúvel foi 48,0 U^b e ocorreu quando incubada em pH 6,5. No entanto valores de atividades maiores que 45,0 U^b foram observados para o intervalo de pH entre 4,5 e 7,5, com exceção do pH 6,0, cuja atividade medida após incubação foi ligeiramente menor (43,4 U^b). Para pHs mais ácidos (3,5 e 4,0) a atividade obtida também foi um pouco menor (42,9 e 42,2 U^b, respectivamente).

A atividade da α -galactosidase imobilizada foi menor quando comparada a sua forma livre para cada respectivo pH e esteve compreendida na faixa entre 36,1 U^b a 43,4 U^b.

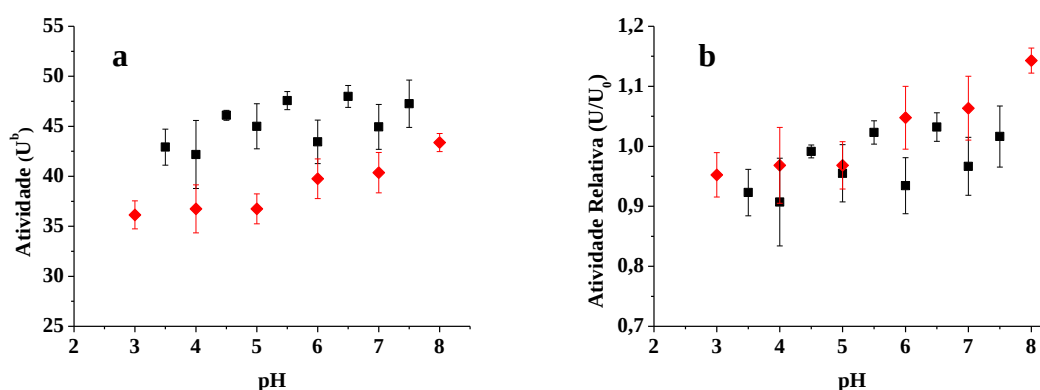


Figura 5.10 – Atividade (a) e atividade relativa (U/U₀) (b) da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (♦) após incubação em diferentes pHs por 36 horas a 25°C. A atividade foi medida a 40°C em tampão acetato/ácido acético pH 5,0.

Para o biocatalisador em sua forma solúvel a atividade relativa esteve compreendida na faixa de 90,7% a 103,2%. Para faixa de pH entre 4,5 e 7,5 a atividade se manteve acima de 96,5%, com exceção do pH 6,0 em que o valor foi de 93,4%. Analisando os resultados, é possível afirmar que a α -galactosidase em sua forma solúvel manteve boa resistência para toda a faixa de pH estudada. Mesmo que a atividade relativa para alguns pHs tenha sido maior que 100% não é possível afirmar que a incubação aumentou significativamente a atividade da α -galactosidase livre, uma vez que esta diferença foi de no máximo 3,2%.

A atividade relativa do catalisador imobilizado à resina Duolite A-568 manteve acima de 95,0% para todo intervalo de pH estudado. Porém, para pHs mais alcalinos (6,0 a 8,0) a atividade relativa esteve acima de 100% da atividade medida sem o processo de incubação, sendo que para pH 8,0 houve um aumento de 14,3%. Isto sugere que um processo de imobilização em Duolite A-568 seguido de incubação em pH ligeiramente alcalino pode aumentar a atividade enzimática. De fato, a taxa de reação para α -galactosidase incubada por 36 horas em pH 8,0 foi apenas 6,7% menor que a atividade inicial medida para a enzima solúvel nas mesmas condições estabelecidas para determinação da atividade enzimática (pH 5,0 e 40°C), enquanto que a enzima imobilizada sem o processo de incubação apresentou uma diminuição de 18,4%. No entanto para que esta suposição seja comprovada, deve-se fazer um estudo mais detalhado incubando a enzima imobilizada em pHs mais alcalinos.

O aumento da atividade da enzima imobilizada quando incubada em pHs mais alcalinos pode ser explicado pelo aumento da reatividade dos grupos amino de lisina. Segundo Mateo *et al.* (2005) os grupos amino dos resíduos de lisina são os grupos amino primários mais abundantes em proteínas e estes apresentam valores de pKa de aproximadamente 10,5 a 10,8. Portanto, para valores de pH mais alcalinos, a reatividade destes grupos aumenta. Para maior adsorção da enzima ao suporte é importante que a ligação destes grupamentos amino estejam envolvidos na ligação (PEDROCHE *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho diferem da pesquisa realizada por Ademark *et al.* (2001) que purificaram quatro tipos de α -galactosidases do fungo *Aspergillus niger*. No entanto estes pesquisadores utilizaram diferentes temperatura de incubação e substrato. Utilizando p-NPG os autores observaram que as α -galactosidases tipo II, III e IV foram mais estáveis quando incubadas em pH de 2,0 a 5,0 por 17 horas a 50°C. Estas enzimas foram totalmente inativadas quando a incubação ocorreu em pH 6,0. A α -galactosidase tipo I apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 6,0 e foi totalmente inativada em pH 8,0 para o mesmo tempo e temperatura de incubação das outras α -galactosidases.

No trabalho de purificação e caracterização de α -galactosidase também proveniente de *A. niger*, Manzanares *et al.* (1998) incubaram a enzima a 30°C por 20 horas em diferentes pHs. Um decréscimo de aproximadamente 85% na taxa de reação de hidrólise de p-NPG foi observada para incubação em pH entre 4,0 e 4,5. Quando incubada em pH 5,5 e 6,0, a enzima reteve 65% de sua atividade inicial.

Filho *et al.* (2008) imobilizaram α -galactosidase de *Thermus* sp T2 em ágar coberto com o polímero de troca iônica polietilenoimina (PEI), que assim como a resina utilizada

neste trabalho, também apresenta caráter aniônico. Neste estudo, os autores obtiveram maior estabilidade da enzima imobilizada em pHs mais alcalinos (7,0 a 9,0).

Os dados de atividade em função do pH (item 5.7) quando comparados aos dados de resistência de incubação são semelhantes aos resultados obtidos por Kurakeke *et al.* (2011) para α -galactosidase de *Penicillium oxalicum*. Estes pesquisadores observaram que a enzima reteve mais de 80% sua atividade inicial para incubações em pH entre 2,4 a 8,0, enquanto que a atividade enzimática reduziu drasticamente a partir do pH 6,0.

Katrolia *et al.* (2012) estudaram a α -galactosidase de *Rhizomucor miehei* e obtiveram estabilidade para a faixa de pH compreendida entre 4,5 a 10,0. No entanto, o fungo apresentou boa atividade somente para pH entre 4,0 e 5,0.

5.9 – Resistência térmica da enzima α -galactosidase

Um estudo da estabilidade térmica da α -galactosidase foi realizado conforme descrito no 4.2.11 e estão apresentados nos itens 5.10.1 e 5.10.2.

5.9.1 – Resistência térmica da α -galactosidase livre

As atividades relativas (U/U_0) medidas para a enzima livre após sua incubação em diferentes temperaturas estão apresentadas na Figura 5.11. A atividade inicial (U_0) medida para o catalisador antes do tratamento térmico foi de 45,5 U^b .

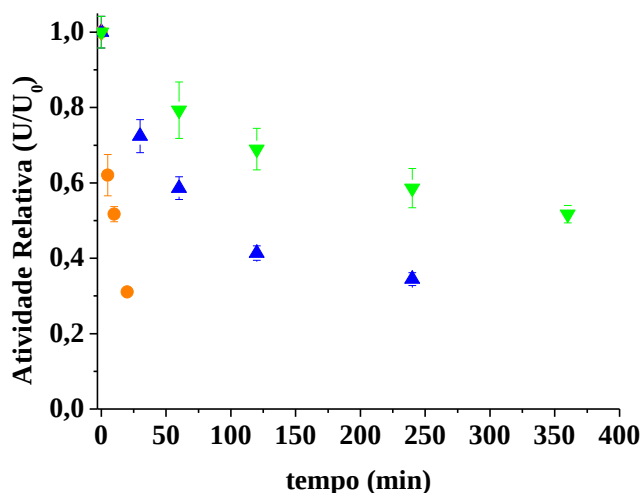


Figura 5.11 – Atividades relativas da α -galactosidase livre após diferentes tempos de incubação a 60°C (∇), 63°C ($\blacktriangle$) e 67°C ($\bullet$). As atividades foram medidas a 40°C em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.

Pelos resultados apresentados, verifica-se uma diminuição acentuada de resistência térmica para uma estreita faixa de temperatura (60°C a 67°C). A 60°C a α -galactosidase ainda manteve 51% de sua atividade após 360 minutos de incubação. Para as temperaturas de 63°C e 67°C as atividades relativas foram, respectivamente, de 34% após 240 minutos e de 31% após 20 minutos de incubação em solução tampão pH 5,0.

As Equações 4.19, 4.20 e 4.21 apresentadas no item 4.2.11 foram utilizadas para a análise estatística de desativação térmica e seus parâmetros foram calculados por regressão não linear utilizando o método Levenberg-Marquadt (MORE, 1977) no software *Statistica 7.0*. Este método utiliza o critério iterativo de convergência para ajuste dos parâmetros. Optou-se por utilizá-lo por já ter sido utilizado em outros trabalhos de estudo de desativação térmica de enzimas (MARQUEZ, 2007; FREITAS, 2007).

As Tabelas 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam os resultados dos valores dos parâmetros calculados para cada equação nas temperaturas de 60°C, 63°C e 67°C, respectivamente. Os valores p representam a significância, que foi calculada utilizando o teste *t-Student*. Foram adotados como significativos apenas os parâmetros com nível de significância menor que 10%. Os valores dos coeficientes de determinação e a soma do quadrado dos desvios também estão apresentados para cada equação.

Uma vez que a atividade relativa diminui com o tempo de incubação térmica, é necessário que o valor dos parâmetros k_1 e k_2 presentes nos termos exponenciais das Equações 4.19 a 4.21 sejam positivos. Além disto, os valores de α_1 e α_2 , que representam a razão entre a atividade específica do estado final da enzima e a atividade do estado inicial (Equações 4.18, 4.20 e 4.21), também devem obrigatoriamente serem números positivos. Portanto, para que os valores dos parâmetros k_1 , k_2 , α_1 e α_2 apresentem significado físico é necessário que todos estes sejam números positivos.

Para escolha do melhor ajuste, os critérios de maior coeficiente de determinação, menor soma dos quadrados dos desvios e parâmetros estatisticamente ($p < 10\%$) e fisicamente (números positivos) significativos foram levados em consideração.

Não foi possível ajustar o modelo de desativação térmica utilizando a Equação 4.21 para a temperatura de 67°C devido à ocorrência de erro durante o ajuste no software *Statistica*.

A Tabela 5.7 mostra que todos os parâmetros calculados para a desativação a 60°C apresentaram significado físico, uma vez que todos são números positivos. As Equações 4.20 e 4.21 foram as que apresentaram maiores coeficientes de determinação e menores soma dos quadrados dos desvios. Para a Equação 4.20 todos os parâmetros foram significativos ao

índice de 10% de probabilidade escolhido, enquanto que para a Equação 4.21 o valor de α_2 não foi significativo ($p > 10\%$). Portanto, a equação que melhor se ajustou aos dados experimentais com valores dos parâmetros significativos foi a Equação 4.20. Seu modelo com os respectivos parâmetros calculados estão apresentados pela Equação 5.5 e pela Figura 5.12.

Tabela 5.7. – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 60°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1 valor-p	k_2 valor-p	α_1 valor-p	α_2 valor-p	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq. 4.19	0,00223 0,00125	-	-	-	88,01%	$1,7 \times 10^{-2}$
Eq. 4.20	0,00831 0,001622	-	0,503233 0,00009	-	99,65%	$5,1 \times 10^{-4}$
Eq. 4.21	0,015998 0,019457	0,000962 0,017244	0,686435 0,005485	0,000063 0,959403	99,99%	$1,0 \times 10^{-6}$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,5032) \cdot \exp(-0,0083 \cdot t) + 0,5032 \quad (5.5)$$

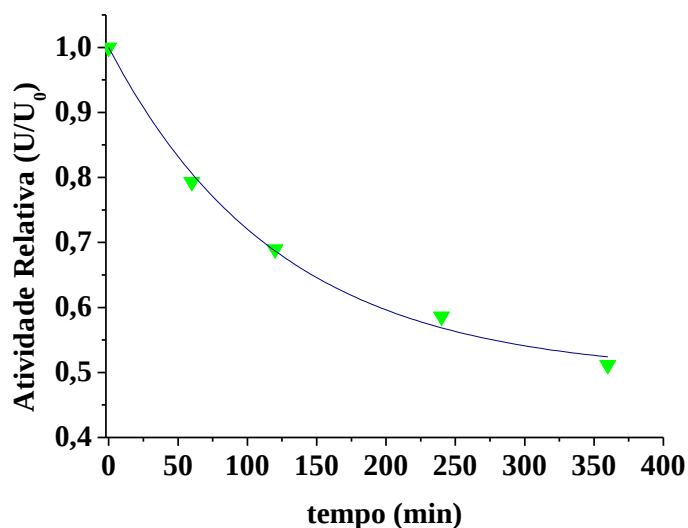


Figura 5.12 – Ajuste da Equação 5.5 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 60 °C (▼).

Os desvios do modelo da Equação 5.5 estão apresentados pela Figura 5.13. Verifica-se que os erros estão aleatoriamente distribuídos em torno da linha do zero, o que indica um comportamento não tendencioso dos desvios.

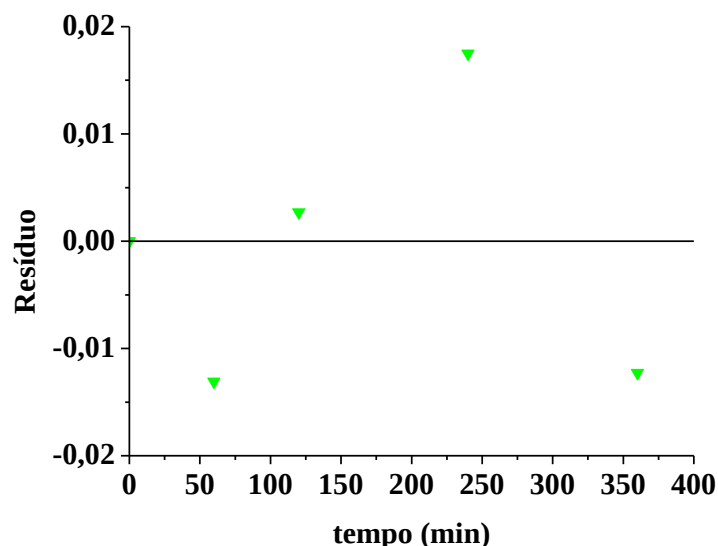


Figura 5.13 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 60°C ajustado pela Equação 5.5.

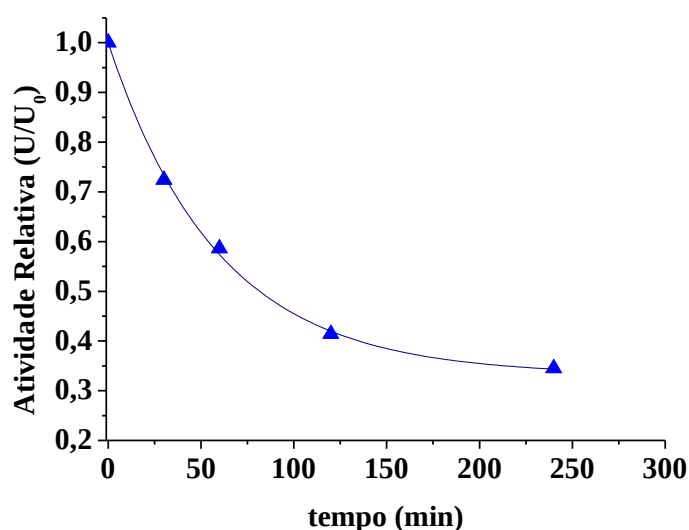
A Tabela 5.8 apresenta os valores dos parâmetros encontrados para os modelos de desativação térmica da α -galactosidase a 63°C. Todos ajustes apresentaram bons coeficientes de determinação. Para a Equação 4.21 nenhum dos parâmetros foi significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste *t-Student*. Além disto, os parâmetros k_2 e α_2 não apresentaram significado físico, uma vez que são negativos. Portanto, esta equação não deve ser utilizada para modelar o comportamento apresentado. As Equações 4.19 e 4.20 apresentaram valores estatisticamente ($p < 10\%$) e fisicamente significativos. No entanto, a soma dos desvio e o coeficiente de determinação da Equação 4.20 foi melhor, indicando que 99,90% da variabilidade dos dados foram explicados pelo modelo.

Portanto, a Equação 4.20 com seus respectivos parâmetros apresentados na Tabela 5.8, foi o modelo escolhido para representar a inativação térmica da α -galactosidase em sua forma livre à temperatura de 63°C. Este modelo está apresentado na Equação 5.6 e Figura 5.14.

Tabela .5.8 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 63°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1	k_2	α_1	α_2	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
	valor-p	valor-p	valor-p	valor-p		
Eq. 4.19	0,00678 0,0040				86,29%	$3,8 \times 10^{-2}$
Eq. 4.20	0,016928 0,000171		0,332071 0,000068		99,90%	$2,8 \times 10^{-4}$
Eq. 4.21	0,016415 0,156063	-0,000184 0,932789	0,322599 0,202270	-0,002517 0,903180	99,90%	$2,8 \times 10^{-4}$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,3321) \cdot \exp(-0,0169 \cdot t) + 0,3321 \quad (5.6)$$

Figura 5.14 – Ajuste da Equação 5.6 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 63 °C (▲).

O gráfico de distribuição dos erros do modelo representado pela Equação 4.20 estão apresentados na Figura 5.15, a qual mostra um comportamento aleatório dos desvios.

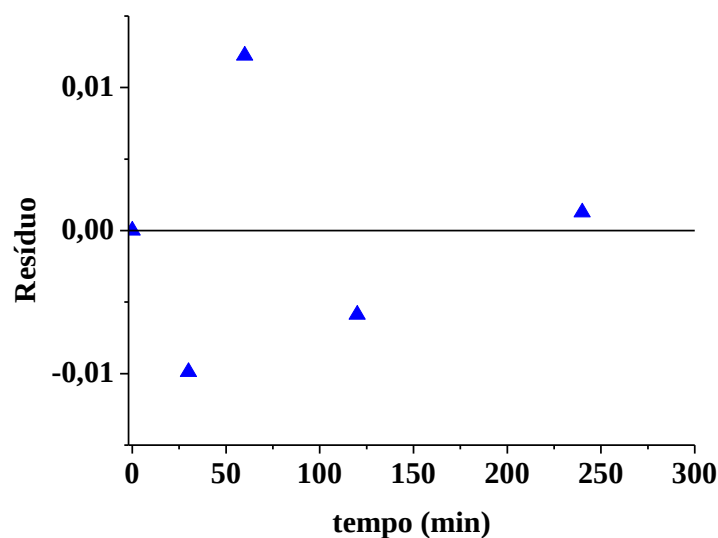


Figura 5.15 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 63°C ajustado pela Equação 5.6.

A Tabela 5.9 apresenta os resultados da determinação dos parâmetros das Equações 4.19 a 4.21 para os dados de desnaturação enzimática a 67°C. Não foi possível plotar o modelo com os parâmetros da Equação 4.21, uma vez que esta apresentou erro no software *Statistica 7.0*. Apesar de apresentar bom coeficiente de determinação, este modelo de fato não foi estatisticamente e fisicamente significativo.

Tabela 5.9 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1 valor-p	k_2 valor-p	α_1 valor-p	α_2 valor-p	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq. 4.19	0,067913 0,002978				95,49	$1,1 \times 10^{-2}$
Eq. 4.20	0,125634 0,053877		0,265421 0,071784		98,65	$3,4 \times 10^{-3}$
Eq. 4.21	*	*	*	*	*	*

* Não foi possível ajustar os dados experimentais de desativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C pela Equação 4.21

A desativação da enzima α -galactosidase a 67°C pode ser explicada pelos modelos das Equações 4.19 e 4.20 com seus respectivos parâmetros calculados, uma vez que estes apresentaram bons coeficientes de determinação e seus parâmetros são significativos ($p < 10\%$). Porém, decidiu-se escolher a Equação 4.20 para representar matematicamente a

inativação da enzima, uma vez que seu coeficiente de determinação e soma dos desvios apresentaram valores melhores do que o da Equação 4.19. Este modelo com os respectivos valores de k_1 e α_1 está apresentado a seguir pela equação 5.9 e Figura 5.16

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,2654) \cdot \exp(-0,1256 \cdot t) + 0,2654 \quad (5.7)$$

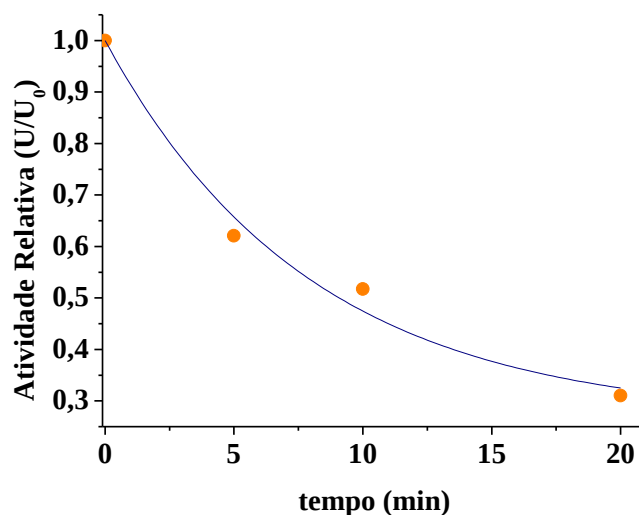


Figura 5.16 – Ajuste da Equação 5.7 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C (●).

O comportamento aleatório dos desvios dos valores observados na desnaturação a 67°C está apresentado na Figura 5.17.

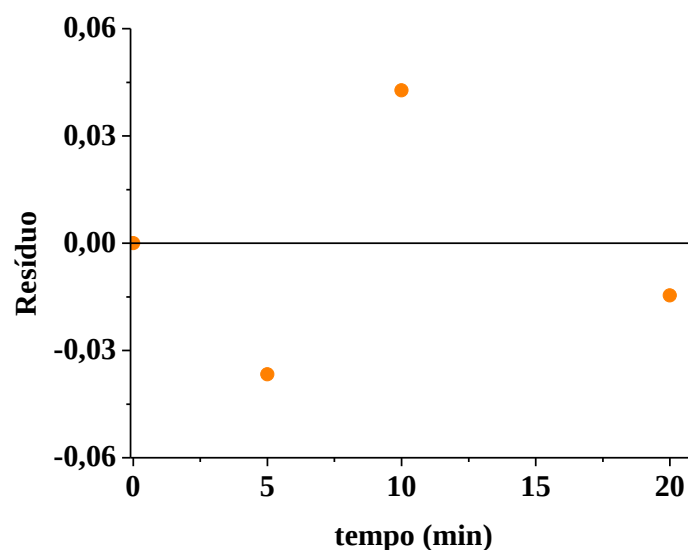


Figura 5.17 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 67°C ajustado pela Equação 5.7.

No trabalho desenvolvido por Ademark *et al.* (2001), os quatro tipos de α -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890 apresentaram cerca de 95% da atividade inicial quando incubadas por 21 horas a 40°C e pelo menos 80% para o mesmo tempo a 50°C. A enzima foi completamente desnaturada a 60°C também após 21 horas de incubação. Para a enzima proveniente do mesmo fungo, Scigelova e Crout (2000) observaram que a atividade relativa se manteve acima de 80% após 300 minutos a 50°C. Aumentando 10°C, a atividade relativa foi de cerca de 25% após 165 minutos de incubação. Após 60 minutos a 65°C, a α -galactosidase perdeu completamente sua atividade.

A α -galactosidase de *A. terreus*, manteve 92% da atividade inicial quando incubada a 60°C por 30 minutos. Após 270 minutos nesta temperatura, a enzima perdeu 69% da atividade (FERREIRA, 2007). Utilizando α -galactosidase de *A. fumigatus*, Rezende *et al.* (2005) diminuíram 20% da atividade após tratamento térmico a 50°C por 90 minutos. A menor estabilidade térmica encontrada na literatura para fungos do gênero *Aspergillus* foi para a espécie *A. nidulans*, cuja α -galactosidase foi instável para temperaturas acima de 30°C (RÍOS *et al.*, 1993).

Utilizando sementes germinadas de soja, Viana *et al.* (2005) purificaram α -galactosidase e observaram que houve redução de mais de 80% de atividade a 45°C por 30 minutos.

A α -galactosidase de *Monascus pilosus* manteve atividade quando incubada por 20 minutos a 50°C e 55°C, porém a atividade diminuiu para 30% da atividade inicial após este mesmo tempo a 60°C (WONG *et al.*, 1986).

5.9.1.1 – Cálculo do tempo de meia-vida

Para todas as temperaturas, a Equação 4.20 foi a que melhor se ajustou aos resultados experimentais e esta equação foi utilizada para calcular os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) de inativação térmica (Equação 4.16). No entanto, não foi possível utilizar a mesma equação para o cálculo de $t_{1/2}$ da enzima a 60°C, indicando um valor alto para esta temperatura. De fato, a atividade relativa medida após 360 minutos de incubação nesta temperatura foi de 51,7%. Portanto, é ponderante afirmar que o tempo de meia-vida da α -galactosidase incubada a 60°C é aproximadamente 360 minutos. O cálculo de $t_{1/2}$ utilizando a Equação 4.22 para esta temperatura foi de 310 minutos, que está abaixo do tempo obtido experimentalmente. Esta diferença pode ser explicada pelo baixo coeficiente de determinação obtido no ajuste da Equação 4.19 aos dados experimentais (88,01%).

A Tabela 5.10 apresenta os cálculos dos tempos de meia-vida para as incubações da enzima livre a 60°C, 63°C e 67°C.

Tabela 5.10 – Resultados dos tempos de meia vida para enzima livre a 60°C, 63°C e 67°C.

Temperatura	$t_{1/2}$ (min)	Equação	R^2 (%)
60°C	~360*	*	*
63°C	81,6	4.23	99,90
67°C	9,1	4.23	98,65

* Não foi possível calcular o tempo de meia vida a 60°C pela equação ajustada de inativação térmica. O dado experimental mostrou atividade de 51,5% quando incubada nesta temperatura por 360 min.

Para 60°C, a α -galactosidase de *A. niger* utilizada neste experimento apresentou tempo de meia-vida semelhante ao da α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, que foi de 373 minutos (VIANA *et al.*, 2006). Quando comparada ao $t_{1/2}$ de 103 minutos da α -galactosidase de *A. terreus* apresentado no trabalho de Ferreira (2007), verifica-se que os resultados obtidos neste experimento foram melhores.

Os valores de $t_{1/2}$ deste trabalho foram menores quando comparado aos resultados obtidos para o fungo *A. parasiticus* MTCC-2796, que para 60°C apresentou metade da atividade inicial após 5 horas de incubação. A 65°C, 70°C e 80°C os $t_{1/2}$ calculados para esta espécie foram 3 h, 1 h e 30 minutos, respectivamente (SHIVAM e MISHRA, 2010).

O tempo de meia-vida da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* encontrado na literatura foi de 60 e 30 minutos quando incubada a 60°C e 70°C, respectivamente (GOTE *et al.*, 2006). Pessela *et al.* (2008) verificaram que a α -galactosidase de *Thermus sp.* T2 apresentou tempo de meia-vida entre 30 e 40 minutos quando incubada a 70°C em pH 5,0 a 7,0. Para o fungo *Rhizopus sp.* F78 ACCC 30795, o $t_{1/2}$ foi de aproximadamente 7-8 minutos quando α -galactosidase foi incubada a 60°C em pH 4,8 (CAO *et al.*, 2007).

5.9.2 – Resistência térmica da α -galactosidase imobilizada

As atividades relativas (U/U_0) medidas para a enzima retida em Duolite A-568 após sua incubação em diferentes temperaturas estão apresentadas na Figura 5.17. A atividade inicial (U_0) medida para o catalisador imobilizado antes do tratamento térmico foi de 37,5 U^b .

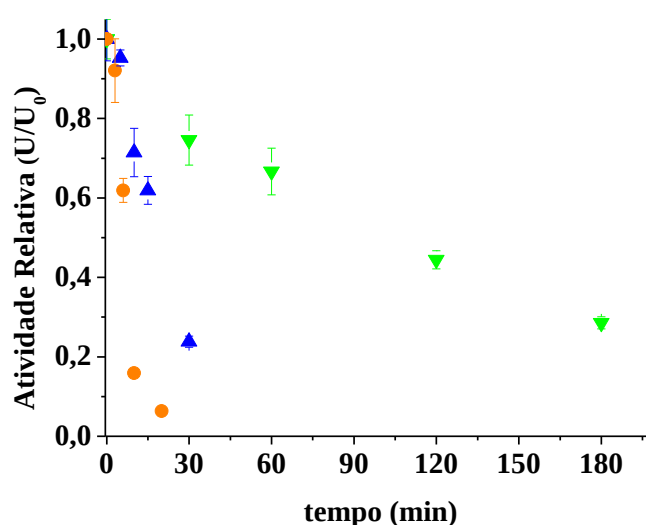


Figura 5.18 – Atividades residuais da α -galactosidase imobilizada após diferentes tempos de incubação a 60°C (▼), 65°C (▲) e 70°C (●). As atividades foram medidas a 40°C em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,0.

Analisando os resultados, observa-se uma elevada diminuição da atividade relativa para a faixa de temperatura compreendida entre 60°C e 70°C. Após 120 minutos de incubação a 60°C, já foi observada uma diminuição de mais da metade da atividade inicial e após 180 minutos, a atividade relativa obtida foi 28,6%. Quando exposta a temperatura de 65°C por 30 minutos, houve perda de 76,2% da atividade inicial. Para 70°C a atividade relativa foi de apenas 6,3% após 20 minutos de incubação.

Os modelos de desativação térmica proposto pelas Equações 4.19 a 4.21 foram utilizados para melhor explicar a desnaturação da enzima. As Tabelas 5.11, 5.12 e 5.13 apresentam os resultados dos valores dos parâmetros calculados para cada equação nas temperaturas de 60°C, 65°C e 70°C, respectivamente. Os valores dos parâmetros foram calculados pelo método iterativo de Levenberg-Marquadt (MORÉ, 1977) utilizando o software *Statistica 7.0*. Os valores p representam a significância, que foi calculada utilizando o teste *t-Student*. Foram adotados como significativos apenas os parâmetros com nível de significância menor que 10%. Os valores dos coeficientes de determinação e a soma do quadrado dos desvios também estão apresentados para cada equação.

Para escolha do melhor ajuste, os critérios de maior coeficiente de determinação, menor soma dos quadrados dos desvios e parâmetros estatisticamente ($p < 10\%$) e fisicamente (números positivos) significativos foram levados em consideração.

Tabela 5.11 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 60°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1 valor-p	k_2 valor-p	α_1 valor-p	α_2 valor-p	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq. 4.19	0,007058 0,000053	-	-	-	98,55	$4,4 \times 10^{-3}$
Eq. 4.20	0,008604 0,030984	-	0,109398 0,453525	-	98,75	$3,8 \times 10^{-3}$
Eq. 4.21	0,836166 1	0,006160 0,096795	0,919376 1	-0,002993 0,952827	98,89	$1,6 \times 10^{-3}$

Todos parâmetros calculados para a Equação 4.21 e o valor de α_1 da Equação 4.19 não foram significativos ao nível de probabilidade determinado ($p > 10\%$). O parâmetro k_1 da Equação 4.19 apresentou significado físico e estatístico. Além disto, a soma dos quadrados dos desvios foram satisfatórios. Portanto, esta equação foi selecionada para representar o modelo de desativação a 60°C da α -galactosidase imobilizada (Equação 5.8 e Figura 5.19).

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-0,007058.t) \quad (5.8)$$

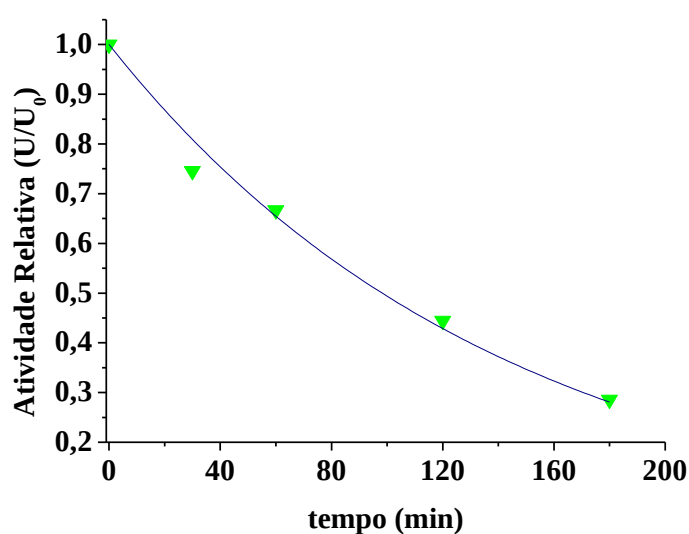


Figura 5.19 – Ajuste da Equação 5.8 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 60°C (▼) da α -galactosidase imobilizada.

A distribuição dos resíduos sobre o modelo da Equação 5.8 está apresentada na Figura 5.20.

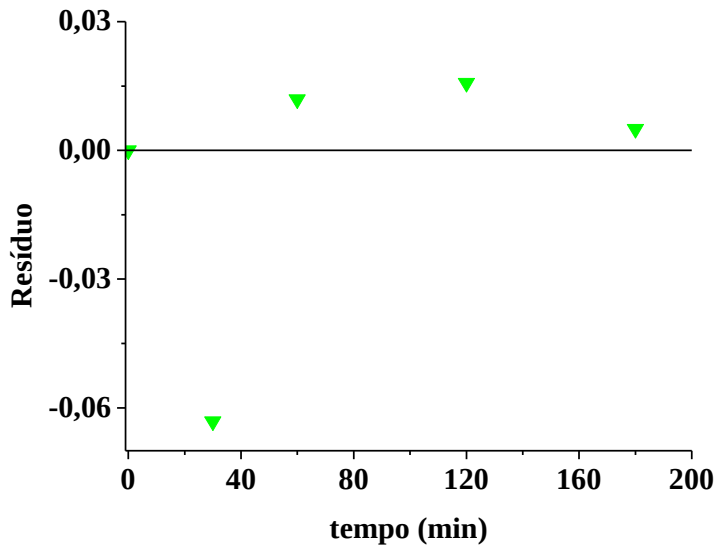


Figura 5.20 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 60°C ajustado pela Equação 5.8.

Pelos resultados apresentados pela Tabela 5.12, a única equação que forneceu resultados fisicamente e estatisticamente significativos para o modelo de desativação térmica da enzima imobilizada a 65°C foi a equação de primeira ordem (Equação 4.19). O modelo proposto com o parâmetro k_1 determinado está apresentado pela Equação 5.9 e Figura 5.21.

Tabela 5.12 – Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 65°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1 valor-p	k_2 valor-p	α_1 valor-p	α_2 valor-p	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
Eq. 4.19	0,036421 0,002087	-	-	-	93,16	$2,6 \times 10^{-2}$
Eq. 4.20	0,001400 0,929451	-	-17,7792 0,924201	-	98,01	$7,4 \times 10^{-3}$
Eq. 4.21	0,027154 0,996645	-0,002945 0,997735	-0,095532 0,999718	0,466933 0,999295	98,23	*

* Não foi possível determinar a soma do quadrado dos desvios do ajuste dos dados experimentais de desativação térmica da α -galactosidase livre a 67°C pela Equação 4.21

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-0,036421.t) \tag{5.9}$$

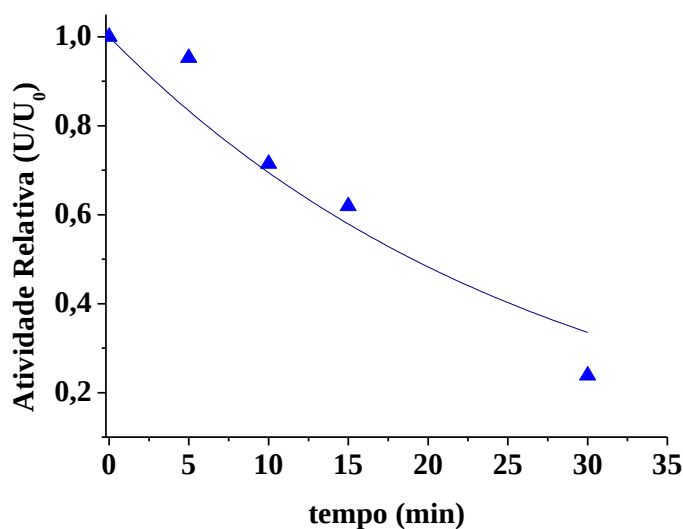


Figura 5.21 – Ajuste da Equação 5.9 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 65°C (▲) da α -galactosidase imobilizada.

A Figura 5.22 apresenta a distribuição dos resíduos sobre o zero para o modelo de desativação de primeira ordem utilizado.

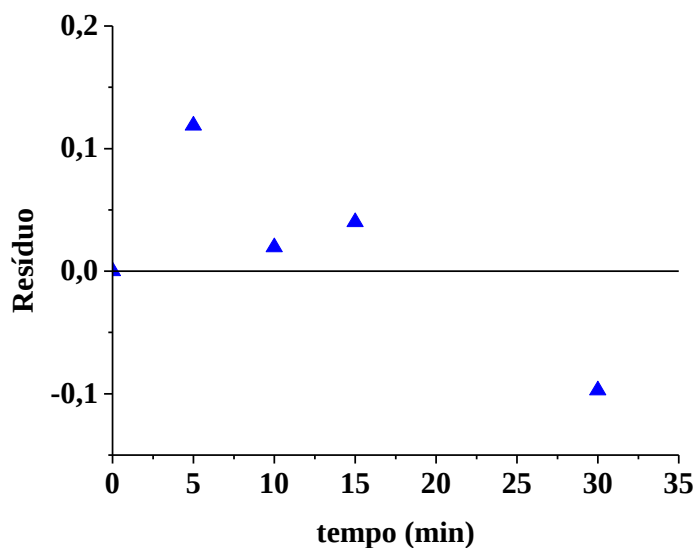


Figura 5.22 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 65°C ajustado pela Equação 5.9.

Para a desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 70°C, as Equações 4.20 e 4.21 apresentaram parâmetros insignificantes ao nível de probabilidade previamente determinado ($p > 10\%$). Além disto, os valores de α_1 de ambas equações também não apresentaram significado físico, uma vez que estes parâmetros devem ser números positivos.

A Equação 4.19 foi utilizada para representar a desativação da enzima a 70°C, uma vez que o parâmetro k_1 calculado é estatisticamente ($p < 10\%$) e fisicamente significativo. Os valores do coeficiente de determinação e a soma do quadrado dos desvios se mostraram satisfatórios (Tabela 5.13). A Equação 5.10 e Figura 5.23 representam do modelo calculado de inativação a 70°C da α -galactosidase imobilizada.

Tabela 5.13– Cálculo dos parâmetros de desativação térmica da α -galactosidase imobilizada a 70°C pelo método Levenberg-Marquadt.

	k_1	k_2	α_1	α_2	R^2	$\sum(V - V_{\text{modelo}})^2$
	valor-p	valor-p	valor-p	valor-p		
Eq. 4.19	0,108112 0,013848	-	-	-	88,62	$8,4 \times 10^{-2}$
Eq. 4.20	0,068529 0,304311	-	-0,324275 0,648961	-	90,64	$6,9 \times 10^{-2}$
Eq. 4.21	0,112333 0,984312	-0,090873 0,998947	-0,143026 0,998918	0,043855 0,999694	90,92	$5,9 \times 10^{-2}$

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-0,108112.t) \quad (5.10)$$

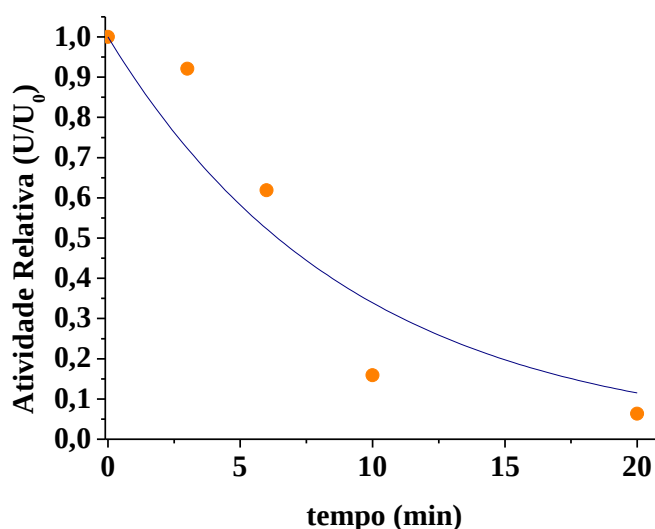


Figura 5.23 – Ajuste da Equação 5.10 (—) sobre os dados experimentais de inativação térmica a 70°C (●) da α -galactosidase imobilizada.

A distribuição dos desvios para o modelo de desativação térmica a 70° está apresentado na Figura 5.24.

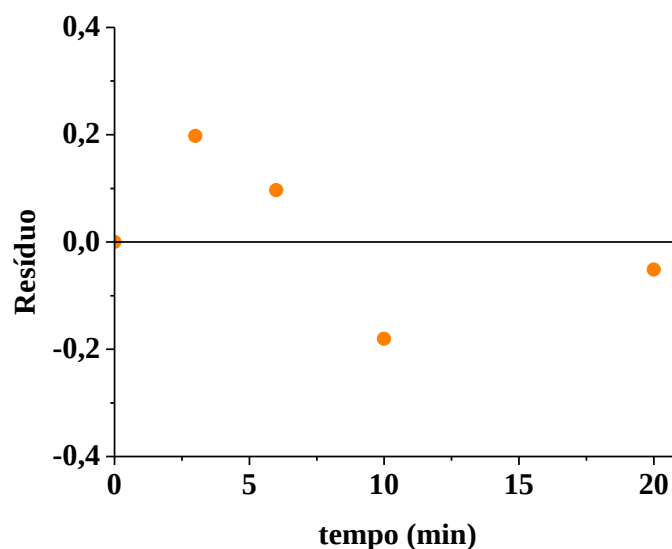


Figura 5.24 – Distribuição dos resíduos sobre os valores observados para o modelo de desativação térmica da α -galactosidase a 70°C ajustado pela Equação 5.10.

Para todas as três temperaturas de desativação térmica analisadas no experimento (60°C, 65°C e 70°C), verifica-se que o modelo de desativação de primeira ordem (Equação 4.19) foi o que melhor representou a desnaturação da enzima. Em comparação, este resultado é diferente do que foi apresentado para a enzima livre, a qual obteve a Equação 4.20 como a que melhor representou a desnaturação térmica.

Pelos resultados obtidos, a enzima imobilizada também apresentou uma acentuada queda de resistência térmica para uma estreita faixa de temperatura (60°C a 70°C). A estabilidade térmica da α -galactosidase de *A. niger* imobilizada em Duolite A-568 utilizada neste experimento foi menor quando comparada à α -galactosidase proveniente de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 imobilizada em sílica gel (VIANA *et al.*, 2007). A 70°C a enzima de *D. hansenii* manteve atividade relativa de 70% após 36 horas de incubação, enquanto que neste trabalho, houve perda de mais de 94% após 20 minutos de incubação na mesma temperatura. Esta diferença na estabilidade térmica pode estar associada ao tipo de micro-organismo produtor da enzima assim como o tipo de suporte utilizado.

Marquez (2007) também verificou diminuição da estabilidade térmica de invertase quando imobilizada em Duolite A-568.

5.9.2.1 – Cálculo do tempo de meia-vida

Como o modelo que melhor representou a desativação térmica da enzima imobilizada foi o de primeira ordem, utilizou-se a Equação 4.22 para o cálculo do tempo de meia-vida. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 – Resultados do tempo de meia vida para a enzima imobilizada para diferentes temperaturas.

Temperatura	$t_{1/2}$ (min)	Equação	R^2 (%)
60°C	98,21	4.22	98,55
65°C	19,03	4.22	93,16
70°C	6,41	4.22	88,62

Comparando o tempo de meia-vida da enzima livre (aproximadamente 360 minutos) com a imobilizada (98,21 minutos) a 60°C (Tabelas 5.10 e 5.14), verifica-se que houve redução de cerca de 70% de $t_{1/2}$ após retenção do biocatalisador no suporte de troca iônica. De fato as Figuras 5.11 e 5.17 mostram que a resistência térmica a 60°C da α -galactosidase diminuiu com o processo de imobilização. Uma explicação para a diminuição da estabilidade térmica da α -galactosidase imobilizada pode estar associada à presença de grupos aldeídos livres presentes na superfície do suporte. Segundo Saito *et al.* (1997) é importante eliminar a presença destes grupos em suportes inorgânicos após o processo de ligação cruzada com glutaraldeído para prevenir a interação destes com a enzima em elevadas temperaturas de incubação. Em estudo realizado para avaliar a estabilidade térmica de β -galactosidase imobilizada em cerâmica SM-10, estes autores realizaram testes de incubação com o suporte contendo alta e baixa razão da quantidade de enzima por quantidade de suporte ativado com glutaraldeído ($g_{enzima}/g_{suporte}$). A resistência a elevadas temperaturas (60°C, 70°C e 80°C) aumentou com o aumento da razão enzima/suporte.

Para determinar se os grupos livres de aldeído eram os responsáveis pela diminuição da atividade após incubação, Saito *et al.* (1997) prepararam amostras de suporte saturado de enzima e outra com baixa concentração do biocatalizador. Estas amostras foram tratadas com solução de aminoácidos básicos a fim de diminuir a presença de aldeídos livres na superfície do suporte. Este tratamento não resultou em nenhuma mudança na atividade relativa da amostra saturada de enzima após 3 horas de imobilização. No entanto a atividade relativa da

amostra não saturada aumentou de 50% para 90% após o tratamento com aminoácidos básicos.

Portanto, os resultados de Saito *et al.*(1997) sugerem que grupos aldeídos presentes na superfície do suporte podem causar sérias mudanças conformacionais na estrutura enzimática e conseqüentemente, provocar a perda da estabilidade térmica.

5.10 – Efeito da concentração de substrato na atividade da enzima α -galactosidase

A Tabela 5.15 apresenta os resultados de atividade inicial da α -galactosidase para diferentes concentrações iniciais do substrato rafinose na ausência de inibidores da reação de hidrólise.

Tabela 5.15 – Influência do substrato rafinose na atividade da α -galactosidase em sua forma livre e imobilizada. As hidrólises foram realizadas a 40°C e pH 5,0.

[Substrato] (g/L)	Atividade α -galactosidase	Atividade α -galactosidase
	livre (U ^b)	imobilizada (U ^b)
3	36,1 $\pm$ 1,8	25,9 $\pm$ 1,2
6	63,0 $\pm$ 4,3	48,8 $\pm$ 4,0
10	89,9 $\pm$ 6,6	64,5 $\pm$ 6,1
25	126,0 $\pm$ 5,0	103,6 $\pm$ 4,0
50	156,4 $\pm$ 4,4	138,0 $\pm$ 4,2
70	165,7 $\pm$ 9,0	148,2 $\pm$ 8,6

$$U^b = \text{g açúcar redutor} / (\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{enzima}})$$

Através dos dados experimentais obtidos, uma regressão não linear foi ajustada ao modelo de atividade enzimática de Michaelis-Menten (Equação 4.24) utilizando o software *Origin 8.0* (Figura 5.25). O coeficiente de determinação do ajuste foi de 0,99 para ambas as formas da enzima, o que demonstra um bom ajuste do modelo de Michalis-Menten para os dados experimentais.

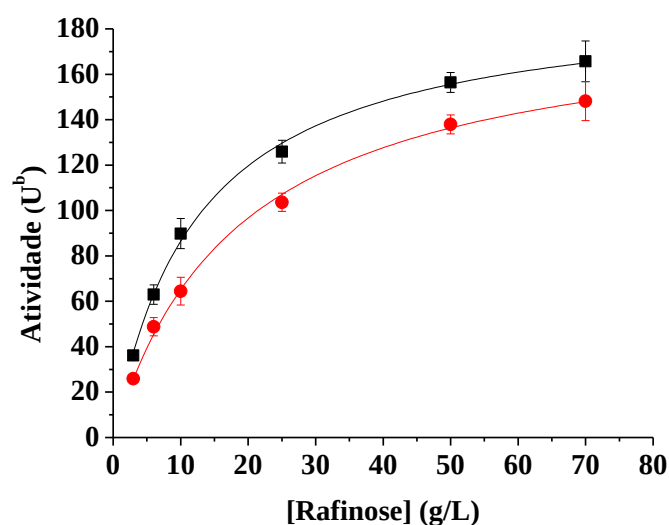


Figura 5.25 – Efeito da concentração do substrato rafinose na atividade da α -galactosidase livre (■) e imobilizada (◆) para hidrólises feitas a 40°C em pH 5,0. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a cinética da enzima livre (—) e imobilizada(—).

A distribuição dos resíduos em torno do zero para ambas as modelagens estão apresentadas pelas Figuras 5.26 e 5.27. Pelos gráficos verifica-se uma distribuição aleatória dos resíduos sobre o zero.

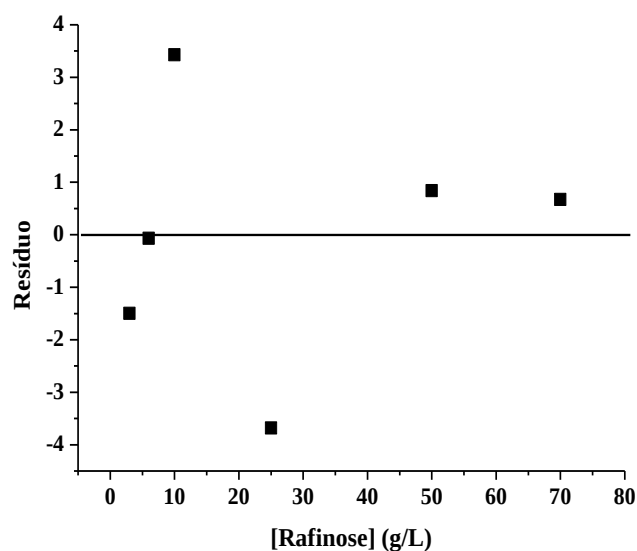


Figura 5.26 – Distribuição dos resíduos dos dados experimentais da α -galactosidase livre (■) para o ajuste da cinética Michaelis-Menten.

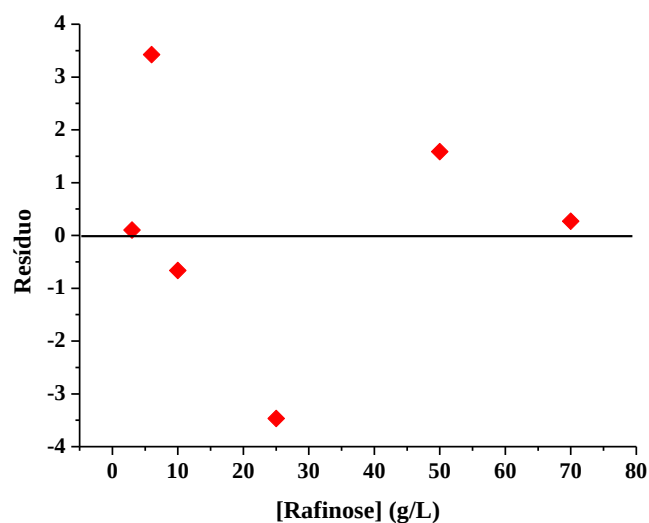


Figura 5.27 – Distribuição dos resíduos dos dados experimentais da α -galactosidase imobilizada (♦) para o ajuste da cinética de Michaelis-Menten.

Os parâmetros $V_{m\acute{a}x}$ e K_m encontrados pelo ajuste foram 194,5 U^b e 12,5 g/L de rafinose para a o biocatalisador solúvel e 187,7 U^b e 18,8 g/L de rafinose quando imobilizado (Tabela 5.16).

Tabela 5.16 – Valores estimados dos parâmetros $V_{m\acute{a}x}$, K_m e $V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$ do modelo cinético de Michaelis-Menten para α -galactosidase livre e imobilizada em Duolite A-568.

	Parâmetro	Valor	Erro padrão
α-galactosidase livre	$V_{m\acute{a}x}$	194,5 U ^b	3,56
	K_m	12,5 g/L rafinose	0,71
	$V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$	15,56 U ^b /(g/L rafinose)	---
α-galactosidase imobilizada	$V_{m\acute{a}x}$	187,7 U ^b	4,64
	K_m	18,8 g/L rafinose	1,27
	$V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$	9,98 U ^b /(g/L rafinose)	---

As Equações 5.11 e 5.12 apresentam o modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da rafinose pela α -galactosidase livre e imobilizada, respectivamente, na ausência de inibidores .

$$v = \frac{194,5 \cdot [S]}{12,5 + [S]} \quad (5.11)$$

$$v = \frac{187,7 \cdot [S]}{18,8 + [S]} \quad (5.12)$$

Em que:

v = velocidade de reação de hidrólise da rafinose;

$[S]$ = concentração do substrato rafinose em g/L

Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ apresentados foram próximos para ambas formas do biocatalisador. A diferença dos valores deste parâmetro calculado para α -galactosidase imobilizada (187,7 U^b) foi de apenas 3,5% do valor apresentado para sua forma livre (194,5 U^b). Porém a imobilização aumentou o K_m da α -galactosidase em 50% (de 12,5 para 18,8 g/L rafinose).

O parâmetro K_m está relacionado à afinidade da enzima ao substrato. Quanto menor o valor de K_m , maior é a afinidade e vice-versa. De maneira análoga, o valor do produto $V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$ também pode ser utilizado para obtenção da eficiência catalítica de determinada enzima. Valores maiores da relação $V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$ indicam maior eficiência (SEGEL, 1979). Pelos valores de K_m e de $V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$ apresentados na Tabela 5.16, pode-se concluir que a imobilização afetou negativamente a afinidade da enzima ao substrato rafinose assim como a sua eficiência catalítica. No entanto, aumentos no valor de K_m são muito comuns na literatura enzimas são imobilizadas.

Prashanth e Mulimani (2005) também observaram aumento do valor de K_m quando α -galactosidase proveniente de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em alginato de cálcio tratado com 1% de glutaraldeído. Estes autores obtiveram, para as enzimas solúvel e imobilizada, K_m de 2,77 e 4,38 g/L, respectivamente, quando rafinose foi utilizada como substrato. Estes valores representam um aumento de 62% do K_m após o processo de imobilização. A eficiência catalítica diminuiu aproximadamente 75%, valor superior aos 36% obtidos para imobilização em Duolite A-568 apresentada neste presente trabalho. Portanto, a diminuição da afinidade pelo substrato e da eficiência catalítica da α -galactosidase de *A. niger* quando imobilizada em Duolite A-568 foi menor do que para α -galactosidase de *A. oryzae* quando imobilizada em alginato de cálcio.

Utilizando o mesmo suporte (Duolite A-568), Marquez (2007) imobilizou invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O valor de K_m encontrado para esta enzima quando solúvel no meio de reação foi de 15,5 g/L sacarose. Após o processo de imobilização, o valor de K_m encontrado foi de 60,2 g/L sacarose, correspondendo a um aumento de 288%. Os valores de $V_{m\acute{a}x} \cdot K_m^{-1}$ para as formas livre e imobilizada foram, 1,86 e 0,28 U/(g/L de

sacarose), respectivamente, o que representa uma diminuição de 85%. Estes resultados indicam que a resina de troca iônica Duolite A-568 manteve melhor a afinidade pelo substrato e a eficiência catalítica da α -galactosidase quando comparada a invertase de *S. cerevisiae*.

Hernaiz e Crout (2000) observaram aumento de quase três vezes da constante K_m quando β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi retida no suporte Eupergit C. No entanto o valor de $V_{m\acute{a}x}$ foi praticamente o mesmo para as duas formas da enzima.

Os valores de K_m encontrados no experimento estão próximos aos valores obtidos para dois tipos de α -galactosidasas extraídas do fungo *Penicillium griseoroseum*. Quando purificadas as α -gal-I e α -gal-II apresentaram K_m de 14,5 e 15,4 g/L de rafinose em reações de hidrólise do oligossacarídeo em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 a 40°C (FALKOSKI, 2007).

Shivan e Mishra (2010), Ríos *et al.* (1993), Fialho *et al.* (2008) e Gote *et al.* (2006) obtiveram menores valores de K_m para α -galactosidasas provenientes de *Aspergillus nidulans* (6,06 g/L de rafinose), *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796 (2,94 g/L de rafinose), *Tachigali multijuga* (2,70 g/L de rafinose), e *Bacillus stearothermophilus* (2,02 g/L de rafinose).

5.11 – Influência da concentração do substrato juntamente com os produtos de hidrólise da rafinose na atividade da α -galactosidase imobilizada

As atividades medidas para cada ponto do Planejamento Composto Central realizado para quantificar a influência dos produtos de reação da hidrólise de rafinose na atividade da α -galactosidase estão apresentadas na Tabela 5.17.

Pelos resultados, verifica-se que a maior atividade ocorreu para o ponto experimental 5, que corresponde as concentrações de 10,0; 2,0 e 1,0 g/L de rafinose, sacarose e galactose, respectivamente. A menor atividade observada ocorreu para o ponto experimental 9, cujas concentrações de rafinose, sacarose e galactose no reator eram respectivamente, 1,76; 4,5 e 2,0 g/L.

Com o auxílio do software *Statistica 7.0*, uma regressão múltipla foi realizada sobre os dados experimentais para obtenção da Equação 5.13, onde a atividade enzimática está em função das concentrações de rafinose (X_1), sacarose (X_2) e galactose (X_3).

$$U^b = 33,13 + 20,15X_1 - 7,64X_2 - 7,89X_3 + 7,59X_2^2 \quad (5.13)$$

Tabela 5.17 – Planejamento Composto Central com os valores codificados e originais das variáveis concentração de rafinose, sacarose e galactose para o estudo da inibição da reação enzimática.

Experimento	Rafinose (g/L)	Sacarose (g/L)	Galactose (g/L)	Atividade (U ^b)
1	3 (-1)	2 (-1)	1 (-1)	37,2 ± 3,3
2	3 (-1)	2 (-1)	3 (+1)	19,4 ± 2,2
3	3 (-1)	7 (+1)	1 (-1)	18,4 ± 2,0
4	3 (-1)	7 (+1)	3 (+1)	4,15 ± 0,7
5	10 (+1)	2 (-1)	1 (-1)	76,0 ± 3,0
6	10 (+1)	2 (-1)	3 (+1)	68,1 ± 1,2
7	10 (+1)	7 (+1)	1 (-1)	70,5 ± 6,4
8	10 (+1)	7 (+1)	3 (+1)	25,8 ± 1,2
9	1,76 (-α)	4,5 (0)	2 (0)	13,1 ± 1,1
10	11,24 (+α)	4,5 (0)	2 (0)	67,6 ± 4,7
11	6,5 (0)	1,12 (-α)	2 (0)	51,4 ± 1,3
12	6,5 (0)	7,88 (+α)	2 (0)	46,0 ± 4,8
13	6,5 (0)	4,5 (0)	0,65 (-α)	42,0 ± 2,1
14	6,5 (0)	4,5 (0)	3,35 (+α)	36,5 ± 0,9
15	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)	25,3 ± 1,3
16	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)	24,3 ± 2,1
17	6,5 (0)	4,5 (0)	2 (0)	26,0 ± 1,7

U^b = gaçúcar redutor/(L.min.genzima)

Somente foram considerados significativos coeficientes com nível de significância menor que 10% ($p < 10\%$). Todos os coeficientes lineares e apenas o coeficiente quadrático da variável concentração de sacarose foram significativos. Nenhuma interação entre as variáveis foi significativa. O coeficiente de determinação obtido para o modelo foi 0,8501, mostrando-se satisfatório. Pelos valores dos coeficientes lineares, verifica-se que a rafinose apresentou maior efeito sobre a atividade enzimática (Equação 5.14).

As superfícies de resposta geradas pelos dados obtidos da Tabela 5.17 estão apresentadas pelas Figuras 5.28, 5.29 e 5.30.

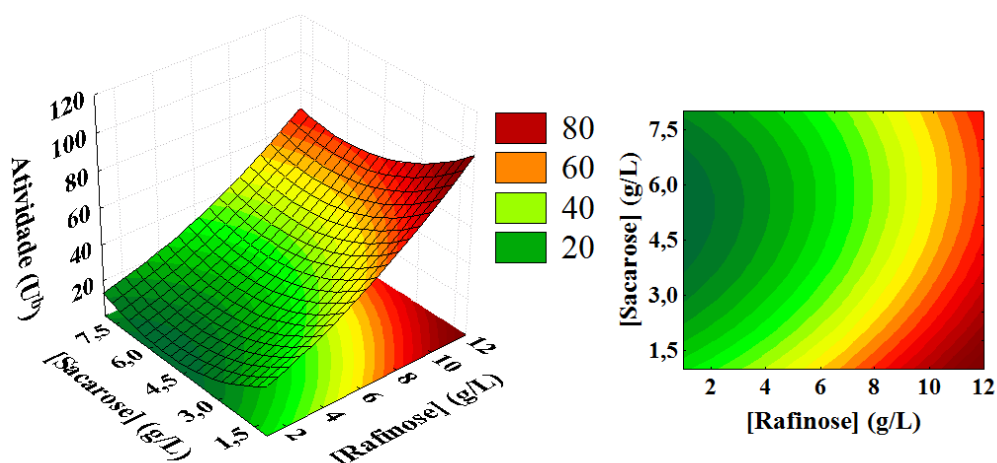


Figura 5.28 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de sacarose e rafinose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.

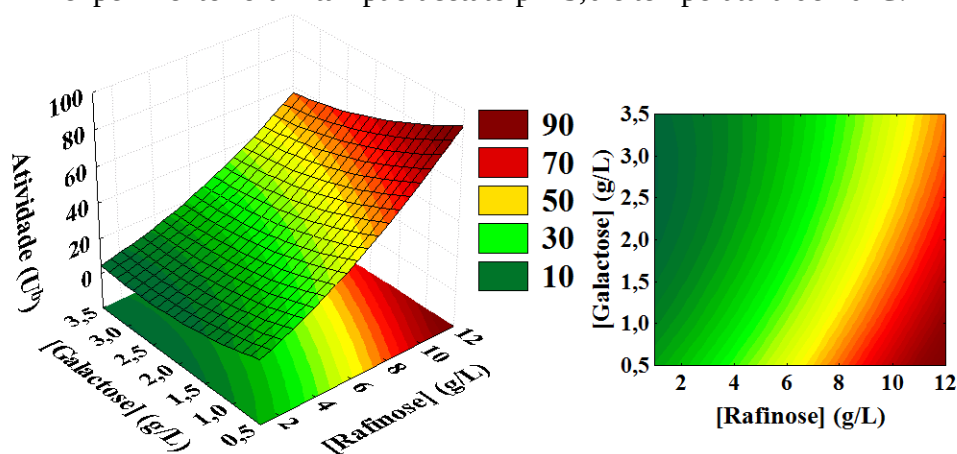


Figura 5.29 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de galactose e rafinose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.

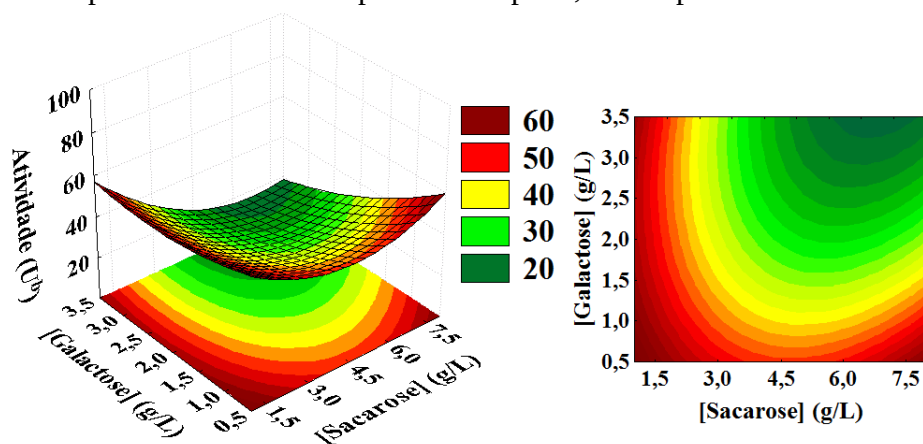


Figura 5.30 – Superfície de resposta do Planejamento Fatorial Completo para atividade da α -galactosidase em função das concentrações de galactose e sacarose. As condições do experimento foram tampão acetato pH 5,0 e temperatura de 40°C.

Observando os gráficos das Figuras 5.27 e 5.28 verifica-se maior atividade para altas concentrações do substrato rafinose e baixas concentrações dos produtos sacarose e galactose. Além disto, a Figura 5.29 apresenta alta inibição da reação enzimática para altas concentrações de galactose e sacarose.

Lee e Wacek (1970) observaram redução de 75,5; 93,0 e 98,5% da atividade de α -galactosidase de *Aspergillus niger* na presença de 1,08; 5,58 e 22,5 g/L de galactose no meio em presença do substrato p-nitrofenil-galactopiranosídeo (p-NPG). Manzanares *et al.* (1998) também verificaram forte poder de inibição da galactose para α -galactosidase proveniente deste mesmo micro-organismo. Utilizando p-NPG na concentração de 1,26 mM como substrato, os autores obtiveram 60% de redução da atividade quando 1 mM (1,8 g/L) de galactose esteve inicialmente presente no meio de reação.

A α -galactosidase de *A. terreus* também foi inibida pela presença de galactose. No entanto o mesmo não ocorreu para o dissacarídeo sacarose (FERREIRA, 2007).

Os resultados deste presente trabalho diferem dos obtidos para a α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* (FALKOSKI *et al.*, 2006) e *Rhizomucor miehei* (KATROLIA *et al.*, 2012), que não foram inibidas por galactose.

Pelos resultados apresentados, decidiu-se estudar a cinética de inibição da α -galactosidase imobilizada por galactose.

5.12 – Influência da concentração de galactose na cinética da α -galactosidase imobilizada

Os resultados de atividade da α -galactosidase para diferentes concentrações de rafinose e galactose estão apresentados na Tabela 5.18.

Verificou-se maior atividade para concentração de 20 g/L de rafinose sem galactose no meio reacional. Por outro lado, a atividade foi menor para menor concentração de substrato (3 g/L de rafinose) com alta concentração de inibidor (10 g/L de galactose).

Tabela 5.18 – Valores da atividade da enzima para diferentes concentrações de rafinose e galactose.

Experimento	Rafinose (g/L)	Galactose (g/L)	Atividade (U ^b)
1	3	0	27,1 ± 1,8
2	3	5	21,7 ± 2,2
3	3	10	18,1 ± 1,4
4	6	0	51,2 ± 6,3
5	6	5	38,0 ± 1,9
6	6	10	30,7 ± 1,2
7	10	0	67,3 ± 3,2
8	10	5	65,1 ± 3,8
9	10	10	45,3 ± 3,1
10	10	20	43,9 ± 4,1
11	15	0	83,6 ± 4,8
12	15	5	75,8 ± 5,0
13	15	10	61,4 ± 2,2
14	15	20	60,5 ± 1,9
15	20	0	102,2 ± 8,3
16	20	5	91,4 ± 3,3
17	20	10	84,6 ± 6,4
18	20	20	54,0 ± 2,9

U^b = g açúcar redutor/(L.min.g enzima)

Com auxílio do software *Statistica 7.0*, ajustou-se os dados experimentais obtidos para inibição da α -galactosidase, para análise do melhor modelo de inibição. Foram utilizadas as equações de inibição competitiva (Equação 4.28), não-competitiva (Equação 4.29), acompetitiva (Equação 4.30), mista-linear (Equação 4.31) e parcialmente não competitiva (Equação 4.32). Os resultados dos ajustes dos modelos de cada equação, com os respectivos valores dos parâmetros estimados e seus níveis de significância, coeficiente de determinação e soma do quadrado dos desvios estão apresentados na Tabela 5.19 e 5.20

Tabela 5.19 – Valores dos parâmetros $V_{máx}$, K_m e K_I para diferentes cinéticas de inibição estimadas por regressão linear não linear.

Tipo de inibição	$V_{máx}$	K_m	K_I
	Valor-p	Valor-p	Valor-p
Competitiva	190,0	17,61	16,56
	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-5}$
Não-competitiva	215,9	21,88	30,76
	1×10^{-6}	$2,3 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-6}$
Acompetitiva	265,88	30,82	10,73
	$2,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$
Mista-linear	204,06	19,85	23,1772
	$5,1 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-3}$	0,12
Parcialmente não-competitiva	225,80	24,25	60,1464
	$1,4 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-3}$	0,69

Tabela 5.20 – Valores dos parâmetros α e β , coeficiente de determinação e soma do quadrado dos desvios para diferentes cinéticas de inibição estimadas por regressão linear não linear.

Tipo de inibição	α	β	R^2	$\sum (V - V_{\text{modelo}})^2$
	Valor-p	Valor-p	Valor-p	
Competitiva	-	-	96,44	366,25
Não-competitiva	-	-	96,50	358,73
Acompetitiva	-	-	95,60	453,03
Mista-linear	2,2975		96,55	355,04
	0,66			
Parcialmente não-competitiva		-0,9751	96,27	384,10
		0,750089		

Os parâmetros dos modelos de inibição mista-linear e parcialmente não-competitiva apresentaram parâmetros com nível de significância maior que 10% e por isto não podem ser utilizados para representar a cinética enzimática de inibição por galactose. Os modelos de inibição competitiva, não-competitiva e incompetitiva apresentaram todos parâmetros significativos ao nível de 10% de probabilidade. Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) e a soma do quadrado dos desvios foram satisfatórios para os três modelos.

No entanto os valores estimados dos parâmetros $V_{máx}$ e K_m para inibição não-competitiva e incompetitiva diferem dos valores esperados quando comparados aos valores

estimados na cinética da α -galactosidase imobilizada sem inibição (item 5.10). Para estes modelos, é esperado uma diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ devido à inibição da atividade provocada pelo inibidor galactose quando comparada ao modelo sem inibição. Além disto, o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) deveria ser significativamente igual ao determinado na cinética sem inibição.

O modelo que melhor explicou a cinética de inibição foi o modelo de inibição competitiva, uma vez que os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m (190,0 U^b e 17,61 g/L de rafinose, respectivamente) estimados estão muito próximos aos valores determinados na cinética de Michaelis-Menten sem inibição (187,7 U^b e 18,8 g/L de rafinose, respectivamente). De fato, para o modelo de inibição competitiva, os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m são os mesmos dos valores observados para o modelo cinético sem inibição. O valor da constante de inibição (K_I) estimado foi de 16,65 g/L de galactose.

O gráfico de atividade da α -galactosidase imobilizada em função das concentrações de rafinose e galactose está apresentado pela Figura 5.31.

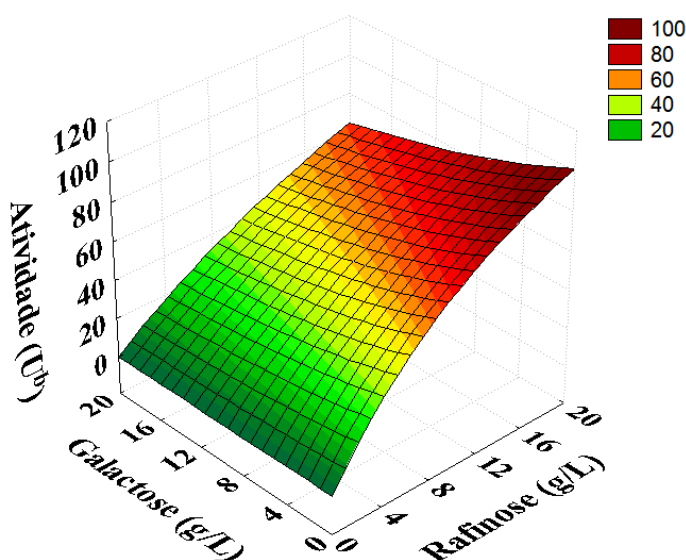


Figura 31 – Atividade da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 em função das concentrações de rafinose e galactose.

Ferreira (2007) também verificou tipo de inibição competitiva por galactose para α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. O substrato utilizado nas análises foi o p -nitrofenil-galactopiranosídeo. Este tipo de inibição por galactose também foi observada para α -galactosidase de *A. ficcum* NRRL 3135 e *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ZAPATER *et al.*, 1990; ZEILINGER *et al.*, 1993)

5.13 – Estocagem da α -galactosidase imobilizada

A Figura 5.32 apresenta os resultados de atividade da α -galactosidase imobilizada na resina Duolite A-568 até 145 dias quando armazenada à temperatura de 4°C. É claro observar que a imobilização manteve a atividade da enzima durante todo o período de estocagem.

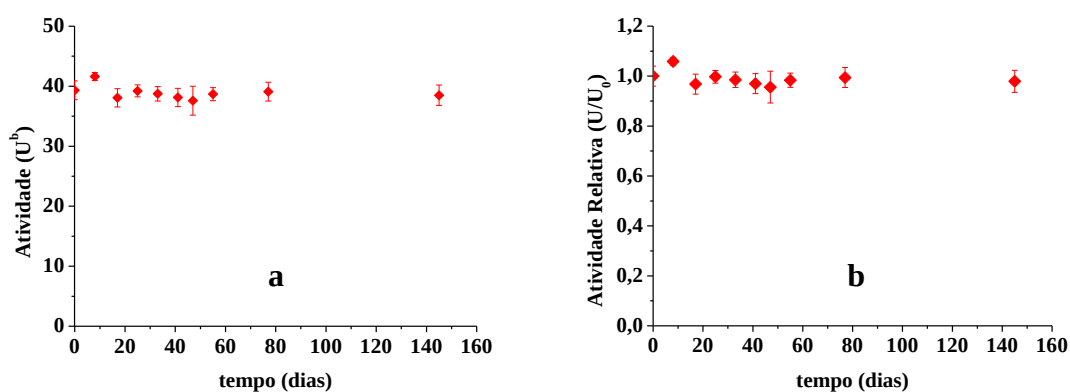


Figura 5.32 – Atividade (a) e atividade relativa (U/U_0) (b) da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 para um período de até 145 dias de armazenamento a 4°C em tampão acetato pH 4,5.

Este comportamento também foi observado para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A-568, que manteve atividade constante para mais de três meses quando estocada a 4°C em tampão acetato 0,1 M pH 4,5.

Os resultados obtidos mostraram que a enzima α -galactosidase de *A. niger* imobilizada na resina Duolite A-568 apresentou maior estabilidade de estocagem do que aos resultados obtidos por Naganagouda e Mulimani (2006) para α -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em alginato de cálcio e gelatina. Estes autores verificaram perda de pelo menos 50% da atividade inicial após 40 dias de estocagem a 4°C.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

Pelos resultados obtidos é possível concluir que:

- Dentre as resinas testadas, a resina Duolite A-568 se mostrou mais eficiente no processo de imobilização da α -galactosidase nas condições avaliadas.
- As condições ótimas de imobilização determinadas pelos planejamentos experimentais foram pH 4,5; concentração de enzima igual a 15g/L e tempo de imobilização de três horas.
- O uso de glutaraldeído 1% (v/v) como agente reticulante aumentou a retenção da enzima ao suporte.
- A temperatura ótima para as duas formas da enzima (livre e imobilizada) foi 60°C. A faixa de pH ótimo da enzima livre esteve compreendido entre 4,0 a 6,0 e para a enzima imobilizada o intervalo foi de 4,0 a 6,0. A imobilização aumentou a atividade catalítica da α -galactosidase para pHs mais alcalinos.
- Ambas as formas da enzima apresentaram boa resistência para toda a faixa de pH estudado (3,5 a 7,5 para livre e 3,0 a 8,0 para imobilizada). No entanto a análise de resistência à temperatura indicou que a imobilização diminuiu a resistência térmica da α -galactosidase.
- A imobilização praticamente não afetou o valor de $V_{m\acute{a}x}$ da enzima. No entanto o valor da constante de Michaelis-Menten, K_m , aumentou em 50%, indicando que a afinidade pelo substrato foi diminuída.
- A reação de hidrólise da rafinose foi inibida pela presença dos produtos da reação, sacarose e galactose.
- O modelo que melhor explicou a inibição da atividade da α -galactosidase pela galactose foi o de inibição competitiva.
- Duolite A-568 previamente tratada com glutaraldeído 1% (v/v) manteve a atividade da α -galactosidase mesmo após 145 dias de estocagem a 4°C em pH 4,5 (tampão acetato).

6.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a remoção de oligossacarídeos de leite de soja utilizando α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568.
- Estudar a aplicação da α -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 na remoção da rafinose em melaço de soja.
- Estudar métodos que poderiam melhorar a resistência térmica da enzima imobilizada na resina de troca iônica, como por exemplo o pré-tratamento em soluções concentradas do aminoácido lisina.
- Avaliar estudos de incubação da enzima imobilizada em pHs alcalinos com o objetivo de melhorar a atividade.
- Estudar o processo de hidrólise de oligossacarídeos da rafinose em leite fixo.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMARK, P. LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 441-448, 2001

ALANI, S. R.; SMITH, D. M.; MARKAKIS, P. α -galactosidases of *Vigna Unguiculata* *Phytochemistry*, v. 28, n. 8, p. 2047-2051, 1989.

ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M. LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Process Biotechnology*, v. 8, 2005

BAKUNINA, I. Y.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHCHIPUNOV, Y. A. Immobilization of α -Galactosidase inside Hybrid Silica. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v.79, p. 827-832, 2006

BHASKAR, B.; RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T. K. Alpha-galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* SW. *Journal of Food Biochemistry*, v. 14, p. 45-49, 1990.

BAYRAKTAR, H.; SERILMEZ, M.; KARKAS, T.; ÇELEM, E. B.; ONAL, S. Immobilization and stabilization of alpha-galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, p. 855-860, 2011.

BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F. J.; MORAES, F.; ZANIN, G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, p. 4-7, 2000.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. *Statistic for experiments. An introduction to design, data analysis and model building*. New York; Wiley, 1978.

BRASIL, A. P. R.; REZENDE, S. T.; PELÚZIO, M. C. G.; GUIMARÃES, V. M. Removal of oligosaccharides in soybean flour and nutritional effects in rats. *Food Chemistry*, v. 118, p.251-255, 2010.

CABRAL, J. M. F. *Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição*. Tese de doutorado. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, 1982.

CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 387-394, 2003.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 9, p. 217-226, 2005.

CAO, Y; YANG, P.; SHI, P.; WANG, Y.; LUO, H.; MENG, K.; ZHANG, Z.; WU, N.; YAO, B.; FAN, Y. Purification and characterization of a novel protease-resistant α -galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 835-841, 2007.

CHEN, J.; WANG., Q; HUA, Z.; DU, G. Research and application of biotechnology in textile industries in China. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p.1651-1655, 2007.

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

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. South Africa, v. 49, p. 326-346, 2011.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of Biotechnology*, v. 125, p. 395-407, 2006

DEY, P. M. IN: PM dey, RA Dixon, eds,. *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. New York: Academic Press, p. 53-129, 1985.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, New York Inc., 1997.

FALKOSKI, D. L. Purificação e caracterização de α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2007

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; CALLEGARI, C. M.; REIS, A. P.; REZENDE, S. T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54(26), p. 10184-90, 2006.

FERREIRA, J. G. Purificação parcial e caracterização bioquímico-cinética de α -galactosidase de *Aspergillus terreus*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

- FIALHO, L. S.; GUIMARÃES, V. M.; CALLEGARI, C. M.; REIS, A. P.; BARBOSA, D. S.; BORGES, E. C. L.; MOREIRA, M. A. Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry*, v. 69, p. 2579-2585, 2008.
- FILHO, M.; PESSELA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; LAFUENTE, R. F.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1142-1146, 2008.
- FREITAS, F. F. Otimização do Processo de Imobilização de β - Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.
- FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P. BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L. RIBEIRO, E. A comparison of the kinetic properties of the free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 58-59, p. 33-38, 2011.
- GIRELLI, A. N.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*, v. 819, p. 3-16, 2005.
- GIRIGOWDA, K.; MULIMANI, V. H. Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 437-442, 2006.
- GÓES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. α -galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. *Semina: Ciências Agrárias*, v.23, n.1, p.111-119, 2002.
- GOLUBEV, A. M.; NAGEM, R. A. P.; BRANDÃO NETO, J. R.; NEUSTROEV, K. N.; ENEYSKAYER, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; SHABALIN, K. A.; SAVEL'EV, A. N. POLICARPOV, I. Chrystal structure of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: Implications for Catalytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v. 339, p. 413-422, 2004.
- GOTE, M. M.; KHAN, M. I.; GOKHALE, D.V.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Process Biochemistry*, v. 41, p.1311-1317, 2006.
- GUIDINI, C. Z. Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

GUIDINI, C. Z.; FISHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, v. 52, p. 137-143, 2010.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme Microb. Technol*, Butterworth & Co.v.7. pp. 50-59, 1985.

HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 26-32, 2000.

HOBBS, L.; MITRA, M.; PHILLIPS, R.; HAIBACH, H.; SMITH, D. Deantigenation of human type B erythrocytes with glycine max α -D-galactosidase. *Biomed and Pharmacother*, v. 5, p. 244-250, 1995.

HU, H. L.; BRINK, J. V. D.; GRUBEN, B. S.; WOSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 248-252, 2011.

KANG, H.C.; LEE, S. H. Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh. *Phytochemistry*, v. 58, p. 213-219, 2001.

KATROLIA, P.; JIA, H.; YAN, Q.; SONG, S.; JIANG, Z.; XU, H. Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. *Bioresourse Technology*, v. 110, p. 578-586, 2012.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization – in *Biotechnology*, v. 7a, p. 347-404, 1987.

KILINC, A.; ONAL, S.;TELEFONÇU, A. Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipolydicholide. *Process Biochem.*, v. 38, p. 641-647, 2002.

KIM, W. D.; KOBAYASHI, O.; KANEKO, S.; SAKAKIBARA, Y.; PARK, G.G.; KUSAKABE, I.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. *Phytochemistry*, v. 61, p.621-630, 2002.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 345-351, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enz. and Microbial Tech*, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRAJEWSKA, B. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: a review. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 22-40, 2009.

KURAKEKE, M.; MORIYAMA, Y.; SUNOUCHI, R.; NAKATANI, S. Enzymatic properties and transglycosylation of α -galactosidase from *Penicillium oxalicum* SO. *Food Chemistry*, v. 126, p. 177-182, 2011.

LEE, Y. C.; WACEK, V. Galactosidases from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 138, p. 264-271, 1970

LINDEN, J. C. Immobilized α -D-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microbial Technology*, v. 4, p.130-136, 1982.

LINTHORST, G. E.; HOLLACK, C. E. M.; DONKER-KOOPMAN, W. E.; STRIJLAND, A.; AERTS, J. M. G. F. G. Enzyme therapy for Fabry disease: Neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. *Kidney International*, v. 66, p. 1589-1595, 2004

LÓPEZ, C.; RÍOS S. D.; LÓPEZ-SANTÍN, J.; CAMINAL, G. ÁLVARO, G. Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 414-421, 2010

LÓPEZ-GALLEGU, F.; BETANCOR, L; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, v. 119, p. 70-75, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MILLER, G. L. Use of Dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis Chem.*, v.31, p.426-428, 1959.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 383-390, 1998.

MARQUEZ, L. D. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resina. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU), 2007.

- MARQUEZ, L. S. D.; CABRAL, B. V. CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in íon Exchange resin for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51; p.86-92, 2008.
- MARRACINI, P.; ROGERS, W. R.; CAILLET, V.; DESHAYES, A.; GRANATO, D.; LAUSANE, F.; LECHAT, S.; PRIDMORE, D.; PÉTIARD, V. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 909-920, 2005.
- MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de células em géis de quitosana. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, 2007.
- MITTAL, Y.; SHARMA, C. Development of α -galactosidase isoenzymes in chickpea seed. *Plant Science*, v. 77, p. 185-190, 1991.
- MORÉ, J. J. The Levenberg-Marquadt Algorithm: Implementation and Theory. In G. A. Watson, (ed.), *Lecture Notes in Mathematics* 630, p. 105-106. Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. Harper: *Bioquímica Ilustrada*. 27 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. 620 p.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 19003-1907, 2006
- NANBA, H.; IKENAKA, Y.;YAMADA, Y.; YAJIMA, K.; TANAKO, M.; OHKUBO, K.; HIRAIISHI, Y.; YAMADA, K.; TAKAHASHI, S. Imobilization of thermotolerant N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase. *Journal od Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 6, p. 257-263, 1999.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: *Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, 2000. 1152 p.
- NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. *Journal of American Chemical Society*, v. 38, p.1109, 1916.
- OKUTUKU, B.; ÇELEM, E. B.; ONAL, S. Immobilization of α -galactosidase on galactose-containing polymeric beads. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 200-205, 2010.
- OLIVEIRA, M. S. Flotação em colunado rejeito remoído do processo de concentração da apatita. Dissertação de Mestrado FEQUI/UFU, Uberlândia, 131p., 2004.

OZDURAL, A. R.; TANYOLAÇ, D.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M.; WEBB, C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, p. 27-36, 2003.

PEDROCHE J.; YUST M.M.; MATEO C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GIRON-CALLE J.; ALAIZ M. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol*, v. 40, p. 1161-1167, 2007.

PESELA, B. C.; MATEO, C.; FILHO, M.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZ LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Stabilization of the quaternary structure of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. *Process biochemistry*, v. 43, p. 193-198, 2008.

PRASHANTH, S. J.; MULIMANI, V. H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae*- α -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1199-1205, 2005.

PUCHART, V.; VRSANSKÁ, M.; BHAT, M. K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochemica et Biophysica Actá. Slovakia*, v. 1524, p. 27-37, 2000.

REZENDE, S. T.; GUIMARÃES, V. M.; RODRIGUES, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of na α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 195-202, 2005.

REIS, A. P. Purificação, caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Aspergillus terreus*. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

RIOS, S.; PEDREGOSA, A. M.; MONISTROL, I. F.; LABORDA, F. Purification and molecular properties of na α -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 112, p. 35-42, 1993.

SAITO, T.; YOSHIDA, Y.; KAWASHIMA, K.; LIN, K. H.; INAGAKI, H.; MAEDA, S.; KOBAYASHI, T. Influence of aldehyde groups on the thermostability of an immobilized enzyme on an inorganic support. *Materials Science and Engineering*, v. C5, p. 149-152, 1997.

SANTOS, S. Imobilização de lipase em gel de pectina. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SEGEL, I. H. Bioquímica. Teoria e Problemas. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, 527p., 1979.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M. WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 409, p. 258-268, 2001

SCIGELOVA, M.; CROUT, D. H. G. Purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 8, p. 175-181, 2000.

SHANKAR, S. K.; MILUMANI, V. H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 958-961, 2007.

SHIVAM, K.; MISHRA, S. K. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1088-1093, 2010.

SHIVANNA, B.D.; RAMAKRISHNA, M. α -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). *Journal of Bioscience*, v. 9 (1,2), p. 109-16. 1985.

SOH, C. P.; ALI, Z. M.; LAZAN, H. Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry*, v. 67, p. 242-254, 2006.

SOMIARI, R. I.; BALOGH, E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 311-316, 1995.

TAVARES, B.B.L. Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

THANANUNKUL, D. TANAKA, M. CHICHESTER, C. O.; LEE, T. C. Degradation of raffinose and stachyose in soymilk by α -galactosidase from *Moriettiella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. *Journal of Food Science*, v. 41, p.173-175, 1976.

THIPPESWAMY, S.; MULIMANI, V. H. Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 635-640, 2002.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers. *Trends Biotechnology*, v. 17, p.326-335, 1999.

VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; FALKOSKI, D. L.; LEITE, T. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A.; GUIMARÃES, V. M. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. *Food Chemistry*, v. 103, p. 331-337, 2007.

VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; MARQUES, V. M. M.; TREVIZANO, L. M.; PASSOS, F. M. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; MEMQUERER, M. P.; OLIVEIRA, J. S.; GUIMARÃES, V. M. Extracellular α -galactosidases from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2385-2391, 2006.

VIANA, S. F.; GUIMARÃES, V. M.; JOSÉ, I. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; COSTA, N. M. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. *Food Chemistry*, v. 93, p.665-670, 2005.

VIETH, W. R. *Bioprocess Engineering: kinetic, mass transport, reactors and gene expression*. New York, John Wiley & Sons, 1994.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.; GRAILLE, M. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, v. 9, p. 133-148, 2000.

WONG, H. C.; HU, C. A.; YEH, H. L.; SU, W.; LU, H. C.; LIN, C. F. Production, purification and characterization of α -galactosidase from *Monascus pilosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, p. 1147-1152, 1986.

ZAPATER, I. G. ULLAH, A. H. WODZINSKI, R. J. Extracellular alpha galactosidase (E. C. 3.2.1.22) from *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 purification and characterization. *Preparative Biochemistry*, v. 20 (3-4), p.263-96, 1990.

ZEILINGER, S.; KRISTUFEKM D.; ARRISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C. Condition of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p.1347-1353, 1993.

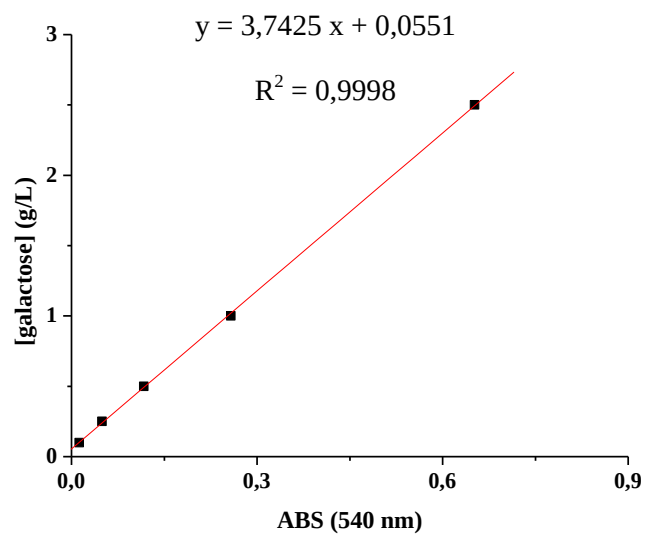
CAPÍTULO 8

APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A.1 - Curva de calibração do DNS

[Galactose] (g/L)	ABS 1	ABS 2	Média
0,1	0,0125	0,0128	0,01265
0,25	0,0483	0,0507	0,0495
0,5	0,1144	0,1196	0,1170
1	0,2598	0,256	0,2579
2,5	0,6499	0,6534	0,6516



A.2 - Curva de calibração do teor de proteína pelo método de Lowry *et al.* (1951)

BSA [g/L]	ABS
0	0
0,08	0,1868
0,16	0,3375
0,24	0,47
0,32	0,5961
0,4	0,7188
0,48	0,8126
0,56	0,9003

