



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica

Autora: Carla Zanella Guidini

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Co-orientador: Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Uberlândia - MG

Agosto 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica

Carla Zanella Guidini

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 28 /08 /2009

BANCA EXAMINADORA:

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

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

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

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

Prof^a. Dr^a. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
(EQ/ UFRJ)

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível, aos meus pais Selvino e Fiora, minha irmã Kelli e ao meu namorado Paulo Henrique; pelo esforço, dedicação, apoio e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Muito Obrigada

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pela dádiva da vida e por, em muitos momentos aflitivos, proporcionar-me a sua paz e a serenidade para enfrentar os obstáculos que me atravessavam e superar os desafios.

Aos meus pais Selvino e Fiora por serem exemplos de vida, dedicação e amor no qual me espelho, especialmente pela capacidade de superar grandes conflitos e permanecer seguro da superação. Agradeço pela devoção dedicada à minha criação e por me auxiliar com seus pensamentos positivos e orações nos momentos mais difíceis na realização desse trabalho. À minha irmã, Kelli, pelo amor incondicional e apoio demonstrado.

E ao meu namorado Paulo Henrique, que sempre me incentivou, apoiou e o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos.

Ao meu orientador, Professor Eloízio Júlio Ribeiro, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foi capaz de me fazer trilhar por um crescimento profissional que julgava impossível em tão pouco tempo. Toda minha admiração por seu brilhantismo acadêmico se torna secundária quando contemplo seu lado humanista. Orientador é uma palavra ideal para defini-lo: é sob sua tutela que guio meus passos. Muito obrigado por ter sido um “paizão”!

Um forte agradecimento à professora Vicelma Luiz Cardoso, pela co-orientação, disponibilidade constante, pela paciência, sugestões, amizade e acima de tudo o incentivo constante que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À banca examinadora, pela revisão precisa. O mesmo vale para o apoio incondicional recebido dos professores da FEQUI, em especial para a professora Miriam Maria de Resende pelas diretrizes necessárias e análise dos resultados.

Aos funcionários da FEQUI: Cleide, José Henrique, Roberta, Silvino, Tiago, Édio e Zuleide pela disposição e prontidão em ajudar-me sempre que precisei.

Às amigas de laboratório, em especial Maurielem e Janaína, pela amizade e companherismo nos longos períodos de experimento.

Agradeço a Larissa e a Gabriela pelo auxílio, competência, amizade e colaboração prestados para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês são ótimas. Contem sempre comigo!

CONFIE SEMPRE

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda Que Os Teus pés estejam sangrando, segue para a frente, erguendo-a por luz celeste, acima De ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera Com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança Em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação Da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.

Xico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SIMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – Leite	4
2.2 – Lactose.....	5
2.2.1 – Ocorrência.....	6
2.2.2 – Propriedades.....	7
2.3 – Hidrólise de lactose do leite.....	12
2.4 – Enzimas.....	14
2.4.1 – Enzima β -galactosidase.....	16
2.4.1.1 – Principais fontes de β -galactosidase.....	18
2.5 – Imobilização de enzimas.....	19
2.5.1 – Métodos de imobilização de enzimas.....	21
2.5.1.1 – Ligação a suportes insolúveis.....	23
2.5.1.2 – Imobilização por retenção física.....	27
2.5.2 – Comparação entre os métodos de imobilização.....	28
2.5.3 – Suportes para imobilização.....	29
2.5.4 – Imobilização em resinas.....	31
2.5.5 – Efeitos dos métodos de imobilização na cinética e propriedades das enzimas.....	33
2.5.6 – Reatores para enzimas imobilizadas.....	33
2.5.6.1 – Reatores descontínuos.....	35
2.5.6.2 – Reatores contínuos.....	35
2.5.6.3 – Influência de alguns fatores na escolha do reator.....	36
2.6 – Cinética enzimática.....	37
2.6.1 – Presença de inibidores no meio reacional.....	39
2.6.2 – Parâmetros cinéticos.....	42
2.6.3 – Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	43
2.6.4 – Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas.....	44
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 – Materiais.....	49
3.1.1 – Unidade experimental.....	49
3.1.2 – Enzima.....	50
3.1.3 – Suportes para imobilização.....	50
3.2 – Metodologia.....	51
3.2.1 – Determinação da atividade de β -galactosidase imobilizada pelo método das atividades iniciais.....	51
3.2.2 – Planejamento fatorial completo.....	52
3.2.3 – Planejamento composto central.....	53
3.2.4 – Imobilização de β -galactosidase.....	54
3.2.4.1 – Escolha das resinas para a imobilização de β -galactosidase.....	54

3.2.4.2 – Testes preliminares da influência do tempo e das variáveis consideradas significativas no processo de imobilização.	54
3.2.4.3 – Influência do pH e concentração de enzima no meio de imobilização.....	56
3.2.4.4 – Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada.....	58
3.2.4.4.1 – Influência da concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada.....	58
3.2.4.5 – Estudo da enzima imobilizada em relação ao número de usos.....	60
3.2.4.6 – Estabilidade da enzima imobilizada com e sem o processo de ligação cruzada em relação ao pH.....	60
3.2.4.7 – Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada.....	61
3.2.4.8 – Influência da concentração inicial de lactose na atividade de β -galactosidase imobilizada.....	62
3.2.4.9 – Influência da concentração inicial de lactose, glicose e galactose na atividade de β -galactosidase imobilizada.....	62
3.2.4.10 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada.....	64
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1 – Escolha do suporte.....	67
4.2 – Escolha do tempo e das faixas para estudo da imobilização de β -galactosidase.....	68
4.3 – Otimização do processo de imobilização.....	77
4.4 – Resultados dos testes preliminares do processo de ligação cruzada.....	82
4.5 – Otimização do processo de ligação cruzada.....	82
4.6 – Estabilidade da enzima imobilizada em relação ao número de usos.....	87
4.7 – Influência na estabilidade da enzima imobilizada com e sem o processo de ligação cruzada em relação ao pH.....	88
4.8 – Otimização da influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada com ligação cruzada em duolite A-568.....	89
4.9 – Influência da concentração de lactose na cinética de β -galactosidase imobilizada.....	94
4.10 – Influência da concentração dos produtos glicose e galactose na cinética da reação da enzima imobilizada.....	96
4.11 – Influência da concentração de galactose na atividade da enzima imobilizada.....	102
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	108
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	110
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXO.....	122
APÊNDICE.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Composição média do leite.....	4
Figura 2.2 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose	8
Figura 2.3 - Reação da cristalização da lactose.....	9
Figura 2.4 – Produtos derivados da lactose.....	10
Figura 2.5 - Processos de hidrólise de lactose.....	13
Figura 2.6 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: Albumina.....	22
Figura 2.7 – Esquema do mecanismo da inibição competitiva.....	39
Figura 2.8 – Esquema do mecanismo da inibição não-competitiva.....	40
Figura 2.9 – Esquema do mecanismo da inibição incompetitiva.....	40
Figura 3.1 – Unidade Experimental em reator tipo cesta.....	49
Figura 3.2 – Tipos de resinas empregadas para imobilização de enzima β -galactosidase.....	50
Figura 4.1 – Valores preditos em função dos valores observados.....	70
Figura 4.2 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	71
Figura 4.3 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática.....	71
Figura 4.4 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e pH na atividade enzimática.....	72
Figura 4.5 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e concentração de enzima na atividade enzimática.....	72
Figura 4.6 – Valores preditos em função dos valores observados.....	75
Figura 4.7 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	75
Figura 4.8 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática.....	76
Figura 4.9 – Superfície de resposta da influência do tempo e concentração de enzima na atividade enzimática.....	76
Figura 4.10 – Superfície de resposta da influência do tempo e pH na atividade enzimática.....	77
Figura 4.11 – Valores preditos em função dos valores observados.....	80
Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	80
Figura 4.13 – Superfície de resposta da influência da concentração de β -galactosidase e pH na atividade enzimática na imobilização.....	81
Figura 4.14 – Valores preditos em função dos valores observados.....	85
Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	85
Figura 4.16 – Superfície de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e tempo na atividade enzimática do processo de ligação cruzada.....	86
Figura 4.17 – Estabilidade da enzima imobilizada após 30 usos com e sem a adição de glutaraldeído.....	87
Figura 4.18 – Influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada sem o processo de ligação cruzada.....	88
Figura 4.19 – Influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada com o processo de ligação cruzada.....	89
Figura 4.20 – Valores preditos em função dos valores observados.....	92
Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	92
Figura 4.22 - Superfície de resposta da influência do pH e temperatura da reação na atividade enzimática.....	93
Figura 4.23 – Influência da concentração de lactose (S) na velocidade inicial da	95

reação da enzima β -galactosidase imobilizada.....	
Figura 4.24 – Valores preditos em função dos valores observados.....	96
Figura 4.25 – Valores preditos em função dos valores observados.....	100
Figura 4.26 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	100
Figura 4.27 - Superfície de resposta da influência da lactose e glicose na atividade enzimática.....	101
Figura 4.28 - Superfície de resposta da influência da lactose e galactose na atividade enzimática.....	101
Figura 4.29 - Superfície de resposta da influência da galactose e glicose na atividade enzimática.....	102
Figura 4.30 – Perfil da influência da concentração de galactose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.....	105
Figura 4.31 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta da atividade enzimática.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.....	9
Tabela 2.2 - Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase.....	18
Tabela 2.3 - Propriedades das lactases.....	19
Tabela 2.4 – Alguns trocadores iônicos.....	25
Tabela 2.5 – Alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos.....	29
Tabela 2.6 – Classificação dos suportes conforme a composição.....	30
Tabela 2.7 - Parâmetros básicos de íons-trocadores.....	32
Tabela 2.8 - Classificação de reatores enzimáticos.....	34
Tabela 2.9 - Alguns modelos cinéticos enzimáticos.....	41
Tabela 2.10 - Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase.....	43
Tabela 2.11 - Diferentes fontes de lactase em relação ao pH ótimo e temperatura ótima.....	44
Tabela 3.1 - Matriz Planejamento Fatorial Completo (1).....	55
Tabela 3.2 - Matriz Planejamento Fatorial Completo (2).....	56
Tabela 3.3 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito do pH e concentração de enzima na imobilização de β -galactosidase na resina Duolite A-568.....	57
Tabela 3.4 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito da concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada.....	59
Tabela 3.5 - Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada.....	61
Tabela 3.6 - Matriz Planejamento Composto Central da influência da concentração inicial de lactose, glicose e galactose na atividade enzimática.....	63
Tabela 3.7 – Estudo da influência da variação de concentração da lactose (S) e galactose (I) para determinação do estudo cinético de inibição enzimática.....	66
Tabela 4.1 – Resultado preliminar para escolha da resina na imobilização da enzima β -galactosidase.....	67
Tabela 4.2 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo 1.....	68
Tabela 4.3 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	69
Tabela 4.4 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	70
Tabela 4.5 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo (2).....	73
Tabela 4.6 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	74
Tabela 4.7 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	74
Tabela 4.8 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central da imobilização.....	78
Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	79
Tabela 4.10 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	79
Tabela 4.11 – Resultado preliminar para o processo de ligação cruzada.....	82
Tabela 4.12 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central do processo de ligação cruzada.....	83
Tabela 4.13 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	84
Tabela 4.14 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central da influência conjunta do pH e temperatura.....	90
Tabela 4.15 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	91
Tabela 4.16 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	91
Tabela 4.17 – Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração inicial de	94

lactose (S).....	
Tabela 4.18 – Atividade enzimáticas em presença de glicose, galactose e lactose.....	97
Tabela 4.19 – Resultados da regressão múltipla de todos os parâmetros.....	98
Tabela 4.20 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	99
Tabela 4.21 – Resultados experimentais de velocidade de reação em função das concentrações iniciais de lactose (S) e galactose (I) no meio reacional.....	103
Tabela 4.22 – Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de galactose como inibidor.....	104

Lista de Símbolos

μm	Micro metro
β	Beta - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α	Alfa - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α/β	Razão entre as solubilidades das formas alfa e beta-lactose
V_m	Velocidade máxima de reação
K_m	Constante do modelo de Michaelis-Menten
S	Substrato
K_i	Constante de inibição
I	Inibidor
V_m	Velocidade máxima de reação
mM	Mili mol
U	Atividade (grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada)
v	Taxas iniciais de reação ou velocidade da reação
$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios

RESUMO

Neste trabalho estudou-se o processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído, utilizando como suporte resinas de troca iônica Duolite A-568, Duolite S-761, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C e Amberlite 252 Na. Através de resultados preliminares a resina Duolite A-568 apresentou melhor retenção de atividade enzimática, sendo assim a mesma foi utilizada para o trabalho subsequente. A influência da concentração da enzima e do pH no processo de imobilização foi estudada empregando um Planejamento Composto Central (PCC) fixando tempo de 12 horas e temperatura de 25°C. As condições ótimas de imobilização foram pH 4,5 e concentração de β -galactosidase de 16 g/L. Na seqüência, foi realizado um estudo da influência da concentração de glutaraldeído como agente reticulante e do tempo de reação na atividade e na estabilidade do biocatalisador imobilizado. A concentração de glutaraldeído que implicou em um biocatalisador de maior atividade enzimática foi de 3,5 g/L, num tempo de reação de 1,50 horas. A atividade da enzima imobilizada sem tratamento com glutaraldeído após 30 usos foi de 51% em relação à inicial, enquanto que a da enzima imobilizada com reticulação foi de 90%. A enzima imobilizada empregando ligação cruzada com glutaraldeído foi muito mais estável em relação ao pH quando comparada àquela sem o referido tratamento. A seguir foi realizado um estudo da influência conjunta da temperatura e do pH na atividade da enzima imobilizada por meio de um PCC, utilizando o biocatalisador produzido nas condições otimizadas de imobilização e ligação cruzada. Com o emprego da técnica de superfície de resposta foi possível otimizar, dentro das faixas estudadas, as variáveis pH igual a 4,1 e temperatura de 34°C. A influência da concentração de lactose foi estudada para uma faixa de 5 a 140 g/L e o modelo de Michaelis-Menten ajustou-se bem aos resultados experimentais, com valores de V_m e K_m de 0,71 U e 35,30 mM, respectivamente. No estudo da influência da galactose como inibidor da reação de hidrólise, o modelo que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o modelo de inibição competitivo, com valores de V_m , K_m e K_i iguais 0,77 U, 12,07 g/L e 4,94 g/L respectivamente.

Palavras-chave: β -galactosidase, hidrólise da lactose, imobilização, Duolite A-568, glutaraldeído.

ABSTRACT

In this work was studied the immobilization process of *Aspergillus oryza* β -galactosidase by adsorption and cross-linking with glutaraldehyde, using as carrier ions-exchangers such as Duolite A-568, Duolite S-761, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C and Amberlite 252 Na. Through innitial experiments, Duolite A-568 was choosed for the continuance of the work. The influence of the enzyme concentration and pH in the immobilization process was studied using a Central Composit Design (PCC) for a fixed time of 12 hours and temperature of 25°C. The optimal conditions for enzyme immobilization were pH 4,5 and galactosidase concentration 16 g/L. In the sequence, was studied the influence of glutaraldehyde concentration as cross-linking reagent and reaction time in the activity and in stability of the immobilized biocalyst, which were of 3,5 g/L and 1,50 h. The residual activity of the immobilized enzyme without cross-linking with glutaraldehyde after 30 uses was 51% as compared with the initial activity, while the enzyme immobilized with cross-linking was 90%. The immobilized enzyme with cross-linking presented higher pH stabilyt pH when compared to that without the referred treatment. The simultaneous influence of pH and temperature on the immobilized enzyme activity was studied through a PCC with the biocalyst produced in the optimized conditions of immobilization process. With the technique response surface it was possible to obtain the optimized pH of 4,1 and temperature of 34°C. The influence of the lactose concentration was studied in the range of 5 to 140 g/L and the Michaelis-Menten model was adjusted to the experimental results, with values of V_m and K_m of 0,71 U and 12,07 g/L, respectively. In the study of the influence of the galactose as inhibitor of the lactose hydrolysis, the competitive inhibition model was adjusted to the experimental results and the values of V_m , K_m and K_i were 0,77 U, 12,07 g/L and 4,94 g/L respectively.

Keywords: β -galactosidase, lactose hydrolysis, immobilization, Duolite A-568, glutaraldehyde.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento significativo na expansão do consumo mundial de leite, queijos e derivados lácteos. Devido ao elevado valor nutritivo e a sua importância comercial, diversos estudos têm sido realizados para a separação e recuperação das proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais presentes no mesmo. O leite é o alimento mais completo de que se pode dispor, devendo ser tomado principalmente por crianças, pois é um dos grandes responsáveis pelo crescimento e saúde infanto-juvenil. Considerando sua composição não há alimento que se possa comparar, sendo uma mistura nutritiva de gordura, proteínas, lactose, vitaminas e outros componentes suspensos na água.

A produção mundial do leite de vaca foi de 693 milhões de toneladas em 2008, sendo 66% desse volume produzido na Europa e na América. O Brasil é o sexto produtor, com aproximadamente 26,1 bilhões de litros. A expansão da oferta no Brasil foi duas vezes superior à média mundial. Os seis estados de maior produção do país são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina e São Paulo que respondem por 73% da oferta brasileira (<http://www.embrapa.br>).

O Brasil possui grandes oportunidades de se tornar um grande exportador de lácteos, devido a sua própria competitividade. Isso porque existe disponibilidade de terra, água, tecnologia, custo de produção competitivo e finalmente, uma produtividade bem aquém da média mundial, o que ilustra grande potencial de melhoria (<http://www.embrapa.br>). O consumo per capita mundial de leite fluido em 2008 foi de 83,2 kg/pessoa/ano (www.leitebrasil.org.br).

No entanto, grande parte da população mundial não pode desfrutar dos benefícios proporcionados pelo leite devido a algum grau de rejeição nos produtos lácteos. Aproximadamente 75% da população mundial e de 20 a 25% da população brasileira sofrem de intolerância à lactose, que é uma inabilidade para digerir completamente esse dissacarídeo predominante no leite. A ausência dessa enzima na mucosa intestinal implica na não absorção e utilização deste açúcar. Não há tratamento para aumentar a capacidade de produzir lactase, mas os sintomas podem ser controlados por meio de dieta (LOPES et al., 2008). Para que possa ser assimilada pelo organismo é necessário que a lactose seja hidrolisada em galactose e glicose no intestino delgado, pela ação da enzima lactase, também chamada de β -galactosidase.

Algumas vantagens da hidrólise da lactose para a indústria podem ser citadas, como a melhoria das características organolépticas, aumento da cremosidade e facilidade de corte para misturas de sorvetes, prevenção da cristalização de produtos lácteos e produção de oligossacarídeos (GAUR et al., 2006). Dois métodos para a hidrólise da lactose têm sido utilizados, a hidrólise ácida (homogênea ou heterogênea) e a hidrólise enzimática (enzimas na forma livre, imobilizadas em suportes ou recuperadas). A hidrólise ácida é pouquíssima usada e requer condições de operação extremamente rigorosas, como elevadas temperaturas e pH ácido, formando diversos subprodutos que deverão ser purificados. A hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas, tanto de temperatura como pH e é muito utilizada em indústria de alimentos, produzindo um produto limpo (GEKAS e LÓPEZ, 1985).

As enzimas têm propriedades benéficas, tanto para a indústria alimentar como para o consumidor. A sua especificidade oferece aos produtores alimentares um controle mais estrito da sua qualidade, enquanto a sua eficiência requer um baixo gasto energético o qual favorece ao meio ambiente. As enzimas podem ser utilizadas como catalisadores em produtos alimentares e para tratar os desperdícios biológicos do processamento alimentar, sendo estas também biodegradáveis e naturalmente absorvidas (<http://www.eufic.org>).

As enzimas geralmente são utilizadas na sua forma livre, o que dificulta a sua reutilização e recuperação ao final do produto, tornando este método economicamente pouco viável. Apesar do alto custo da enzima, o sistema de imobilização continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente e oferecer a possibilidade de reutilização da mesma (SZCZODRAK, 2000). Técnicas de imobilização estão sendo testadas e desenvolvidas, pois não há um único método aplicável a todas as enzimas. Isto se deve as diferentes características, composição química, propriedades do substrato, do produto e finalidade de aplicação do produto obtido. Dessa forma é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, resultando em boa imobilização, retenção de atividade e alta estabilidade operacional (BASSETTI, 1995; CAO, 2005).

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica, utilizando glutaraldeído como agente reticulante.

Como objetivos específicos dessa dissertação podem ser citados:

- Determinar a concentração de β -galactosidase e pH no processo de imobilização;
- Avaliar a influência do glutaraldeído como agente reticulante na atividade enzimática;

- Analisar a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH;
- Estudar a influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada;
- Estudar a cinética de reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase imobilizada em termos de substrato e de produtos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Leite

O leite é o alimento mais completo que se pode dispor, devendo ser ingerido por crianças, jovens e adultos. É indispensável na alimentação diária, pois contém todas as substâncias benéficas à saúde. Pela sua composição não há alimento que se pode comparar. As características organolépticas do leite são:

Aspecto: líquido, homogêneo, limpo e, geralmente, é formada uma camada de gordura quando deixado em repouso.

Cor: branca, meio amarelada.

Odor: suave e levemente ácido.

Sabor: levemente adocicado (<http://www.criareplantar.com.br>). O leite, em condições normais, tem, em média, os seguintes componentes e suas respectivas quantidades (peso/peso), conforme Figura 2.1.

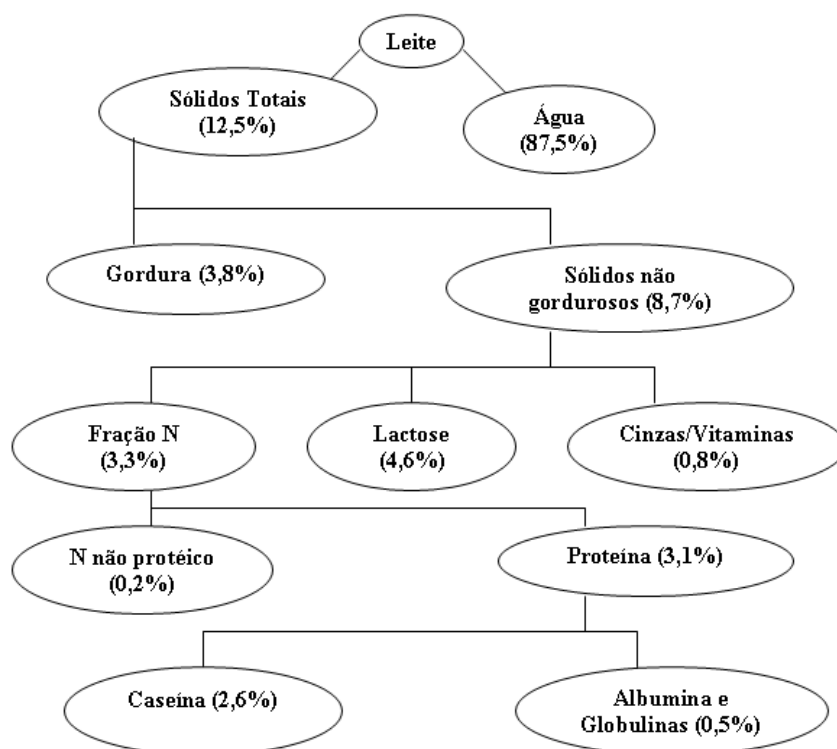


Figura 2.1 - Composição média do leite (BLOWEY, 1992).

As vitaminas encontradas no leite são: vitamina A, B2, B4, B6, B12, C, D, E, K e complexo B. Os principais componentes do leite são descritos a baixo (<http://www.criareplantar.com.br>).

Água: é o componente encontrado em maior quantidade no leite; os demais se encontram dissolvidos, suspensos ou emulsionados.

Gordura: é o componente que dá ao leite a cor amarelada. A gordura é um dos seus componentes mais ricos. Pode ser facilmente retirada do leite por processo natural, bastando que se remova a nata, encontrada na superfície, quando em repouso.

Proteínas: dão ao leite a cor esbranquiçada opaca. É de fácil identificação no leite, pois são elas as principais formadoras de massa branca quando o leite coagula, e é manipulado para produção de queijos. As proteínas do leite são formadas de caseína (maior parte), albumina e globulina.

Lactose: é o açúcar do leite, sendo praticamente o único que nele existe, sendo, portanto, o responsável pelo sabor adocicado. Encontrado no leite de quase todos os mamíferos. Industrialmente, a fermentação da lactose, por ação microbiana, ocupa lugar de maior destaque. Uma molécula de lactose transforma-se em quatro moléculas de ácido láctico. Em muitos casos, a fermentação da lactose com a acidificação do leite é um fenômeno devidamente controlado e dirigido, aproveitado na indústria de laticínios para obtenção de diversos produtos derivados do leite, como, por exemplo, iogurte, leite acidófilo, queijos, requeijões, ácido láctico, caseínas, etc.

Sais minerais: os principais sais minerais encontrados no leite são os fosfatos, citratos, carbonato de sódio, cálcio, potássio e magnésio. A ação fisiológica dos diferentes sais do leite é importante, principalmente a do fosfato de cálcio, na formação de ossos e dentes.

Vitaminas: o leite constitui uma larga fonte para fornecimento de vitaminas necessárias ao organismo.

2.2 – Lactose

Antes do século XVII, o leite foi considerado possuidor de apenas três componentes, sendo eles o coalho, gordura e soro. Bartoletus (1633) isolou um sal do soro sem nitrogênio. Etmueller (1688) isolou a lactose a partir da evaporação do soro do leite e purificou por recristalização (WHITTIER, 1944).

Durante o século 18, a lactose tornou-se uma mercadoria comercial. O fundamento do conhecimento atual da lactose (especialmente no que diz respeito à sua estrutura química e molecular) foi estabelecido durante o início do século 20 (GÄNZLE et al., 2008).

Todos os anos, cerca de $1,45 \cdot 10^8$ toneladas de soro de leite e $6 \cdot 10^6$ toneladas de lactose são produzidas mundialmente. Infelizmente, ao longo dos últimos 50 anos, metade da produção mundial não tem sido transformada em subproduto, sendo descartada diretamente no meio ambiente. O soro é o principal subproduto da indústria de laticínios, e, devido ao seu alto conteúdo em lactose, apresenta alta DBO, e, quando lançado diretamente aos corpos receptores, causa séria poluição das águas. A bioconversão da lactose do soro do leite poderia reduzir mais de 75% da poluição das águas e gerar produtos de interesse para animais, alimentação, nutrição humana, produtos farmacêuticos e agrícolas. A lactose é um açúcar higroscópico com forte tendência a absorver sabores e odores em virtude da baixa solubilidade (HATZINIKOLAOU et al., 2005; HAIDER e HUSAIN, 2007).

2.2.1 – Ocorrência

Lactose (Galactose β -1,4 glucose) tem ligação glicídica. É o açúcar presente no leite e seus derivados. Os açúcares são formados por unidades chamadas sacarídeos. A lactose é formada por duas dessas unidades, a glicose e a galactose, sendo, portanto, um dissacarídeo. A lactose está presente no leite de quase todos os mamíferos, com algumas exceções. A concentração de lactose aproximada no leite dos mamíferos situa-se entre 2,0% e 10% (WHITTIER, 1944; HOLSINGER et al., 1988). O teor de lactose do leite bovino varia de 4,4% a 5,2%, tendo uma média aproximada de 4,8%. Já no leite humano, a lactose é encontrada na proporção de 7% (GÄNZLE et al., 2008).

A lactose é um importante componente do leite e do soro de leite, utilizados nos produtos alimentares, e é bastante limitada devido a sua baixa solubilidade e indigestibilidade em muitos indivíduos. Por esta razão, a lactose é frequentemente hidrolisada antes da utilização. A indústria do queijo produz grandes quantidades de lactose, sob a forma de soro, tanto do queijo como do leite. No leite é encontrada na proporção (em termos de sólidos totais) de 40%, 52% no leite desnatado e 70% no soro de leite (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>). Muitas foram as formas encontradas de utilização do soro de lactose, como, por exemplo, em padarias, confeitarias, alimentos

para animais e várias fermentações industriais. Ainda assim, a utilização é ínfima, se comparada à quantidade de soro disponível no mercado. O resultado é um baixo valor de mercado para lactose.

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

2.2.2 – Propriedades

A lactose é um dissacarídeo redutor constituído por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica β -1 \rightarrow 4. Por apresentar ambas as moléculas em forma de anel piranosídico, esta deve ser denominada propriamente de 4-0- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosose (WALSTRA e JENNESS, 1984; HOLSINGER, 1988). A lactose, quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, que influi na sua solubilidade. A α -lactose é o açúcar comum do leite, o qual é obtido na forma de cristais mono-hidratados, que perdem a água de cristalização a 120°C e apresenta ponto de fusão de 201,6°C. A forma predominante em que se encontram os cristais é a forma de pirâmide, prismas e “tomahawks” (tipo de machado dos índios americanos). Os cristais são duros e pouco solúveis. Se o tamanho do cristal em produtos alimentares for superior a 10-16 nm, podem ser detectados sensorialmente. A β -lactose tem ponto de fusão entre 174-176°C e é mais solúvel em água e mais doce do que o anômero α . A lactose reage de acordo com as regras gerais da química de carboidratos. As reações podem incluir: (1) a ligação glicosídica entre os constituintes monossacarídeos, (2) o grupo redutor da glicose, (3) grupos hidroxil livres, e (4) ligações carbono-carbono (HUDSON, 1908; FREYER, 1972; CLAMP et al., 1961; DONER e HICKS, 1982; THELWALL, 1985). A α -Lactose mono-hidratada é produzida a partir de soro ou permeato que são o subproduto do queijo. Possui ampla utilização, tanto na indústria alimentar quanto na farmacêutica. A estrutura da α -lactose e da β -lactose são apresentadas respectivamente na Figura 2.2.

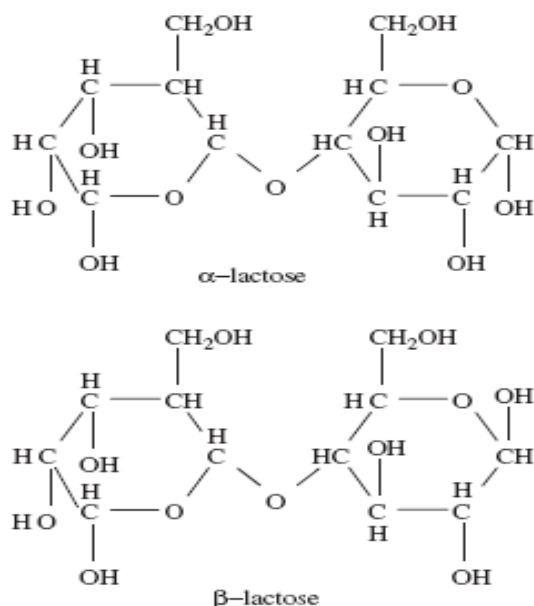


Figura 2.2 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose (GÄNZLE et al., 2008).

Cristalização da lactose é um interessante e complicado sistema, que não existe só como dois anomeros (α e β), mas também em quatro diferentes estruturas cristalinas (α -lactose mono-hidratada, β -lactose, α -estável e α -instável), dependendo das condições. Como β -lactose é termodinamicamente mais estável, há mais β -lactose presente nas soluções que α -lactose. No equilíbrio a 20°C, 62,7% da lactose é encontrada na forma β (NICKERSON, 1988). A α -lactose é menos solúvel que a forma de β , cristaliza em soluções aquosas com temperatura inferiores a 93,5°C. As partículas provenientes de uma única ou dupla cristalização geralmente têm tamanho médio na faixa de 100 - 300 μm , pirâmide e “tomahawk” em forma de cristais estão em menos de 5% do teor de lactose na forma β . Para diferentes alimentos e aplicações farmacêuticas tem sido investigadas abordagens para a produção de pirâmides ou tomahawk com um menor tamanho em forma de β , que se dissolve mais rapidamente em água e é mais doce que a forma α -lactose (LEVITON e LEIGHTON, 1938).

Conforme descreve NICKERSON et al., (1974), a β -lactose dissolve-se em água até que a solução se torne saturada. Devido à mutarrotação, a forma β transforma-se gradativamente na α , que é menos solúvel que a β . Assim, à medida que a β se dissolve, a α concentra-se até atingir saturação, quando tem início a formação dos cristais de α -lactose mono-hidratada, que são duros e pouco solúveis.

O processo de cristalização da lactose é condicionado a vários fatores, como a

velocidade de mutarrotação das formas α e β , o grau de saturação da solução, viscosidade, pH e a temperatura dos produtos lácteos. A taxa de cristalização da lactose aumenta com o aumento do pH (KISKA et al., 1973). A taxa de formação de cristais é controlada pela intensidade de agitação, número de núcleos, sólidos totais do produto, temperatura e viscosidade (WEBB et al., 1974). A cristalização da lactose pode ser resumida pela equação representada na Figura 2.3.

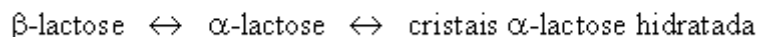


Figura 2.3 - Reação da cristalização da lactose (TWIEG e NICKERSON, 1968).

O resfriamento rápido de uma suspensão concentrada de lactose contribui para a formação de um grande número de núcleos ou centros de cristalização e, o aumento da viscosidade, que dele resulta, diminui a velocidade das moléculas de lactose para os centros de cristalização formados (KISKA et al., 1973). A Tabela 2.1 apresenta o poder edulcorante de alguns açúcares e sua solubilidade em função da temperatura.

Tabela 2.1 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos (ZADOW, 1984).

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

A solubilidade da lactose é baixa quando comparada com outros dissacarídeos, sendo aproximadamente 10% da sacarose, e a doçura da lactose em soluções é cerca de 20% da sacarose em temperatura ambiente. A Figura 2.4 mostra alguns subprodutos em que a lactose pode ser transformada:

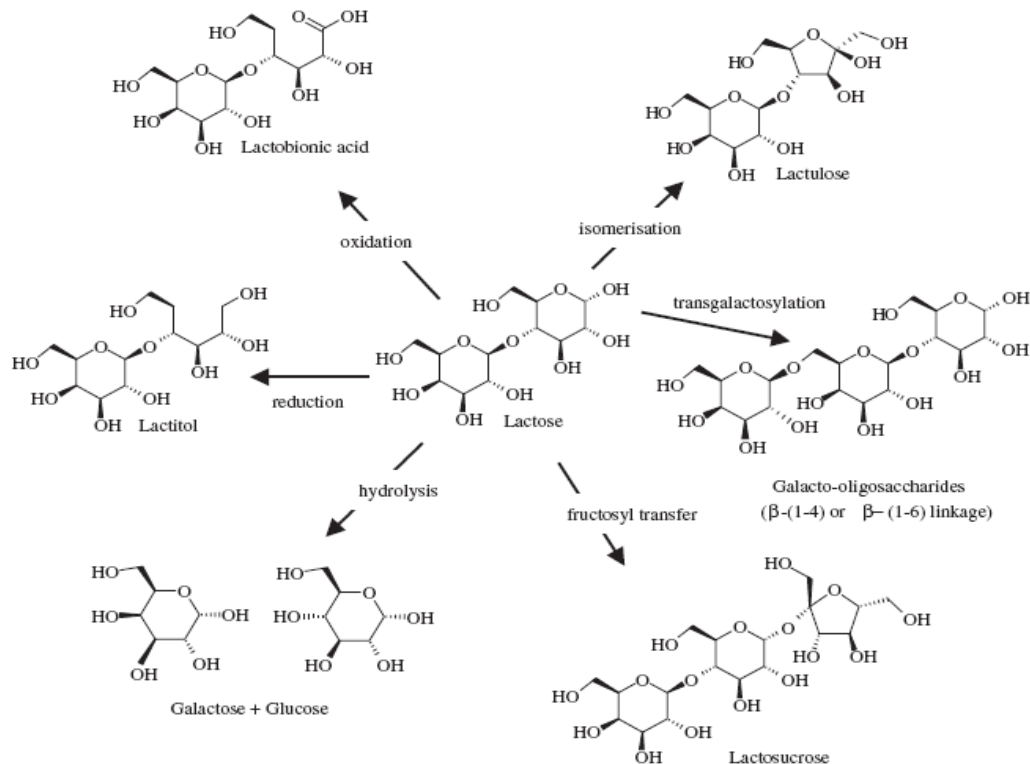


Figura 2.4 – Produtos derivados da lactose (GÄNZLE et al., 2008).

Uma das alternativas para ampliar a utilização desse carboidrato é hidrolisar enzimaticamente a lactose a seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose, com a finalidade de produzir um açúcar mais doce, mais facilmente fermentável e mais solúvel, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose e aumentando o período de estocagem, sendo importante também do ponto de vista nutricional, possibilitando a obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digestível para pessoas com problemas relacionados à intolerância a lactose (MAHONEY, 1997).

A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como deficiência de lactase do adulto, e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade, causando sintomas como diarreia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços. Para lactantes a intolerância à lactose pode apresentar dores abdominais e vômitos, podendo, inclusive, em sua forma mais grave, resultar em uma má formação do feto (WHITE et al., 1976; KOLDVOSKY, 1992).

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

- A deficiência congênita de lactase é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos, logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente.
- A intolerância secundária à lactose é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal ou após todas as cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso ocasiona uma deficiência temporária de lactase, podendo ainda levar à intolerância.
- Na intolerância ontogenética à lactose ou hipolactasia tipo adulto, as manifestações clínicas são menos intensas e mais tardias, e ocorre devido a uma tendência natural de diminuição da produção de lactase com o avançar da idade. Esse fato é mais evidente em algumas raças, como a negra (até 80% dos adultos tem deficiência), e menos comum em outras, como a cor branca (20% dos adultos) (SUENAGA, 2001; FARIAS e FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006; FREITAS et al., 2007).

Quanto ao tratamento, no caso de intolerância congênita à lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência ontogenética, como existe apenas uma diminuição de atividade enzimática, não há a necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados de acordo com a tolerância individual (FARIAS e FAGUNDES NETO, 2004).

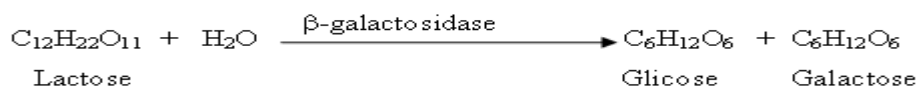
De acordo com O'CONNELL e WALSH (2006), nenhuma das preparações comerciais de lactase na forma de cápsulas, disponíveis no mercado, encontram os critérios adequados para suplementação da hidrólise de lactose no trato digestivo humano com lactase como medicamento, pois são instáveis no pH estomacal. Isto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

A tecnologia necessária para produção de leite com baixo teor de lactose já está disponível há algum tempo. O método preferencialmente utilizado hoje é a hidrólise enzimática pela adição de β -galactosidase microbiana. A lactose pode ser hidrolisada antes do tratamento térmico, ou após, se a enzima for adicionada antes do envase do produto. Ao ser adicionada ao leite, a enzima β -galactosidase efetua a quebra da molécula de lactose tal como a lactase intestinal, o que dá àqueles que possuem a deficiência desta enzima a possibilidade de usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, como a proteína, o cálcio e a vitamina A, sem os inconvenientes que a lactose possa causar. Curiosamente, o leite com lactose reduzida não tem sido preferido apenas por aqueles que possuem intolerância à lactose. A lactose é um açúcar de sabor pouco doce, o que não é o caso da glicose e galactose. A quebra da lactose em glicose e galactose pode atribuir ao leite um sabor mais adocicado, o que acaba atraindo outros consumidores (<http://fapesp.br> , TANRISEVEN e DOGAN, 2002).

2.3 – Hidrólise de lactose do leite

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

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



Essa hidrólise no processo de fermentação láctica é importante nos produtos lácticos fermentados. Para hidrólise de lactose em leite com destino ao uso “in natura”, para a produção de produtos lácteos e também para a hidrólise de lactose em soro de queijo, existem os processos catalisados por ácidos e resinas catiônicas e o processo enzimático. O método ácido e o método enzimático são mostrados na Figura 2.5. A reação é muito rápida quando ácidos são utilizados como catalisadores. A temperatura da reação no tratamento ácido é muito maior que no tratamento enzimático (150°C e 30 – 40°C, respectivamente), mas os produtos adquirem cor e odor que impedem sua utilização direta em alimentos. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro

sem um tratamento prévio, e os produtos obtidos preservam suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (LADERO et al., 2000).

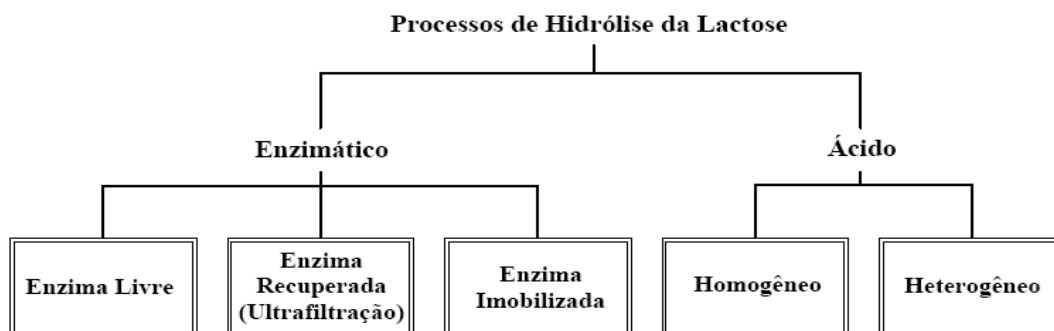


Figura 2.5 - Processos de hidrólise de lactose (HOBMAN, 1984).

O uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperatura e pH, e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas que podem estar presentes na solução de lactose: o surgimento de uma cor marrom na solução e o rendimento de subprodutos indesejáveis são normais nos métodos ácidos. Assim, para aplicações na indústria de alimentos, o método mais recomendável é o enzimático (SANTOS et al., 1998).

O método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase (CE 3.2.1.23), a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e α -D-glicose (GÉKAS e LOPEZ, 1985). Este processo é conhecido e utilizado na escala industrial. Esta enzima pode ser aplicada para evitar a intolerância à lactose nos seres humanos, assim como a cristalização de lactose na produção de sorvete e em produtos lácteos fermentados, como iogurtes. Dependendo do grau de hidrólise, o leite terá um ligeiro sabor adocicado, o que é ocasionado pela maior doçura da glicose-galactose em comparação com lactose (PEPPLER e REED, 1987). Além dessa vantagem, a hidrólise de lactose previne a cristalização em produtos lácteos, como por exemplo o doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes, além de melhorar as características organolépticas destes alimentos, como cor e sabor. A hidrólise deste açúcar também aumenta a facilidade de corte e dá cremosidade às misturas para sorvete, diminui o tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar, além de aumentar em cerca de 10% a produção dos queijos Cottage e Quark (KARDEL et al., 1995; MAHONEY, 1997) e produzir oligossacarídeos (GÉKAS e LOPEZ, 1985; PRENOSIL et al., 1987;

ALMEIDA e PASTORE, 2001; JURADO et al., 2002). As condições operacionais são consideravelmente mais brandas com pH de 3,5 a 8,0 e temperatura de 5 a 60°C, o que reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do processo sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GÉKAS e LOPEZ, 1985; HAIDER e HUSSAIN, 2007).

A hidrólise ocasiona modificações nas características físicas e químicas dos produtos lácteos, afetando principalmente as seguintes propriedades destes:

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

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

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

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

e) corpo, textura e paladar: estas propriedades são modificadas em decorrência da liberação da galactose, resultante da hidrólise. O sabor do produto fica mais acentuado;

f) escurecimento e caramelização: a temperaturas elevadas, e em meios com pH acima de 5, a glicose e a galactose são mais reativas que a lactose, cerca de 2,5 e 5 na produção de etanol com *Saccharomyces* e produção de doces (<http://www.cienciadoleite.com.br>; LOURESMA, 1978).

2.4 – Enzimas

Enzimas são moléculas quimicamente grandes, reativas com grupos iônicos, hidrofílicos e hidrofóbicos. São grupos de substâncias orgânicas de natureza geralmente protéica, com atividade intracelular ou extracelular que tem funções catalisadoras. A

capacidade catalítica das enzimas torna-se adequada para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou alimentar, e uma vantagem é que catalisam sob condições ambientais. As enzimas convertem uma substância chamada de substrato para outra chamada de produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. A velocidade de reação catalisada por uma enzima é aumentada devido à redução de energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. Uma enzima é uma proteína que catalisa ou acelera uma reação biológica. Pode, portanto, ser definida como um biocatalisador, cuja natureza protéica determina algumas propriedades, tais como: especificidade de substrato, dependência da temperatura e pH (CHIBATA, 1978; BOBBIO e BOBBIO, 1995; FABER, 2004).

Conforme a União Internacional de Bioquímica (IUB), as enzimas podem ser classificadas da seguinte forma:

- Oxidorredutases: São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução. São as desidrogenases e as oxidases;
- Transferases: Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais, como grupos amina, fosfato, carboxil, etc. Como exemplos existem as quinases e as transaminases;
- Hidrolases: Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Como exemplos existem as peptidases;
- Liasas: Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As descarboxilases são bons exemplos;
- Isomerases: Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. As epimerases são exemplos;
- Ligases: Catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes. São as sintetases.

As enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (DIXON e WEBB, 1979; BOBBIO e BOBBIO, 1995; FURLONG, 2000; GALVÃO, 2004).

Estabilidade: a capacidade catalítica de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por forças de interação. Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Assim, a

estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

Atividade: É dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas. A atividade enzimática pode ser medida com a enzima pura, e em condições tais que permitam que a velocidade da reação seja máxima, o que significa que o substrato deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda a enzima esteja transformada em um complexo ativado.

Especificidade: A especificidade enzimática consiste na capacidade da enzima ser seletiva a ligações, substratos ou grupos de substratos ela se baseia nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional.

Nos processos biológicos, as enzimas são preferíveis a catalisadores químicos, pois são mais seletivos, resulta em um produto mais limpo e tem um maior rendimento (MOFFAT et al., 1994). A utilização de enzimas como catalisadores para processos industriais de grande escala são limitados pelo seu alto custo de estabilização em relação ao armazenamento. Durante a utilização, a estabilidade diminui devido a alterações no pH, temperatura, atrito, pressão osmótica e um efeito cumulativo de todos esses fatores em função da duração da sua utilização (ALEKSANYAN e MARKOSYAN, 1986). Enzimas imobilizadas podem ser economicamente vantajosas, o que ocorre quando a imobilização promove um aumento significativo na estabilidade da enzima e pela possibilidade de sua reutilização (HERNAIZ e CROUT, 2000).

2.4.1 – Enzima β -galactosidase

A β -galactosidase (CE 3.2.1.23) é classificada como hidrolase e é responsável por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Galb1 – 4Glc) para formar glicose e galactose (GÉKAS e LOPEZ, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH e CLARK, 1997). A principal aplicação biotecnológica desta enzima encontra-se na produção de leite de baixa lactose (e derivados de produtos lácteos) para o consumo por pessoas intolerantes à lactose (KRETCHMER, 1972) e serve também para reciclar soro, que pode ser usado como um aditivo ao gado e para a alimentação animal (ZHOU et al., 2003; PHADTARE et al., 2004; HARDER e HUSAIN, 2007). Além disso, galacto-

oligossacarídeos também podem ser formados. Lactase pode ser encontrada em microorganismos, bem como em instalações e tecidos de animais e plantas. No entanto, a utilização da enzima é limitada pela inviabilidade dos custos em escala industrial (AXELSSON e ZACHI, 1990; GAUR et al., 2006).

Existem basicamente duas formas de usar β -galactosidases. A forma de enzima solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada e a forma imobilizada, que ocorre em operação contínua (BODALO et al., 2001). Apesar do alto custo da enzima, o sistema de imobilização de β -galactosidase continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente e por oferecerem a possibilidade de reutilização da enzima (SZCZODRAK, 2000). Vários tipos de suportes e técnicas têm sido utilizados para imobilização de β -galactosidase (GÉKAS e LOPEZ, 1985). Reatores como o leito fixo fluidizado, de fibras ocas, “plug flow”, leito capilar e membrana laminada, todos contendo β -galactosidase imobilizada, têm sido relatados na hidrólise de lactose (CARRARA e RUBIOLO, 1994; JURADO et al., 2005). A escolha da hidrólise da lactose de modo contínuo e descontínuo depende principalmente das características da enzima e da economia, englobando a produção, armazenamento e reutilização (HAIDER e HUSAIN, 2007).

A β -galactosidase é comercialmente disponível e utilizada em processos de larga escala. Um dos problemas associados ao uso de β -galactosidase é a sua completa hidrólise, o que é muito difícil de obter devido à inibição ao produto (galactose) e da produção de isômeros (LADERO et al., 2000; ROY e GUPTA, 2003).

Algumas propriedades peculiares das enzimas, tais como a sua não reutilização, alta sensibilidade, vários agentes desnaturantes e presença de efeitos sensoriais ou efeitos toxicológicos, podem dificultar a efetiva utilização de enzimas (NIJPELS et al., 1981; GÉKAS e LOPEZ, 1985). Muitas destas limitações indesejáveis podem ser superadas através da utilização de enzimas imobilizadas. Vários métodos são disponíveis para a imobilização de enzimas. A imobilização permite a reutilização das enzimas e pode fornecer um melhor ambiente para a atividade catalítica, além de reduzir o custo de transformação e manter a boa qualidade do produto (HUSAIN e IQBAL, 1985; ZHOU et al., 2003; KHAN et al., 2005).

2.4.1.1 – Principais fontes de β -galactosidase

As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, em órgãos de animais e também por grande quantidade de micro-organismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (GÉKAS e LOPEZ, 1985; ALMEIDA e PASTORE, 2001), sendo estas últimas e os fungos as fontes preferidas para produção da enzima para fins comerciais (NIJPELS et al., 1981; LADERO et al., 2001; JURADO et al., 2002). Na Tabela 2.2 estão relatadas fontes para obtenção de β -galactosidase.

A levedura *Kluyveromyces lactis* é a principal fonte comercial de β -galactosidase, porque seu habitat natural é o ambiente do leite, e tem marcante atividade na hidrólise de lactose (GÉKAS e LOPEZ, 1985).

As propriedades das β -galactosidases dependem de sua fonte. A lactase extraída da *Escherichia coli* possui a maior massa molecular (520 kDa a 850 kDa), enquanto que as de menores massas moleculares são as extraídas de *Saccharomyces fragilis* (201 kDa) e *Aspergillus oryzae* (90 kDa) (GÉKAS E LOPEZ, 1985).

Tabela 2.2 - Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase (SHUKLA, 1975).

PLANTAS	Pêssego, amêndoas e algumas espécies de rosas selvagens.
ORGANISMOS ANIMAIS	Intestino, cérebro e tecido da pele de mamíferos.
LEVEDURAS	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Cândida pseudotropicalis</i>
BACTÉRIAS	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Streptococcus lactis</i>
FUNGOS	<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus ninger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus phoenecis</i>

A temperatura e o pH ótimo diferem de acordo com a fonte e obtenção de cada enzima, conforme Tabela 2.3, e também de acordo com o método de preparação

comercial. A imobilização de enzimas, o método de imobilização e o tipo de suporte podem influenciar as condições ótimas de preparação (GÉKAS E LOPEZ, 1985).

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para a utilização na indústria de alimentos. Enzimas extraídas de *A. niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces sp (lactis* ou *fragilis)* são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos realizados. Existe ainda uma grande procura na indústria alimentícia por enzimas com propriedades superiores, com melhor estabilidade térmica a pH neutro, boa atividade a baixas temperaturas (GÉKAS E LOPEZ, 1985).

Tabela 2.3 - Propriedades das lactases (GÉKAS E LOPEZ, 1985).

Fonte	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Massa Molecular (Kda)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 - 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fargilis</i>	6,6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	35	135
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 - 65	-
<i>Bacillus sp</i>	6,8	65	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 - 45	-
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 - 57	530
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 – 7,5	55	500 – 600
<i>Mucor pucillus</i>	4,5 – 6,0	60	-
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 – 5,5	80	570

2.5 – Imobilização de enzimas

A enzima imobilizada é definida como "a enzima fisicamente confinada ou localizada em uma determinada região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser usada várias vezes e de forma contínua" (CHIBATA, 1978). Não existe um método universal de imobilização. Cada utilização exige avaliação de cada um dos passos de acordo com critérios propostos de imobilização, atividade, rendimento, estabilidade, simplicidade e viabilidade econômica. Cada método

tem suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática (SCOUTEN, 1987).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzima foi no início do século XX, quando NELSON e GRIFFIN (1916) adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose, embora o objetivo destes pesquisadores fosse a purificação da enzima.

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade (MATEO et al., 2007).

Com o estudo avançado, a enzima imobilizada tem sido aplicada em indústrias alimentícias e tem se tornado uma importante tecnologia na indústria leiteira, sendo largamente utilizada na hidrólise de lactose do leite, soro e produtos lácteos. β -galactosidase (CE 3.2.1.23) recebeu um especial interesse, pois ela pode ser usada para produzir uma mistura isomolecular de glicose e galactose (BAYRAMOGLU et al., 2004; MAMMARELLA e RUBIOLO, 2006; HAIDER e HUSAIN, 2007).

Diferentes métodos de imobilização foram desenvolvidos, como a oclusão em alginato e fibra, ligação sobre quitosana, espuma de poliuretano, gelatina, ossos em pó e adsorção em resinas de fenol / formaldeído. Alguns destes métodos sofrem baixo rendimento de imobilização ou desprendimento contínuo de enzima (CARPIO et al., 2000). A enzima pode ser usada na forma solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada, enquanto a forma imobilizada tem uma operação contínua (BODALO et al., 2001).

A desvantagem das enzimas imobilizadas é que elas são protegidas pelo suporte, o que limita as suas variações, mudanças e diminuição de suas propriedades características. Suportes também ofuscam a mudança de temperatura das enzimas, alternância de pH, condições de agitação e pode haver uma possível perda na atividade enzimática. Os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada também se tornam uma desvantagem ao uso de imobilização (SECUNDO et al., 2002; BAYRAMOGLU et al., 2003).

A imobilização enzimática tem um custo elevado quando comparado ao uso da enzima livre, mas a imobilização de enzimas dá a possibilidade de utilizar o biocatalisador imobilizado repetidamente, em reações bateladas ou reações contínuas, e em sistemas de reatores tubulares (UHLIG, 1991). Algumas das principais vantagens da

enzima imobilizada são citadas abaixo (ALEKSANYAN e MARKOSYAN, 1986; ALBAYRAK e YANG, 2002; GÓMEZ et al., 2005; SZYMANSKA et al., 2007).

- Permite processamento de grandes quantidades de substrato, uma vez que pode ser separado e recuperado o produto da mistura de substrato-produto;
- Transmite uma maior estabilidade para a enzima, de modo que possa ser utilizado em processos contínuos;
- Proporciona um maior controle do processo catalítico;
- Permite um grande aproveitamento econômico, pelo fato da possibilidade de sua reutilização;
- Flexibilidade do design do reator;
- Melhor controle operacional;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparado ao uso de enzimas livres;
- A enzima não contamina o produto.

2.5.1 – Métodos de imobilização de enzimas

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método único. Isto se deve às diferentes características e composição química das enzimas, às diferentes propriedades do substrato e do produto e à finalidade de aplicação do produto obtido. Assim, para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte em uma imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

A estabilidade da enzima pode ser melhorada dramaticamente se uma técnica adequada de imobilização for empregada. No caso das β -galactosidases, existem vários procedimentos para imobilização: fixação ou união a suportes porosos por adsorção, interação iônica, formação de complexos com metais (quelação) e formação de ligações covalentes (LADERO et al., 2000).

As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se aos seguintes fatores: efeitos conformacionais - modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura

terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos - uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível; efeitos difusionais ou de transferência de massa - têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima e do produto da reação; efeitos microambientais - resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima. Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e V_{max} (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes em relação à temperatura (MARKOGLOU e WAINER, 2003).

Para diminuir os efeitos do deslocamento de pH na atividade das enzimas imobilizadas, algumas análises devem ser realizadas: tipo e a força iônica do tampão de imobilização utilizado, possibilidade da alteração do tamanho da partícula do suporte e co-imobilização de enzimas que capturem os prótons gerados durante a reação de imobilização (TISCHER e KASCHE, 1999).

Existem várias formas de classificar os métodos de imobilização de enzimas, de acordo com a natureza da interação responsável pela imobilização. Podem ser classificadas em duas categorias: imobilização por ligação ou por retenção física, conforme pode ser verificado na Figura 2.6.

A imobilização por ligação envolve alteração na estrutura da enzima, através da ligação desta com o suporte insolúvel (ligação ao suporte) ou entre as moléculas da própria enzima (ligações cruzadas) (CAO, 2005).



Figura 2.6 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: Albumina. (BLANCH e KLARK, 1997; BULCHHOLZ et al., 2005).

2.5.1.1 – Ligação a suportes insolúveis

O método de ligação ao suporte pode ser dividido em quatro diferentes formas, sendo adsorção física, ligação iônica, ligação metálica e ligação covalente.

a) *Adsorção física*

O método de adsorção física para a imobilização de enzimas é baseado em adsorção física da proteína da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização (CHIBATA, 1978; BICKERSTAFF, 1997).

Os principais aspectos que devem ser analisados em um sistema de enzima imobilizada são o suporte (transportador), a enzima e o modo de interação da enzima com o suporte. O suporte pode ser uma membrana, um sólido insolúvel em água, ou uma matriz polimérica, classificados de acordo com sua morfologia (porosos, não porosos, ou tipo gel) e sua composição química (SCOUTEN, 1987).

Algumas vantagens podem ser destacadas neste método: é simples e de baixo custo, dispensabilidade de reagentes químicos e baixa probabilidade de desnaturação das enzimas (GÉKAS e LOPEZ, 1985).

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e seguindo um tempo de contato, separando o suporte imobilizado da solução em que ele se encontra, por centrifugação ou filtração. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica, concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima. A maior desvantagem desse método é a ligação fraca entre enzima-suporte e a preocupação com as condições de temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente estar ou não em condições ótimas para não haver dessorção (KENNEDY e CABRAL, 1987). Uma etapa posterior com ligação cruzada contribui para a estabilidade do biocatalisador imobilizado no suporte. Reagente bi ou multifuncional, como glutaraldeído e

disocianato de tolueno podem ser utilizados como agentes de ligação cruzada (BULCHHOLZ, 1979; WOODWARD, 1984; CAO, 2005).

b) *Ligação iônica*

Este método é baseado principalmente em ligação iônica da enzima com o suporte sólido, contendo troca de íons. Na prática, tanto a iônica como a ligação de Van der Waals ocorrem juntas. A principal diferença entre absorção física e ligação iônica é a força de ligação da enzima e o suporte. O resultado das forças de ligação são mais fortes daquelas da adsorção física. Apesar de serem mais fortes, o processo de imobilização são os mesmos, as condições são brandas em comparação com os métodos que envolvem as ligações covalentes, e as mudanças de conformação produzidas são pequenas (KENNEDY e CABRAL, 1987; ALMEIDA et al., 2005).

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

Os suportes utilizados em menor escala são os suportes inorgânicos, principalmente sílica e resinas de troca iônica. De acordo com o tipo de trocadores eles são classificados como aniônicos ou catiônicos. O trocador aniônico mais comum contém grupos funcionais derivados de aminas, e o trocador catiônico contém como grupos funcionais sulfato, fosfato e seus derivados (KENNEDY e CABRAL, 1987). Na Tabela 2.4 são apresentadas alguns exemplos de resinas trocadoras de íons adequadas para ligação iônica.

Tabela 2.4 – Alguns trocadores iônicos (COLLINS et al., 1993).

Capacidade de alguns trocadores iônicos			
Trocador	Tipo	Capacidade total	
		meq/g ^a	meq/100mL ^b
Dowex 50 X-8	Ácido forte	5,1	170
Amberlite IR-120	Ácido forte	---	190
SP-Sephadex C-25	Ácido forte	2,3 ± 0,3	30
Amberlite IRC-84	Ácido fraco	---	400
CM-Sephadex C-25	Ácido fraco	4,5 ± 0,5	56
CM-Sephadex CL-6B	Ácido fraco	---	12
CM-Cellex	Ácido fraco	0,7 ± 0,1	---
Dowex 1	Base forte	3,2	140
Amberlite IRA 400	Base forte	---	140
QAE-Sephadex A-25	Base forte	3,0 ± 0,4	50
Dowex 3X-4	Base forte	2,8	190
Amberlite IRA 45	Base forte	---	190
DEAE-Sephadex A-25	Base forte	3,5 ± 0,5	50
DEAE-Sephadex CL-6B	Base fraca	---	15
DEAE-Sephacel	Base fraca	1,4 ± 0,1	17,1
Cellex D	Base fraca	0,7 ± 0,1	---

a: Valor obtido por titulação e referente à quantidade total de miliequivalentes em relação ao peso do trocador usado na determinação.

b: Valor obtido tomado por base 100 mL da suspensão do trocador.

c) *Ligação metálica*

Imobilização de enzimas por ligação metálica tem sido preparada usando compostos de metais de transição, principalmente sais metálicos, como de titânio e zircônio, para ativação da superfície de suportes orgânicos e inorgânicos ou usando o seu correspondente oxido metálico hidratado. Este método é baseado nas propriedades quelatantes de metais de transição, o qual pode ser empregado para ligar enzimas. Contudo, a estabilidade conseguida com tais catalisadores tem sido baixa devido à perda de enzimas para a solução (FLYNN e JOHNSON, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987).

d) *Ligação covalente*

Ligação covalente entre suporte e enzimas é baseada na ligação entre moléculas de enzimas e suporte. A seleção das condições para imobilização de ligação covalente é mais dificultosa do que em outros métodos de ligação enzima-suporte. Para alcançar eficiente ligação à funcionalidade do suporte e da enzima deve-se fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Alguns dos reagentes usados para ativação dos suportes contêm o grupo hidroxil ou amino (KENNEDY e CABRAL, 1987; CAO, 2005).

Enzimas covalentemente imobilizadas podem ser consideradas como quimicamente e fisicamente modificadas pelo suporte utilizado. Neste caso não é surpresa a modificação na conformação da enzima, tal como atividade, seletividade e estabilidade, podendo ser radicalmente melhorada na comparação não somente com outros métodos de imobilização de enzimas, mas também com a enzima nativa (CAO, 2005).

O glutaraldeído é um reagente geralmente usado na imobilização de enzimas nos processos industriais, efetuando uma ligação covalente entre um radical ativo do suporte com a molécula da enzima (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, e assim pode influir na alta resistência a temperaturas, a desnaturantes e a solventes orgânicos em geral. A extensão disso depende das condições do sistema, da natureza da enzima e do tipo de suporte (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1978; ARICA, 2000 *apud* BAYRAMOGLU et al., 2006).

Infelizmente, menos atenção tem sido dada para este método, embora descobertas de que a enzima pode ser dissolvida em alguns solventes orgânicos com alta retenção da atividade poderia estimular novo interesse em explorar esse potencial da atividade e seletividade (CAO, 2005).

e) *Ligação cruzada*

A ligação cruzada é um método livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou à proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e

são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se uma enzima quase pura (SHELDON, 2007). Entre os agentes de ligação cruzada mais usados está o glutaraldeído (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Como desvantagem do método está a necessidade de grande quantidade de enzima, resultando em baixas retenções da atividade e em baixa estabilidade mecânica, o que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade. Como alternativas ao método convencional, foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando-se de enzimas cristalinas (CLEC - cross-linked enzymes crystals) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entrecruzamento (CLEAs - cross-linked enzyme aggregates) das enzimas do agregado (SHELDON, 2007). O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade (JOSIC et al., 2001; HAGE et al., 2002; SHELDON, 2007).

2.5.1.2 – Imobilização por retenção física

a) Imobilização de enzima por oclusão

Este método baseia-se em retenção das enzimas nos espaços intersticiais, podendo ser feito em géis, fibras e por microencapsulação, permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Neste método, nenhuma reação ocorre, sendo um processo de retenção física da enzima. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural, e é protegido por substâncias de alto peso molecular. É um processo muito simples e as enzimas não sofrem modificações químicas (CHIBATA, 1978; FABER, 1997).

- Oclusão em géis: a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A enzima é misturada aos componentes que formarão o gel e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima, e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto (CHAPLIN e BUCKE, 1990; GIRELLI et al., 2005);
- Oclusão em fibras: é um método de imobilização de enzima por oclusão nas microcavidades de fibras sintéticas. Nesta técnica o monômero é

dissolvido em um solvente orgânico e emulsionado numa solução aquosa de enzima. A emulsão é forçada através de um processo de extrusão com um líquido coagulante (tolueno ou éter de petróleo), precipitando o polímero numa forma filamentosa, com as micro gotas de solução de enzima retidas. As vantagens desse método é que as fibras são resistentes a ácidos fracos, a alta força iônica e a alguns solventes orgânicos, além de ser é muito estável (GÉKAS e LOPEZ, 1985; KENNEDY e CABRAL, 1987);

- Membranas: O método de imobilização por meio de contenção em membranas envolve a utilização de membranas pré-formadas (reatores do tipo hollow fiber) ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas (KAREL et al., 1985). Este método consiste em colocar a solução de enzima e o substrato de um mesmo lado da membrana, permitindo o contato íntimo entre a enzima e o substrato. Esse processo pode ser utilizado na conversão de substratos de alto peso molecular (KENNEDY e CABRAL, 1987). Devido à ausência de núcleo gelificado, as limitações à transferência de massa também são reduzidas (PARK e CHANG, 2000);
- Encapsulação: pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito. A vantagem deste método é a grande área superficial de contato do substrato e enzima dentro de um volume relativamente pequeno e da possibilidade real de imobilização simultânea de várias enzimas em uma única etapa (KENNEDY e CABRAL, 1987).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (MALCATA et al., 1990).

2.5.2 – Comparação entre os métodos de imobilização

Embora muitas técnicas de imobilização tenham sido aplicadas para muitas enzimas, é reconhecido que não há uma procedimento particular que possa ser

considerado um método ideal e universal de imobilização de enzimas. Isto se deve ao fato de diferentes composições e características químicas das enzimas e a seus substratos e propriedades dos produtos. Para encontrar o melhor método de imobilização para uma necessidade específica é necessário que resulte numa boa atividade e em alta estabilidade operacional (KENNEDY e CABRAL, 1987; VICENTE, 2000). A Tabela 2.5 apresenta algumas vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 2.5 – Alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos (KENNEDY e CABRAL, 1987).

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

2.5.3 – Suportes para imobilização

O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. Os suportes mais utilizados para a imobilização das enzimas incluem vidro poroso, resinas de troca iônica, policrilamida e colágeno (BAKKEN et al., 1990).

Para o uso industrial são mais adequados os suportes inorgânicos, devido às suas propriedades físicas. Além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como, por exemplo, elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de micro-organismos e fácil

regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Os suportes, quanto à sua classificação morfológica, podem ser porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como vantagem a grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa, elevado teor em biocatalisadores e proteção ao ambiente externo. Algumas das desvantagens desse tipo de suporte são: elevadas limitações difusionais, custo alto, alta pressão osmótica. Os não-porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Para aumentar a carga de enzima imobilizada, utilizam-se partículas finas ou fibras, porém, estas são dificilmente removidas da mistura reacional, limitando o uso em reações contínuas, desde que levadas a uma alta pressão em reatores de leito fixo. Além disso, influem no grau de escoamento se utilizadas em reatores de leito fluidizado (PEREIRA, 1996). A Tabela 2.6 ilustra os diferentes tipos de suporte e sua classificação.

Tabela 2.6 – Classificação dos suportes conforme a composição (GALVÃO, 2004).

Suportes				
Orgânicos			Inorgânicos	
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro(PC)
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Betonita	Cerâmica (PC)
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)
Agar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de Ferro
Amido		Vinil		Óxido de Níquel
		Policrilamidas		

Vários tipos de suportes e técnicas têm sido utilizados para a β -galactosidase imobilizada. Apesar do alto custo da imobilização, continua sendo mais viável

economicamente do que os sistemas de enzima livre, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente e oferecer a possibilidade de reutilização da enzima e um melhor ambiente para a atividade catalítica da enzima (SZCZODRAK, 2000; LADERO et al., 2005).

YANG e OKOS (1989) estudaram a hidrólise de lactose utilizando β -galactosidase (obtida de *A. niger*) imobilizada em uma resina de fenol-formaldeído. Os ensaios foram realizados em temperaturas variando de 8 a 60°C, e concentração inicial da lactose variando de e 2,5 a 20%. Os resultados indicaram que a temperatura ótima de operação para este método depende do tempo de operação, mas independe da concentração inicial ou da conversão da lactose.

A quitosana é um suporte cada vez mais utilizado em muitas aplicações, incluindo sistemas de administração de medicamentos. A desvantagem da quitosana é limitada à sua solubilidade em água e ao baixo pH da solução de quitosana, sendo assim tende a desnaturar a enzima (TAQIEDDIN et al., 2002).

Pesquisadores têm utilizado alginato como um meio para a oclusão de β -galactosidase, mas este procedimento de imobilização de enzimas tem algumas limitações, tais como o problema do substrato e do produto na difusão dentro e fora das esferas de alginato (HAIDER e HUSAIN, 2007).

2.5.4 – Imobilização em resinas

A utilização de suportes magnéticos permite um rápido isolamento e separação ao final da reação, reduzindo o custo operacional na separação da enzima imobilizada com o meio. Suportes magnéticos são muito usados na a produção de adsorventes com bioafinidades, hidratos de carbono, hidrólise, degradação biológica de resíduos, fermentação alcoólica e catálise de reações entre substâncias orgânicas por enzimas imobilizadas em reatores de gás – líquido.

As resinas catiônicas trocam seu cátion disponível com o cátion do meio até atingir o equilíbrio. As resinas aniônicas são semelhantes, trocam ânions; seu caráter básico deve-se à presença de grupos amônio quartenário, sendo aquelas que têm amônio quartenário uma resina fortemente básica (COLLINS et al., 1993).

A troca de íons em uma resina fortemente ácida ocorre independente do pH, já se for uma resina fracamente ácida a troca se dá somente em soluções alcalinas, na sua forma salina, sendo fracas na forma carboxílica. As resinas fortemente básicas são

muito ionizadas, tanto na forma de hidróxido como na de seu sal, e também possuem sua ação independente do pH (COLLINS et al., 1993).

A utilização de resinas para imobilizar enzimas tem sido utilizada em diferentes indústrias, tais como: Indústria alimentícia, farmacêutica, processos químicos e tratamento de resíduos (LETCA et al., 2004). Algumas resinas fracamente básicas e alguns de seus parâmetros são resumidos na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Parâmetros básicos de íons-trocadores (LETCA et al. 2004).

Nome da resina	Estrutura da partícula (μm)	Tamanho	Matriz	Grupo Funcional
Amberlite IRA 67	estrutura de gel	500 – 750	acrílico – divinilbenzeno	N – (R) ₂
Amberlite IRA 94 S	macroporoso	350 – 470	estireno – divinilbenzeno	N – (R) ₂
Duolite A 561	macroporoso	470 – 740	fenol - formaldeído	N – (R) ₂
Duolite A 568	macroporoso	150 - 600	fenol – formaldeído	N – (R) ₂

OOSTEROM et al., (1998) imobilizaram as enzimas β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e de *Kluyveromyces fragilis* em uma resina de troca iônica, fenol-formaldeído, tipo Duolite S-761 e Duolite A-7, respectivamente.

ÖZDURAL et al., (2003) imobilizaram a enzima β -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A-568, em um reator de leito empacotado para a obtenção de glicose e galactose.

LETCA et al., (2004) testaram algumas resinas de troca iônica em inulase II a partir de uma cepa *Esherichia coli* geneticamente modificada e obteve a melhor atividade para a resina Duolite A-568.

MARQUEZ et al., (2007) estudaram a imobilização de invertase em resina de troca iônica Duolite A-568 para a hidrólise de sacarose.

FREITAS et al., (2007) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído para a hidrólise de lactose.

ÖZDURAL et al., (2008) imobilizaram β -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A-568, em um reator tipo coluna de vidro e o substrato recirculando na mesma, então foram retiradas amostras medindo-se a

quantidade de glicose formada para estudo da cinética. Concluiu-se que a equação que melhor se ajustou foi a de Michaelis- Menten.

2.5.5 – Efeitos dos métodos de imobilização na cinética e propriedades das enzimas

As propriedades químicas e físicas das enzimas podem sofrer modificações após a imobilização. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade, além da produtividade da enzima. As mudanças nas propriedades das enzimas podem ser causadas por diversos fatores (KENNEDY e CABRAL, 1987; SHELDON, 2007).

a) *Efeitos conformacionais*: quando mudança conformacional na molécula da enzima ocorre devido à alteração de aminoácidos no centro ativo da enzima e mudança na proteína da enzima.

a) *Efeitos estereoquímicos*: uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível.

b) *Efeitos de particionamento*: este efeito é relatado para a natureza química do material do suporte, podendo surgir interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixo peso molecular presente na solução, levando a uma modificação de microambiente.

b) *Efeitos difusionais ou transferência de massa*: surge a partir da resistência de difusão de solução de substrato para os sítios catalíticos e difusão de produtos.

A mudança observada das propriedades das enzimas na imobilização é o resultado das interações destes fatores. Todos esses fatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e V_{max} , deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes de acordo com temperatura (KENNEDY e CABRAL, 1987; MARKOGLOU, 2003)

2.5.6 – Reatores para enzimas imobilizadas

As decisões tomadas na concepção do biorreator escolhido podem ter um impacto significativo no desempenho do processo global. O conhecimento da cinética das reações é essencial para entender como um reator biológico trabalha. Outras áreas

da engenharia de bioprocessos, tal como massa e balanço de energia, transferência de massa e transferência de calor, são também requeridos.

O biorreator é considerado o coração de alguns processos bioquímicos como de enzimas, microbiano, células de mamíferos e sistemas de células de plantas (NAJAFPOUR, 2007).

Os reatores enzimáticos podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber, descontínuos (incluindo a variante descontínuo-alimentado) e contínuos. Os contínuos, por sua vez, podem ser do tipo leito, agitado ou fixo.

Os fatores a serem considerados para escolher o tipo de reator são:

- a) modo de operação: descontínuo (mais barato e de multiuso) e contínuo (mais caro e desenhado para um processo específico);
- b) custo do catalisador frente ao custo total do processo;
- c) estabilidade da enzima ao longo do processo;
- d) requisitos operacionais, a saber, possibilitar pleno controle do pH e da temperatura, permitir operar em concentrações não inibitórias de substrato, ser adequado frente às características da matéria-prima e permitir a substituição do catalisador desgastado pelo uso sem interrupção do processo (LIMA et al., 2001). Na Tabela 2.8 mostra a classificação de reatores levando em conta o modo de operação e as características hidrodinâmicas.

Tabela 2.8 - Classificação de reatores enzimáticos (ZANIN, 1989).

Modo de operação	Características hidrodinâmicas	Tipo de reator
Descontínuo	Mistura perfeita	Reator batelada de tanque agitado (BSTR)
	Tipo tubular	Reator batelada com recirculação (BRR)
Contínuo	Mistura Perfeita	Reator contínuo de tanque agitado (CSTR) Reator contínuo com agitação e membranas de ultrafiltração (CSTR-UF)
	Tubular	Reator de leito fixo (PBR), leito fluidizado (PFR) e de membranas

2.5.6.1 – Reatores descontínuos

O reator batelada (Batch Reactor) não realiza alimentação e nem saída do material antes do término do processo. O substrato e a enzima são introduzidos simultaneamente no início da reação, e assim causam a conversão, com substrato decrescendo e produto aumentando com o tempo. Este reator é usado quando se está utilizando enzimas na forma livre e solúvel. Após o surgimento de enzimas imobilizadas, este tipo de reator foi usado em processos que se deseja a fácil separação ao final do processo da enzima imobilizada e do meio (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987).

Para este tipo de reator batelada, a principal vantagem é a melhor eficiência da transferência de calor e de massa devido à boa agitação do sistema (ZANIN, 1989), controle de contaminação e adequação flexível a variações das características da matéria prima (COLLINS, 1993).

O reator batelada de tanque agitado (Batch Stirred Tank Reactor- BSTR) é um tipo de reator muito simples, é composto de um reator e uma agitador. Este reator é usado para reatores de solução de alta viscosidade e para enzimas imobilizadas com baixa atividade.

Um reator de tanque agitado contínuo é mais eficiente no que se refere à possibilidade de um reator batelada agitado, mas o equipamento contínuo é mais complicado de ser usado (CHIBATA, 1978).

2.5.6.2 – Reatores contínuos

O reator CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) consiste em um tanque bem agitado contendo a enzima imobilizada. O fluxo de substrato é continuamente bombeado para o reator, ao mesmo tempo em que o fluxo do produto é removido.

A vantagem do CSTR é a sua facilidade de construção, versátil e barato, a qual permite a catalise simples, carregamento e fácil substituição. Permite controle simples sobre a temperatura, pH da reação e do fornecimento ou remoção de gases. CSTRs tendem a ser bastante grandes quanto a necessidade de ser eficientemente misturados. Seus volumes são geralmente cerca de cinco a dez vezes do volume de enzima imobilizada. Pode haver um pequeno arraste de enzima na saída do reator, por este fato deve-se colocar um coletor para poder recuperá-la. Neste tipo de reator não existem

gradientes de temperatura ou de concentração, devido à eficiente agitação que promove contato íntimo entre a enzima e o meio de reação (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987; NAJAFPOUR, 2007).

O reator PBR (Continuous Packed Bed Reactor) é o mais amplamente utilizado para enzimas imobilizadas e células microbianas. Neste caso é necessário considerar a queda de pressão em todo o leito e o efeito das dimensões da coluna na taxa da reação. No que se refere ao fluxo do substrato, há três possibilidades: método de fluxo ascendente, fluxo descendente e reciclo (CHIBATA, 1978).

O método contínuo tem as seguintes vantagens:

- Fácil controle automático e operacional;
- Redução dos custos de trabalho;
- Estabilização das condições de operação;
- Fácil controle na qualidade dos produtos.

O reator FBR (Fluidized Bed Reactor) é usado quando a solução de substrato tem alta viscosidade e quando há substrato ou produtos gasosos. Neste sistema deve-se tomar alguns cuidados para não haver destruição e decomposição de enzima imobilizada (CHIBATA, 1978).

O reator de membrana é um sistema contínuo, sendo utilizado para substrato de alto peso molecular e um produto de baixo peso molecular. A enzima usada neste caso é solúvel, e um não melhoramento da estabilidade da enzima é esperado.

2.5.6.3 – Influência de alguns fatores na escolha do reator

Os fatores que devem ser considerados quanto à escolha de um determinado tipo de reator para enzimas imobilizadas são:

- Requerimento de transferência de massa;
- Método de imobilização empregado;
- Natureza do substrato;
- Característica do suporte de imobilização utilizado;
- Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração;
- Facilidade de construção do reator e custo do mesmo.

A escolha inadequada do reator pode provocar rompimento do suporte de imobilização. Desta forma é importante escolher um reator que permita uma adequada

mistura do meio sem provocar danos ao suporte de imobilização (PILKINGTON et al., 1998; CAO, 2005).

2.6 – Cinética enzimática

As características das propriedades e funções das enzimas são a catálise das reações químicas. Algum dos estudos fundamentais desta função catalítica deve ser baseado em medidas qualitativas da taxa da reação catalisada. A partir do efeito da variação das condições na taxa, interferências podem ser feitas sobre o mecanismo da ação enzimática. Idealmente, esses estudos cinéticos devem ser colocados em relação com a química estrutural e estudos sobre a enzima, a fim de se obter uma imagem definitiva do processo, mas isso só é possível se a enzima for obtida em um elevado grau de pureza. O estudo da cinética enzimática é importante por razões práticas: a definição das unidades satisfatória, por exemplo, requer alguns conhecimentos das melhores condições para a ação da enzima e os efeitos de diversos fatores sobre ela. A cinética enzimática é definida como a velocidade da reação enzimática, e os fatores principais os quais determinam a velocidade de uma reação é a concentração de enzima, concentração de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura (DIXON e WEBB, 1979; SEGEL, 1993).

A taxa de reação catalisada por enzima depende diretamente da concentração desta. Uma técnica experimental muito utilizada em cinética enzimática é a determinação das taxas iniciais de reação. A taxa de formação do produto ou de consumo de substrato deve ser constante em toda a faixa de tempo de estudo para se medir a verdadeira taxa inicial. Assim, é preciso estabelecer o limite de linearidade para utilizar o procedimento de taxas iniciais, antes que P versus t e v versus E_t se tornem não lineares (SEGEL, 1993).

Para todos os procedimentos enzimáticos, mantendo-se constantes as demais condições, a velocidade da reação depende das concentrações da enzima e de seu substrato. Uma equação geral para a velocidade, conhecida como equação de Michaelis-Menten, descreve a reação em que ocorre interconversão do complexo enzima-substrato seguindo da formação irreversível de produto (SMITH et al., 1985), o qual é apresentado na Equação 2.1.

$$v = \frac{V_m * S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

Em que: V_m = velocidade limitante de uma reação catalisada por enzima nas condições de saturação, sendo denominada velocidade ou taxa máxima da reação;

K_m = constante do modelo de Michaelis- Menten.

A possibilidade de medir diferenças na atividade enzimática quando há substratos em concentrações iniciais muito reduzidas é importante para a determinação de parâmetros como K_m (constante de Michaelis- Menten) e K_i (constante de inibidor).

Para tanto, é necessário encontrar reações em faixa de concentração onde $[S] \sim K_m$ ou $[I] \sim K_i$. Assim, se a afinidade de uma enzima pelo seu substrato ou por um inibidor for muito grande, o K_m ou o K_i serão muito pequenos. É por isso que tais reações devem ser estudadas em baixas concentrações para ser possível avaliar os referidos parâmetros de forma conveniente. A medida das reações enzimáticas é feita com base na determinação da concentração do substrato ou do produto ou produtos da atividade catalítica. A variável experimental, no caso, é sempre tomada com base nas propriedades físicas ou químicas do substrato ou do produto ou produtos da reação.

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

A hidrólise de lactose em glicose e galactose tem sido descrita por diversos autores utilizando enzimas obtidas de bactéria, levedura e fungos. Em geral, a modelagem utiliza alguma forma da equação de Michaelis-Menten, que fornece a relação entre a velocidade de hidrólise do substrato e a concentração do substrato limitante (SORENSEN e NOVAK, 1996; GHALY e BEM-HASSAN, 1995).

2.6.1 – Presença de inibidores no meio reacional

A velocidade das reações catalisadas por enzimas é diminuída por inibidores específicos, isto é, compostos que se combinam com a enzima e impedem a combinação que ocorre normalmente entre enzima e substrato. A inibição enzimática pode ser classificada em dois tipos: inibição reversível e inibição irreversível. A inibição reversível, que compreende três formas, pode receber tratamento quantitativo pelo uso das relações estudadas ao longo da teoria de Michaelis-Menten sobre a formação do complexo enzima-substrato; é usual quantificar o fenômeno da inibição reversível pelos mesmos métodos gráficos empregados para a determinação da constante de Michaelis-Menten. Os três tipos de inibição reversível das enzimas são: inibição competitiva, inibição não-competitiva e a inibição acompetitiva (VILLELA, 1978; DIXON e WEBB 1979; SMITH et al., 1985).

Inibição competitiva: Os inibidores competitivos podem combinar-se reversivelmente com o sítio ativo da enzima e competir com o substrato por este sítio. Assim, enquanto este sítio ativo estiver ocupado, não poderá efetuar a ligação do substrato. A combinação de um inibidor competitivo I com a enzima E pode ser escrita da mesma maneira que a combinação com o substrato, embora o inibidor não seja quimicamente transformado em produto. A Figura 2.7 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição competitiva.

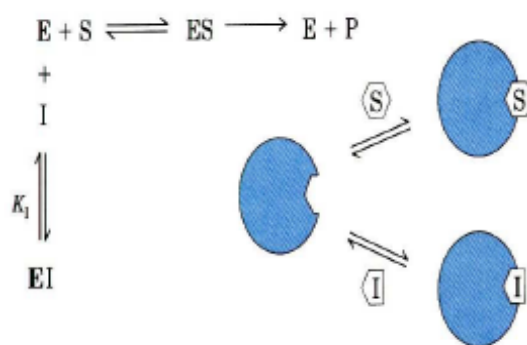


Figura 2.7 – Esquema do mecanismo da inibição competitiva (MARQUES, 2008).

Inibição não-competitiva: é o tipo de inibição em que o intercepto ($1/V_{\text{máx}}$) e a inclinação de $1/v$ contra $1/[S]$ são aumentados pelo mesmo fator. Nesse caso, o efeito inibidor não competitivo não é reduzido quando a concentração do substrato é aumentada, de modo que a velocidade inicial máxima é modificada, mas não a

constante de Michaelis-Menten. . A Figura 2.8 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição não-competitiva.

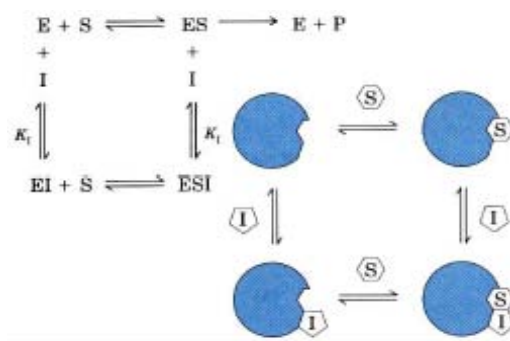


Figura 2.8 – Esquema do mecanismo da inibição não-competitiva (MARQUES, 2008).

Inibição acompetitiva: este tipo de inibição é observado quando um inibidor se combina reversivelmente apenas com ES, dando origem a ESI, que não pode formar produtos. Como no caso da inibição não competitiva, a inibição acompetitiva não é revertida com o aumento do substrato. Este tipo de inibição é frequentemente encontrado em reações enzimáticas com dois ou mais substratos. A Figura 2.9 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição acompetitiva.

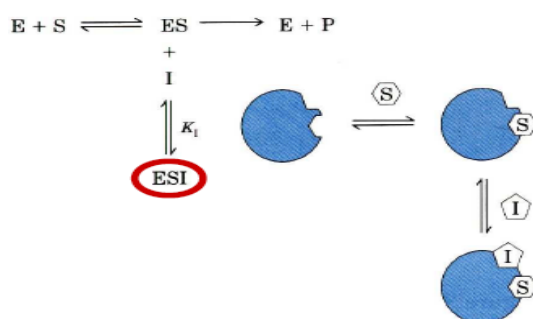


Figura 2.9 – Esquema do mecanismo da inibição acompetitiva (MARQUES, 2008).

Inibição Irreversível: ocorre sempre que a enzima experimenta modificação irreversível de um ou mais de seus grupos funcionais. Entre as substâncias que atuam dessa forma estão o ácido monoidoacético ou sua amina, a iodoacetamida, que bloqueia grupos sulfidrícos da enzima por reação de alcoilação. Além desses compostos, devem ser mencionados os inibidores organofosforados. As equações dos modelos cinéticos estão representadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Alguns modelos cinéticos enzimáticos (SANTOS et al., 1998).

Michaelis-Menten sem inibição	$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S}$	(2.2)
Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto	$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)}$	(2.3)
Michaelis-Menten com inibição não-competitiva por produto	$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)}$	(2.4)
Michaelis-Menten com inibição acompetitiva por produto	$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)}$	(2.5)
Michaelis-Menten com inibição mista linear	$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)}$	(2.6)
Michaelis-Menten com inibição parcialmente não competitiva	$v = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)}$	(2.7)

Onde: V = Velocidade de hidrólise ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);

V_m = Velocidade máxima de hidrólise ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);

[S] = Concentração do substrato ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);

[P] = Concentração do produto ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);

K_m = Constante de Michaelis-Menten ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);

K_i = Constante de inibição ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.6.2 – Parâmetros cinéticos

Os parâmetros V_m e K_m caracterizam as reações enzimáticas que são descritas pela cinética de Michaelis-Menten. V_m é dependente da concentração total da enzima, enquanto K_m é independente (FOGLER, 1992).

O modelo cinético geralmente utilizado para descrever a hidrólise enzimática da lactose é a equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto-galactose. (YANG e OKOS, 1989).

LADERO e colaboradores (2000) utilizaram o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto (galactose) para determinar os parâmetros cinéticos da hidrólise de lactose utilizando β -galactosidase de *K. fragilis* imobilizada em um suporte de sílica-alumina. A influência de um grande número de variáveis envolvendo temperatura, concentração do substrato e produtos, e concentração de enzimas foram analisadas.

HAIDER e HUSAIN (2008) realizaram um estudo comparativo usando alginato de cálcio e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na hidrólise de lactose a partir leite e soro de leite. Duas colunas foram preparadas, uma contendo alginato de cálcio solúvel e a outra um complexo imobilizado de ligação cruzada e “Concanavalin A”. O modelo de Michaelis Menten foi usado para o estudo cinético, e os parâmetros encontrados foram para K_m 2,51 mM; 5,18 mM e V_m $4,8 \cdot 10^{-4}$ mol/min; $4,2 \cdot 10^{-4}$ mol/min a enzima livre e imobilizada respectivamente. Na Tabela 2.10 são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores para a enzima β -galactosidase, obtida de várias fontes na forma solúvel e insolúvel, em diversas condições de temperatura. Analisando os dados, verifica-se a existência de uma grande diferença entre os valores de V_m e K_m . Isto se deve principalmente à forma como a enzima é utilizada. Solubilidade, método de imobilização, tipo de suporte, concentração inicial da enzima e condições de operação (temperatura, fluxo e pH) podem alterar significativamente a atividade da enzima.

Tabela 2.10 - Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase.

Fonte	T (°C)	Parâmetros cinéticos		Referência
		V_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
<i>Aspergillus Oryzae</i>	30	2,2 – 4,5	105 - 150	PORTACCIO et al., 1998
<i>Aspergillus niger</i>	40	383	70,5	YANG e OKOS, 1989
<i>Bacillus circulans</i>	60	-	41,7	NAKANISHI et al., 1983
<i>Escherichia coli</i>	21	570	0,23	HENG e GLATZ, 1994
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40	580	23	SANTOS et al., 1998
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	123	17,3	CAVILLE e COMBES, 1995

2.6.3 – Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas

SÖRENSEN (1909) mostrou que a atividade enzimática depende do pH. Sabe-se, desde então, que a atividade máxima de uma enzima corresponde a determinado pH ótimo.

MICHAELIS e DAVIDSOHN (1911) formularam a hipótese de que a dependência da atividade da enzima ao pH é consequência das propriedades anfotéricas das proteínas enzimáticas. Assim, se observa a característica em forma de sino das curvas de pH, o que indica que a proteína no seu ponto isoeletrico apresenta o máximo de atividade catalítica.

HALDANE, porém, mostrou que, em muitos casos, é impossível correlacionar a atividade enzimática com o ponto isoeletrico. É possível que a ionização de grupos localizados nos centros ativos ou próximo deles tenha grande efeito na atividade da enzima. Em sistema enzimático, o pH influi no estado de ionização dos componentes do sistema: enzima livre, complexo enzima-substrato ou o próprio substrato (VILLELA et al., 1978).

O pH exerce grande influência sobre a velocidade das reações. Muitas enzimas possuem velocidades máximas num determinado pH, denominado pH ótimo, enquanto outras atuam com igual eficácia dentro de uma faixa limitada de pH. Vários fatores influenciam o pH ótimo, incluindo os grupos ácidos no sitio ativo. Se uma enzima

necessita de um grupo ácido protonado para sua ação catalítica, a enzima pode exibir uma atividade máxima em valores de pH abaixo do pK do grupo. Por outro lado, quando há necessidade da forma dissociada de um ácido, a atividade máxima pode ocorrer acima do pK do grupo. Com frequência, dois ou mais grupos ácidos dissociáveis participam do sítio ativo, e as curvas que relacionam o pH com a atividade irão refletir a dependência de cada grupo ao pH. Na verdade, o estudo dos efeitos do pH sobre a velocidade da reação pode ajudar a identificar grupos ácidos num sítio ativo, embora outras informações sejam necessárias.

Alguns substratos são ácidos fracos ou contêm constituintes iônicos, e o pH ótimo pode refletir a necessidade de uma forma iônica ou não-iônica de substrato para a enzima, além disso, o rápido declínio na velocidade da reação, que é frequentemente observado em valores altos e baixos de pH, pode refletir na desnaturação da enzima ou a dissociação de um cofator essencial (SMITH et al., 1985).

A faixa de pH de maior atividade das lactases pode variar de 2 a 10, e muitas atuam em pH próximo do neutro, como no caso da lactase de *Kluyveromyces fragilis*. Outra influência é através da técnica pela qual as preparações enzimáticas são preparadas, como o tampão utilizado, podendo influenciar diretamente em suas propriedades. Um resumo geral das propriedades das lactases em relação ao pH é mostrado na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 - Diferentes fontes de lactase em relação ao pH ótimo e temperatura ótima (REED e NAGODAWITHANA, 1993).

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

2.6.4 – Influência da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

Muitas das reações químicas aumentam a velocidade com o aumento da temperatura. Um aumento na temperatura transmite mais energia cinética para as

moléculas reagentes, resultando em mais colisões por unidade de tempo. Reações catalisadas por enzimas se comportam similarmente ponto a ponto. As enzimas são moléculas protéicas complexas. Podemos dizer que, inicialmente, com o aumento da temperatura a atividade molecular é aumentada, contribuindo para a formação do complexo enzimático, mas com o aumento contínuo da temperatura poderá haver uma inativação gradativa da enzima, até a inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor (BAILEY e OLLYS, 1986; SEGEL, 2003).

A velocidade de qualquer reação enzimática a dada temperatura só depende da concentração de um “complexo rico em energia”, ativado, que se encontra em equilíbrio com os reagentes inativados. A cisão de tais complexos se faz a uma determinada temperatura, expressa por $k_B T/h$, onde k_B é a constante de Boltzmann – constante dos gases por molécula – e h é a constante de Planck. Isso significa que a taxa de cisão desses complexos independe da sua natureza (VILLELA et al., 1978).

A formulação geral do efeito da temperatura sobre a velocidade das reações foi feita por Arrhenius, que indicou que, de todas as moléculas de um sistema, só pode reagir as que tiverem suficiente energia de ativação para tanto (VILLELA et al., 1978; SEGEL, 2003). A energia de ativação, ou seja, a energia necessária para a conversão das moléculas do sistema ao estado reativo, pode ser determinada nos sistemas enzimáticos a partir da equação de Arrhenius, Equação 2.8.

$$k = A * e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.8)$$

Onde: k = constante de velocidade;

A = fator de frequência para a reação;

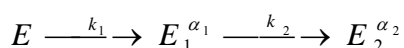
E_a = constante de energia de ativação;

R = constante dos gases;

T = temperatura.

O coeficiente da inativação é considerado superior do que o de qualquer outro processo conhecido, com exceção da desnaturação da proteína. Outros fatores como pH pode também ter um considerável efeito de taxa de inativação, como, por exemplo, força iônica, concentração de proteína, ação do substrato, inibidores e outras substâncias. É interessante que determinadas bactérias vivam normalmente em temperaturas altas, como, por exemplo, um cristal de α -amylase isolada de *Bacillus stearothermophilus* foi mostrado que retém 90% da atividade depois de 1 hora a 90°C

(DIXON E WEBB, 1979). Normalmente a desativação térmica tem uma cinética de desativação de primeira ordem. Através de uma revisão na literatura, verifica-se que a taxa de decréscimo em atividade não é sempre constante. Os autores classificam as curvas de desativação em dois casos, em um deles a atividade é sempre menor que a inicial, e, no outro, a atividade pode ser maior que a inicial num período de tempo e propõe uma cinética de desativação em série e agrupam os casos de desativação. O modelo de desativação térmica em série esta representado no seguinte mecanismo.



Sendo: α_1 e α_2 as taxas específicas de atividade E_1/E e E_2/E respectivamente;

k_1 e k_2 os coeficientes da taxa de desativação de primeira ordem;

E , E_1 e E_2 os estados de enzima que possuem diferentes atividades específicas.

O estado intermediário E_1 e o estado final E_2 são ambos homogêneos. Este modelo considera duas etapas de primeira ordem irreversíveis na presença da enzima ativa (E), tanto quanto as espécies modificadas (E_1 e E_2), sendo estas com atividades específicas diferentes da enzima na sua forma nativa (JURADO et al., 2004). BRENA et al., (2003), estudaram a estabilidade térmica de β -galactosidases de *E. coli* e *K. lactis* e utilizaram o modelo de cinética de segunda ordem. A Equação 2.9 ilustra a expressão da atividade média que foi obtida derivando o estado final E_2 , admitindo valor específico de atividade diferente de zero (BRENA, et al. 2001).

$$A = \left[1 + \frac{\alpha_1 k_d}{k_2 - k_d} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_d} \right] \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_d}{k_2 - k_d} \right) (\alpha_1 - \alpha_2) \exp(-k_2 t) + \alpha_2 \quad (2.9)$$

Se k_2 for igual a zero a Equação 2.9 se reduz à 2.10.

$$A = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t) + \alpha_1 \quad (2.10)$$

Na maioria dos estudos de desativação térmica de enzimas, considera-se cinética de primeira ordem para se relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma

dada temperatura (RIBEIRO, 1989). Supondo desativação de primeira ordem, se obtém a Equação 2.11.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A \quad (2.11)$$

Integrando a Equação 2.11 para o intervalo de tempo t=0 até t, obtém-se a Equação 2.12.

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_d * t \quad (2.12)$$

Sendo k_d a constante cinética de desativação térmica, ou taxa específica de inativação térmica.

Um conceito comum em cinética química e enzimática é o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que a atividade relativa da enzima (E/E_0), da Equação 2.8, seja igual a 0,5, ou seja, o tempo necessário, a uma temperatura T, sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. O tempo de meia vida $t_{1/2}$, expresso na Equação 2.13 pode ser relacionado com a constante de desativação k_d , pela Equação 2.13.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.13)$$

Por outro lado, k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.14.

$$k_d = A * \exp\left(\frac{-E_d}{R * T}\right) \quad (2.14)$$

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

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} * \frac{1}{T} \quad (2.15)$$

Onde: k_d = constante da taxa da reação de desativação térmica à temperatura T;

E_d = energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima;

T = temperatura absoluta;

R = constante da lei dos gases.

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

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1 – Unidade experimental

A unidade experimental foi montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica localizado na Universidade Federal de Uberlândia, onde foram realizados os experimentos para determinação da atividade para a enzima na forma imobilizada como está representado na Figura 3.1. Esta unidade experimental consistia em um microrreator de mistura, de volume útil de 200 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatzado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas imobilizadas eram colocadas dentro de uma cesta de aço inox de 100 mesh, e esta colocada dentro do reator, evitando assim o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada. O reator de mistura apresentava 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno e a cesta de aço inox 8,2 cm de altura e 2,4cm de diâmetro.

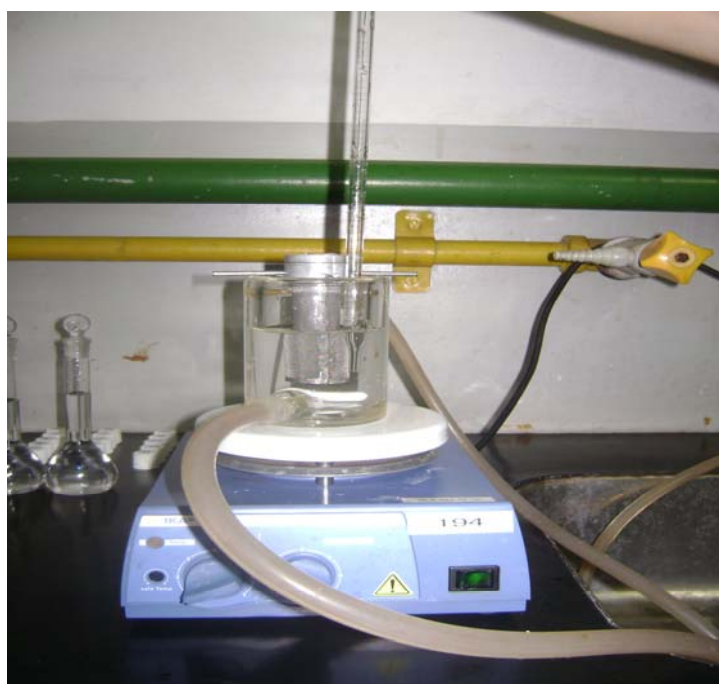


Figura 3.1 – Unidade Experimental em reator tipo cesta

3.1.2 - Enzima

A enzima utilizada neste trabalho foi β -galactosidase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*. Essa enzima foi adquirida pela empresa Sigma Chemical CO, disponível na forma de pó branco. A atividade descrita pelo fabricante foi de 9 unidades por mg de sólido, utilizando lactose como substrato e a unidade de atividade foi de 1 μ mol do substrato reagido por minuto a pH 4,5 e temperatura de 30°C. Os reagentes utilizados nos experimentos apresentaram grau de pureza analítica.

3.1.3 – Suportes para imobilização

Foram testadas algumas resinas de troca iônica, sendo estas a Duolite A-568, Duolite S-761 e Amberlite 252 Na adquiridas da Rohm Hass e as resinas Dowex Marathon A e Dowex Marathon C obtidas da Dow Chemical Company. Estas resinas estão apresentadas na Figura 3.2.

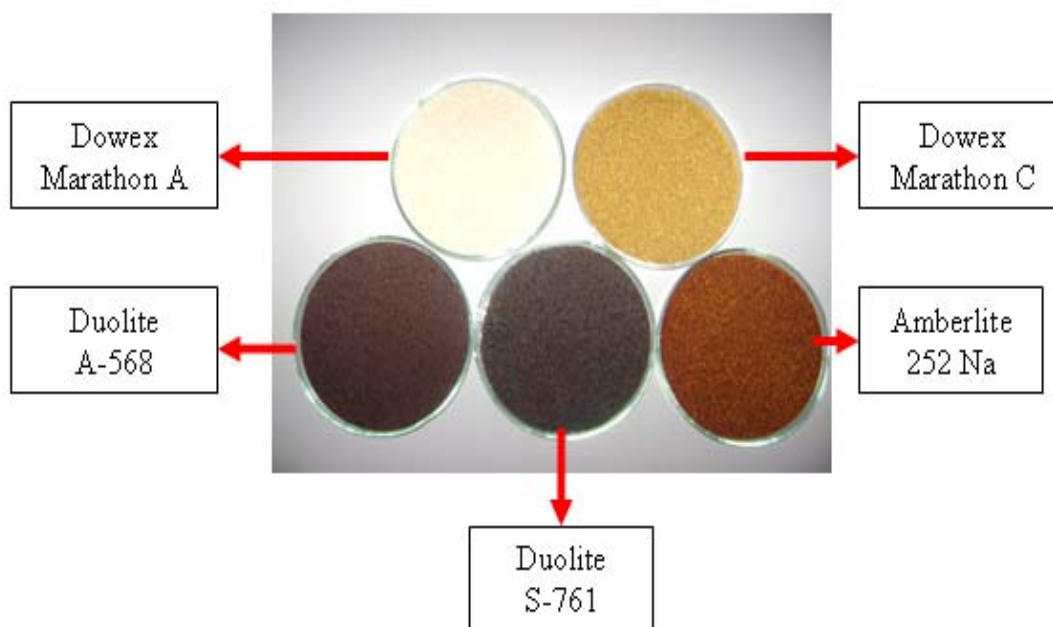


Figura 3.2 – Tipos de resinas empregadas para imobilização de enzima β -galactosidase.

- 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;
- Amberlite 252 Na é um trocador catiônico, baseado em ligação cruzada sulfonado de poliestireno e usado para tratamento de condensados, desmineralização, descalcificação e tratamento de soluções oxidantes;
- Dowex Marathon A é uma resina fortemente básica com tamanho de partículas uniforme e tem grande aplicação em desmineralização;
- Dowex Marathon C é um trocador catiônico fortemente ácido com alta capacidade para aplicações em indústrias de abrandamento e desmineralização.

As resinas foram ativadas com a metodologia descrita abaixo de acordo com seus respectivos fabricantes.

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

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

- Duolite A-568 e Duolite S-761: foram ativadas com uma solução de ácido clorídrico 1M, seguindo de hidróxido de sódio 1M e lavando-se com água destilada na troca de solução e ao final da ativação. Em todas as etapas utilizaram-se 10 volumes de solução por volume de resina.

3.2 – Metodologia

3.2.1 – Determinação da atividade de β -galactosidase imobilizada pelo método das atividades iniciais

Em todos os experimentos realizados com β -galactosidase imobilizada para hidrólise da lactose usou-se o método das velocidades iniciais da reação para determinar a atividade catalítica.

A reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase era realizada em um microrreator conforme item 3.1.1, com um volume de 100 mL de solução de lactose, nas condições de pH, temperatura desejada e agitação definida. Para cada experimento

era adicionada ao reator uma cesta de aço inox com a enzima imobilizada, usando para todos os experimentos 0,5 gramas de partículas de resina imobilizada.

A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada ($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{g}_{\text{resina}}$).

Para cada experimento foram tomadas cinco amostras no intervalo de três em três minutos. Cada amostra era introduzida em um tubo de ensaio tampado, os quais imediatamente eram colocados em um banho de água em ebulição por 10 minutos para a completa inativação da β -galactosidase. A glicose formada nas amostras era dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004) conforme Anexo A.

A atividade a partir do método das atividades iniciais, para cada reação da hidrólise da lactose, era obtida através por meio das inclinações das retas de concentração de glicose em função do tempo de reação. Todos os experimentos realizados até o final do trabalho foram feitos em duplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. A atividade foi calculada com a curva de calibração, conforme Apêndice A.

3.2.2 – Planejamento fatorial completo

Experimentos delineados com esquemas fatoriais são aqueles que envolvem níveis de dois ou mais fatores. Denominam-se fatores as variáveis independentes ou preditoras que tiverem seus níveis fixados ou a priori segundo o interesse do pesquisador. Na literatura o planejamento fatorial não é considerado delineamentos experimentais, mas sim delineamentos de tratamentos. Se todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator estão presentes, o esquema fatorial é dito completo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Essa técnica permite avaliar não somente os efeitos principais dos fatores como também os efeitos de interação entre os mesmos. O número de experimentos é igual ao número de níveis experimentais elevado ao número de fatores. Para experimentos fatoriais em dois níveis, o número de corridas experimentais (N) para se avaliar os k fatores é dado por $N = 2^k$. Logo, enquanto o número de fatores cresce linearmente, o número de corridas cresce exponencialmente. Arranjos fatoriais completos podem ser gerados para qualquer quantidade de fatores e os níveis de cada fator se alternam nas colunas, segundo uma mesma ordem (PAIVA, 2006).

3.2.3 – Planejamento composto central

O planejamento composto central é o planejamento fatorial clássico em dois níveis ($2k$), utilizado para ajuste em equação de primeira ordem e acrescido de alguns pontos experimentais que permitem a estimação dos coeficientes de uma superfície de 2ª ordem.

O PCC é sem dúvida o mais popular planejamento de segunda ordem e foi introduzido por Box e Wilson (1951). Um PCC para k fatores, devidamente codificados como (x_1, x_2, \dots, x_k) , é formado de três partes:

- Uma parte fatorial (ou cúbica), contendo um total de pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $x_i = +1$, para todos os $i = 1, \dots, k$;
- Uma parte axial com valor α e $-\alpha$;
- Um total de ensaios realizados no ponto central, onde $x_1 = \dots = x_k = 0$.

Para realizar um PCC é necessário definir como será cada uma dessas três partes e decidir quantos e quais serão os pontos cúbicos, qual o valor de α , e quantas repetições serão realizados no ponto central. A localização dos pontos axiais determina se o planejamento é ortogonal ou rotável.

Rotatibilidade do planejamento se refere às características que o planejamento possa extrair a maior quantidade de informação em todas as direções de superfície ajustada. Um planejamento é ortogonal se os cálculos de todos os termos do modelo de segunda ordem são não correlacionados.

As repetições no ponto central têm duas finalidades: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. Para estabilizar a variância, uma regra prática é fazer de 3 a 5 ensaios repetidos se α estiver próximo de k , onde k é o número de fatores, e somente 1 ou 2 se α for próximo a 1. Para obter uma estimativa do erro, quanto mais repetições melhor. As vantagens do uso do planejamento experimental são (BARROS NETO et al., 2002; RODRIGUES e IEMMA, 2005):

- Reduzir o tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- Reduzir os custos relativos à execução dos ensaios, fato que está relacionado à redução da quantidade de experimentos;
- Permitir a avaliação e a minimização do erro experimental;
- Permitir a otimização multivariada;
- Não requer conhecimentos elevados em estatística.

3.2.4 – Imobilização de β -galactosidase

3.2.4.1 – Escolha das resinas para a imobilização de β -galactosidase

As resinas de troca iônica foram testadas como suporte para imobilização de β -galactosidase pelo método de adsorção.

Primeiramente as resinas foram ativadas e após realizado um teste de imobilização de β -galactosidase preliminar. Em todos os experimentos incubou-se 10 mL de solução de β -galactosidase a 1 g/L em tampão acetato com pH 4,5 e 0,5 g de resina, durante 2 horas e sob agitação de 50 rpm à 25 °C em incubadora rotativa. Após a imobilização, as resinas foram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e utilizadas para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme item 3.2.1 em solução de lactose de 50 g/L, pH 4,5 a 35°C.

3.2.4.2 – Testes preliminares da influência do tempo e das variáveis consideradas significativas no processo de imobilização

Após os resultados de testes com os suportes para a imobilização de β -galactosidase, conforme item 3.2.4.1, definiu-se a resina Duolite A-568 como o suporte para a imobilização do trabalho subsequente, pois apresentou melhor retenção de atividade enzimática no processo.

Posteriormente, foi proposto um Planejamento Fatorial Completo (1) para o estudo das variáveis consideradas significativas no processo, sendo um planejamento dois níveis, com três réplicas centrais e três variáveis totalizando 11 experimentos, utilizando-se o *software Statistica 7.0*. As variáveis foram: pH, concentração de enzima e tempo de imobilização. O pH variou de 4 a 8, concentração de enzimas de 5 a 15 g/L e tempo de imobilização de 0,5 a 2 horas. As faixas de concentração e pH escolhidas para cada variável foram obtidas pelos testes preliminares e com base na literatura dos trabalhos de BÓDALO et al., (1991), TANRISEVEN e DOGAN (2002) e FREITAS et al., (2007). Foram utilizados os tampões acetato 10^{-1} M na faixa de pH 4 a 5,5, citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 6 à 7 e o tampão bórico 10^{-1} M para faixa de pH de 7,5 à 8. A temperatura de imobilização foi fixada em 25°C com agitação de 50 rpm em incubadora rotativa e a atividade foi calculada conforme item 3.2.1. Os valores

codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = pH, X_2 = concentração de enzimas e X_3 = tempo) estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Matriz Planejamento Fatorial Completo (1).

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)
1	4 (-1)	5 (-1)	0,5 (-1)
2	8 (1)	5 (-1)	0,5 (-1)
3	4 (-1)	15 (1)	0,5 (-1)
4	8 (1)	15 (1)	0,5 (-1)
5	4 (-1)	5 (-1)	2 (1)
6	8 (1)	5 (-1)	2 (1)
7	4 (-1)	15 (1)	2 (1)
8	8 (1)	15 (1)	2 (1)
9	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)
10	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)
11	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)

Com os resultados do primeiro Planejamento Fatorial Completo (1) observou-se que a faixa escolhida não abrangeu a região com atividades máximas, então, propôs-se um segundo Planejamento Fatorial Completo (2) levando em consideração a tendência de melhor resultado do primeiro planejamento. As novas faixas para essas variáveis são: pH de 2 a 4, concentração de enzimas de 15 a 25 g/L e tempo de 2 a 12 horas. Foram utilizados os tampões ácido clorídrico-cloreto de potássio 10^{-1} M para o pH 2, citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 3 a 3,5 e acetato 10^{-1} M para o pH 4. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = pH, X_2 = concentração de enzimas e X_3 = tempo) estão apresentados na Tabela 3.2.

Após a imobilização, os biocatalisadores foram lavados com tampão acetato 4,5 e utilizados para determinação das taxas iniciais conforme item 3.2.1, a 35°C , pH 4,5 e solução de lactose de 50 g/L.

Tabela 3.2 - Matriz Planejamento Fatorial Completo (2).

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)
1	2 (-1)	15 (-1)	2 (-1)
2	4 (1)	15 (-1)	2 (-1)
3	2 (-1)	25 (1)	2 (-1)
4	4 (1)	25 (1)	2 (-1)
5	2 (-1)	15 (-1)	12 (1)
6	4 (1)	15 (-1)	12 (1)
7	2 (-1)	25 (1)	12 (1)
8	4 (1)	25 (1)	12 (1)
9	3 (0)	20 (0)	7 (0)
10	3 (0)	20 (0)	7 (0)
11	3 (0)	20 (0)	7 (0)

3.2.4.3 – Influência do pH e concentração de enzima no meio de imobilização

Após a análise dos resultados dos dois Planejamentos Fatoriais Completos, conforme item 3.2.4.2. e por questões econômicas fixou-se o tempo de imobilização em 12 horas, por este já estar dentro da área otimizada.

Posteriormente, foi proposto um Planejamento Composto Central (PCC) para otimizar o processo de imobilização de β -galactosidase. As variáveis consideradas foram pH e concentração de enzima do meio, com três réplicas centrais totalizando 11 experimentos e α de ortogonalidade de 1,14744. Neste planejamento, a concentração de enzima situou-se na faixa de 6,82 (- α) a 25,18 g/L (α) e o pH variou entre 3,35 (- α) a 5,65 (α). Foram utilizados os tampões citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 3 a 3,5 e acetato 10^{-1} M para o pH 4 a 5,65. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = pH e X_2 = concentração de enzimas) estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito do pH e concentração de enzima na imobilização de β -galactosidase na resina Duolite A-568.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)
1	3,5 (-1)	8 (-1)
2	3,5 (-1)	24 (1)
3	5,5 (1)	8 (-1)
4	5,5 (1)	24 (1)
5	3,35 ($-\alpha$)	16 (0)
6	5,65 (α)	16 (0)
7	4,5 (0)	6,82 ($-\alpha$)
8	4,5 (0)	25,18 (α)
9	4,5 (0)	16 (0)
10	4,5 (0)	16 (0)
11	4,5 (0)	16 (0)

A imobilização foi realizada incubando-se 10 mL de uma solução de β -galactosidase com 0,5 g de resina durante 12 horas, nas condições definidas pelo (PCC) na Tabela 3.3, com agitação de 50 rpm em incubadora rotativa e temperatura de 25°C. Ao final da imobilização a determinação da atividade do biocatalisador foi realizada conforme item 3.2.1, usando uma concentração de lactose de 50 g/L no meio reacional.

As equações codificadas do pH e concentração de enzima são apresentadas nas Equações 3.1 e 3.2, respectivamente.

$$X_1 = \frac{pH - 4,5}{1} \quad (3.1)$$

$$X_2 = \frac{[E] - 16}{8} \quad (3.2)$$

3.2.4.4 – Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada

Após a otimização do processo de imobilização em termos de pH, concentração de enzima e tempo de imobilização foi realizado um estudo da influência do glutaraldeído como agente reticulante na atividade enzimática. Foi realizado um teste preliminar para saber a influência do processo de ligação cruzada antes e após a imobilização na atividade enzimática. Em uma amostra de resina de 0,5 g foram adicionados 5 mL de solução de glutaraldeído com concentração de 3 g/L em um tempo de 15 minutos de reticulação, sob agitação de 50 rpm em incubadora rotativa e temperatura de 25°C com posterior imobilização conforme condições otimizadas no item 3.2.4.3. Em outra amostra foi feita a imobilização com posterior processo de ligação cruzada nas condições citadas anteriormente e por fim realizado apenas o processo de imobilização sem ligação cruzada. Posteriormente, foi realizado a determinação da atividade conforme item 3.2.1, lactose a 50 g/L a 35°C.

3.2.4.4.1 – Influência da concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada

Com os resultados do item 3.2.4.4 foi decidido usar o processo de ligação cruzada após a imobilização, pois se obteve resultados de atividade melhores do que o processo realizado antes da imobilização. Um novo planejamento composto central (PCC) foi proposto com três réplicas centrais e duas variáveis totalizando 11 experimentos, com α de ortogonalidade igual a 1,14744 para a otimização do processo de ligação cruzada. As variáveis estudadas foram a concentração de glutaraldeído no intervalo de 0,71 (- α) a 5,30 g/L (α) e o tempo de reação na faixa de 0,71 (- α) a 5,30 horas (α), em temperatura fixa de 25°C. As faixas de concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada escolhidas para cada variável foram obtidas com base na literatura do trabalho de LETCA (2004), o que sugere o uso de glutaraldeído para a resina Duolite A-568 como um ligante entre enzima e suporte.

O processo de ligação cruzada foi realizado incubando-se 2,5 mL de uma solução de glutaraldeído, na resina imobilizada com β -galactosidase, conforme item 3.2.4.3 nas condições definidas pelo PCC na Tabela 3.4, com agitação de 50 rpm em incubadora rotativa.

Ao final do processo de ligação cruzada o biocatalisador foi lavado com tampão acetato de pH 4,5 e feita a determinação da atividade, conforme item 3.2.1, a 35°C, pH 4,5 e concentração inicial de lactose 50 g/L no meio reacional. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = concentração de glutaraldeído e X_2 = tempo) estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito da concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	Concentração de Glutaraldeído (g/L)	Tempo (h)
1	1 (-1)	1 (-1)
2	1 (-1)	5 (1)
3	5 (1)	1 (-1)
4	5 (1)	5 (1)
5	0,71 (- α)	3 (0)
6	5,30 (α)	3 (0)
7	3 (0)	0,71 (- α)
8	3 (0)	5,30 (α)
9	3 (0)	3 (0)
10	3 (0)	3 (0)
11	3 (0)	3 (0)

As equações de codificação da concentração de glutaraldeído e tempo são apresentadas nas Equações 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$X_1 = \frac{[G] - 3}{2} \quad (3.3)$$

$$X_2 = \frac{\text{Tempo} - 3}{2} \quad (3.4)$$

3.2.4.5 – Estudo da enzima imobilizada em relação ao número de usos

Neste estudo foram usadas duas amostras de enzima imobilizada nas condições ótimas conforme item 3.2.4.3. Após a imobilização uma das amostras foi submetida ao processo de ligação cruzada nas condições ótimas no item 3.2.4.4.1. A seguir ambas as amostras foram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e realizadas 30 determinações subsequentes de atividade. Para cada amostra e entre cada reação, as amostras de enzima imobilizada eram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e assim calculada a atividade relativa à inicial. A atividade foi calculada conforme item 3.2.1, sob as seguintes condições de reação: 35°C, pH 4,5, concentração inicial de lactose de 50 g/L e tempo de reação de 15 minutos.

3.2.4.6 – Estabilidade da enzima imobilizada com e sem o processo de ligação cruzada em relação ao pH

O procedimento experimental constituiu em preparar tampões na faixa de pH de 1 a 8. Os tampões utilizados foram: ácido clorídrico-cloreto de potássio 10^{-1} M para faixa de pH de 1 a 2, acetato 10^{-1} M para faixa de pH de 4 a 5,5, citrato-fosfato 10^{-1} M para faixa de pH de 3 a 3,5 e de 6 a 7 e o tampão bórico 10^{-1} M para faixa de pH de 7,5 a 8. Os experimentos foram divididos em duas etapas: primeiramente oito amostras de β -galactosidase foram imobilizadas em Duolite A-568 nas condições otimizadas conforme item 3.2.4.3 sem o processo de ligação cruzada e em seguida imobilizaram-se quinze amostras de β -galactosidase submetidas ao processo de ligação cruzada, nas condições ótimas, conforme item 3.2.4.4.1. A enzima imobilizada foi lavada e incubada com 10 mL de cada tampão. Essas soluções enzimáticas foram mantidas em banho termostaticado a 25°C durante 24 horas. Após esse período, os biocatalisadores foram lavados com tampão acetato de pH 4,5 e determinada a atividade conforme item 3.2.1 empregando uma solução de lactose de 50 g/L, pH 4,5 a 35°C. A atividade foi calculada relativa à inicial.

3.2.4.7 – Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada

O biocatalisador nas condições de imobilização otimizadas, conforme item 3.2.4.3, foi submetido ao processo de ligação cruzada em condições ótimas (item 3.2.4.4.1), onde foi realizado um estudo do efeito conjunto das variáveis pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada, empregando um Planejamento Composto Central (PCC) com três réplicas centrais totalizando 11 experimentos e com α de ortogonalidade igual a 1,14744. Os experimentos foram realizados na faixa de 28 (- α) a 60°C (α) para temperatura e de 1,98 (- α) a 7,02 (α) para o pH. Dados da literatura (GAUR et al., 2006 e FREITAS et al., 2007) foram utilizados para selecionar as faixas adotadas para as variáveis. Todos os experimentos foram realizados com concentração de lactose 50 g/L e pH 4,5. A determinação da atividade foi realizada conforme item 3.2.1. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = temperatura e X_2 = pH) estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	Temperatura (°C)	pH
1	30 (-1)	2,3 (-1)
2	30 (-1)	6,7 (1)
3	58 (1)	2,3 (-1)
4	58 (1)	6,7 (1)
5	28 (- α)	4,5 (0)
6	60 (α)	4,5 (0)
7	40 (0)	1,98 (- α)
8	40 (0)	7,02 (α)
9	40 (0)	4,5 (0)
10	40 (0)	4,5 (0)
11	40 (0)	4,5 (0)

As equações de codificação de pH e temperatura são apresentadas nas Equações 3.5 e 3.6, respectivamente.

$$X_1 = \frac{\text{Temperatura} - 4,5}{2,2} \quad (3.5)$$

$$X_2 = \frac{\text{pH} - 4,0}{14} \quad (3.6)$$

3.2.4.8 – Influência da concentração inicial de lactose na atividade de β -galactosidase imobilizada

Este estudo permite avaliar qual a influência da concentração inicial de lactose na atividade da enzima imobilizada. As enzimas foram imobilizadas nas condições ótimas já determinadas e posteriormente submetidas ao processo de ligação cruzada nas condições ótimas, conforme itens 3.2.4.3 e 3.2.4.4.1, respectivamente. Após foram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e determinadas as taxas iniciais de reação, de acordo com o item 3.2.1, a 35°C, pH 4,5 e usando as concentrações de lactose variando entre 5 a 140 g/L.

3.2.4.9 – Influência da concentração inicial de lactose, glicose e galactose na atividade de β -galactosidase imobilizada

Foi proposto um Planejamento Composto Central (PCC) com três variáveis e três réplicas centrais totalizando 17 experimentos e α de ortogonalidade igual a 1,3531, tendo como objetivo analisar a influência conjunta da concentração dos produtos de reação glicose e galactose, e substrato lactose na hidrólise enzimática. A enzima foi imobilizada nas condições ótimas e posteriormente submetida ao processo de ligação cruzada nas condições otimizadas, conforme itens 3.2.4.3 e 3.2.4.4.1, respectivamente. Neste planejamento todos os experimentos foram realizados a 35°C em tampão acetato pH 4,5. As atividades foram determinadas pelo método das velocidades iniciais de reação de acordo com o item 3.2.1, mas com um diferencial neste item: as amostras eram tomadas de cinco em cinco minutos, para se ter resultados mais precisos. As faixas

de concentração para as variáveis em estudo foram de 8,82 (- α) a 56,18 g/L (α) para a lactose e 0 (- α) a 23 g/L (α) para a glicose e galactose. Estas faixas de concentração foram baseadas nos trabalhos de LADERO et al., (1998), FERNANDES et al., (2006) e FREITAS et al., (2007). Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = lactose, X_2 = glicose e X_3 = galactose), estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Matriz Planejamento Composto Central da influência da concentração inicial de lactose, glicose e galactose na atividade enzimática.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Lactose (g/L)	Glicose (g/L)	Galactose (g/L)
1	15 (-1)	3 (-1)	3 (-1)
2	15 (-1)	3 (-1)	20 (1)
3	15 (-1)	20 (1)	3 (-1)
4	15 (-1)	20 (1)	20 (1)
5	50 (1)	3 (-1)	3 (-1)
6	50 (1)	3 (-1)	20 (1)
7	50 (1)	20 (1)	3 (-1)
8	50 (1)	20 (1)	20 (1)
9	8,82 (- α)	11,5 (0)	11,5 (0)
10	56,18 (α)	11,5 (0)	11,5 (0)
11	32,5 (0)	0 (- α)	11,5 (0)
12	32,5 (0)	23 (α)	11,5 (0)
13	32,5 (0)	11,5 (0)	0 (- α)
14	32,5 (0)	11,5 (0)	23 (α)
15	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)
16	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)
17	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)

As equações de codificação de lactose, glicose e galactose são apresentadas nas Equações 3.7, 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$X_1 = \frac{[Lactose] - 32,5}{17,5} \tag{3.7}$$

$$X_2 = \frac{[Glicose] - 11,5}{8,5} \quad (3.8)$$

$$X_3 = \frac{[Galactose] - 11,5}{8,5} \quad (3.9)$$

3.2.4.10 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada

Com a análise dos resultados do Planejamento Composto Central do item 3.2.4.9 da influência da lactose, glicose e galactose na atividade da enzima pode-se concluir que a glicose não apresentou influência significativa na atividade de β -galactosidase, já a galactose apresentou inibição. A partir dessa análise foi proposto um estudo da influência da concentração inicial de galactose na atividade enzimática. A enzima foi imobilizada com posterior ligação cruzada nas condições otimizadas, conforme itens 3.2.4.3 e 3.2.4.4.1, respectivamente. Neste estudo adotaram-se as faixas de concentração inicial de lactose (S) 5 a 60 g/L e galactose (I) de 0 a 22,5 g/L, conforme Tabela 3.7. Esse estudo foi baseado no trabalho de PORTACCIO et al., (1998) e FREITAS (2007) que estudaram a influência da galactose na atividade da enzima. As atividades foram determinadas pelo método das velocidades iniciais de reação de acordo com o item 3.2.1, a 35°C e tampão acetato pH 4,5.

Os resultados experimentais de velocidade de reação foram ajustados aos modelos cinéticos de inibição competitiva (Equação 3.10), inibição não competitiva (Equação 3.11), inibição acompetitiva (Equação 3.12), inibição mista linear (Equação 3.13) e inibição parcialmente não competitiva (Equação 3.14), utilizando *software Statistica 7.0* e o método numérico de Levenberg-Marquardt.

Inibição Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.10)$$

Inibição Não-Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.11)$$

Inibição Acompetitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.12)$$

Inibição Mista Linear

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (3.13)$$

Inibição Parcialmente Não Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.14)$$

Tabela 3.7 – Estudo da influência da variação de concentração da lactose (S) e galactose (I) para determinação do estudo cinético de inibição enzimática.

Experimentos	Lactose (g/L)	Galactose (g/L)	Experimentos	Lactose (g/L)	Galactose (g/L)
1	5	0	15	30	15
2	5	7,5	16	30	22,5
3	5	15	17	40	0
4	5	22,5	18	40	7,5
5	10	0	19	40	15
6	10	7,5	20	40	22,5
7	10	15	21	50	0
8	10	22,5	22	50	7,5
9	20	0	23	50	15
10	20	7,5	24	50	22,5
11	20	15	25	60	0
12	20	22,5	26	60	7,5
13	30	0	27	60	15
14	30	7,5	28	60	22,5

Com os resultados obtidos dos ajustes de parâmetros foi possível analisar o modelo que melhor descreve a influência do produto galactose.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Escolha do suporte

Testes preliminares foram feitos em relação à retenção de atividade, de acordo com o item 3.2.4.1, nas resinas Duolite A-568, Duolite S-761, Amberlite 252 Na, Dowex Marathon A e Dowex Marathon C.

As resinas Dowex Marathon A, Dowex Marathon C e Amberlite 252 Na não apresentaram atividade enzimática, já as resinas Duolite A-568 e Duolite S-761 apresentaram atividade, conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultado preliminar para escolha da resina na imobilização da enzima β -galactosidase.

Resinas	Atividade (U*)
Dowex Marathon A	0
Dowex Marathon C	0
Amberlite 252 Na	0
Duolite A-568	0,098
Duolite S-761	0,031

$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$

Observando os resultados na Tabela 4.1, pode-se notar que a resina Duolite A-568 apresentou uma melhor retenção de atividade enzimática (U), com base nestes dados foi escolhida a resina Duolite A-568 para o trabalho subsequente.

MARQUEZ et al., (2007) imobilizaram invertase em resinas de troca iônica para hidrólise de sacarose e observaram uma maior retenção enzimática na resina Duolite A-568.

4.2 – Escolha do tempo e das faixas para estudo da imobilização de β -galactosidase

Dois Planejamentos Fatoriais Completos foram utilizados para estudo da imobilização de β -galactosidase, foi possível escolher as faixas das variáveis e o tempo de imobilização conforme item 3.2.4.2. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo Planejamento Fatorial Completo (1) estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo (1).

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U^*)
1	4 (-1)	5 (-1)	0,5 (-1)	0,243
2	8 (1)	5 (-1)	0,5 (-1)	0,162
3	4 (-1)	15 (1)	0,5 (-1)	0,403
4	8 (1)	15 (1)	0,5 (-1)	0,182
5	4 (-1)	5 (-1)	2 (1)	0,353
6	8 (1)	5 (-1)	2 (1)	0,186
7	4 (-1)	15 (1)	2 (1)	0,470
8	8 (1)	15 (1)	2 (1)	0,240
9	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,317
10	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,304
11	6 (0)	10 (0)	1,25 (0)	0,320

$$U^* = (\text{g glicose} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g resina})$$

Analisando a Tabela 4.2 pode-se observar que a atividade variou de 0,162 a 0,470 U. Sendo o maior valor de atividade no experimento 7, com atividade de 0,470 U, mostrando que a tendência de melhores atividades ocorre em pH menor que 4 (-1), concentração de β -galactosidase maior que 15g/L (+1) e tempo de imobilização maior que 2 horas (+1). Esta tendência pode ser confirmada no experimento 2 que apresenta a menor atividade alcançada de 0,162 U, com pH 8, concentração de enzima 5 g/L e tempo de 0,5 horas. Os resultados obtidos de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. A Tabela 4.3 mostra os

parâmetros lineares e as interações das três variáveis estudadas ($X_1 = \text{pH}$, $X_2 =$ concentração de enzimas e $X_3 =$ tempo), representando o modelo completo ajustado.

Tabela 4.3 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,2890	0,0087	0,000005
X_1 (L)	-0,0874	0,0102	0,0010
X_2 (L)	0,0439	0,0102	0,0127
X_3 (L)	0,0324	0,0102	0,0338
X_1X_2	-0,0254	0,0102	0,0678
X_1X_3	-0,0119	0,0102	0,3094
X_2X_3	-0,0011	0,0102	0,9176

Após a realização da regressão múltipla dos resultados da Tabela 4.2, obteve-se a Equação 4.1 completa com todos os parâmetros mostrados na Tabela 4.3.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,2890 - 0,08741X_1 + 0,0439X_2 + 0,0324X_3 - 0,0254X_1X_2 \\
 & - 0,0119X_1X_3 + 0,0011X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

Foram considerados parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$), devido a grande variedade inerente aos processos bioquímicos. Observa-se na Tabela 4.3 que as variáveis significativas do modelo foram: pH, concentração de enzima e tempo nos seus termos lineares (X_1 (L), X_2 (L) e X_3 (L)) bem como interações pH/concentração de enzima X_1X_2 . Com a eliminação dos parâmetros não significativos, obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,2890	0,0082	0
X ₁ (L)	-0,0874	0,0097	0,0001
X ₂ (L)	0,0439	0,0097	0,0039
X ₃ (L)	0,0324	0,0097	0,0153
X ₁ X ₂	-0,0254	0,0097	0,0391

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.2.

$$Atividade = 0,2890 - 0,0874X_1 + 0,0439X_2 + 0,0324X_3 - 0,0254X_1X_2 \quad (4.2)$$

O coeficiente de determinação R² foi de 0,95, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica. A Figura 4.1 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.2 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

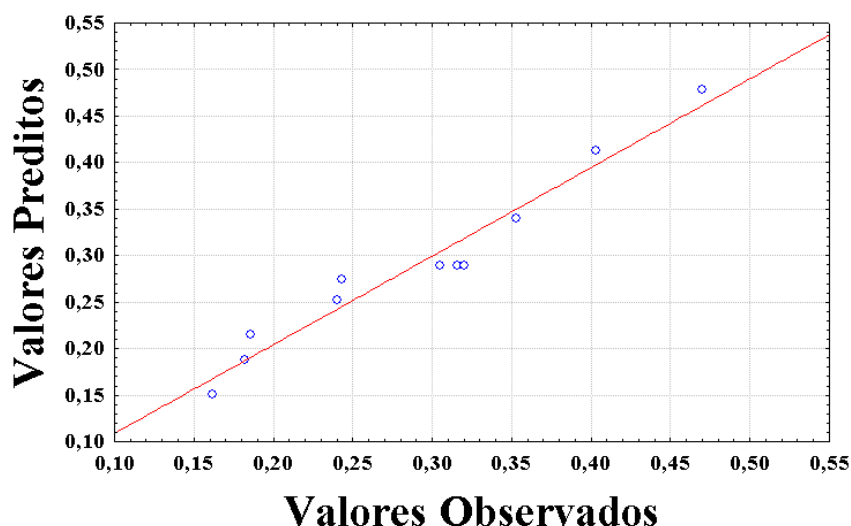


Figura 4.1 – Valores preditos em função dos valores observados.

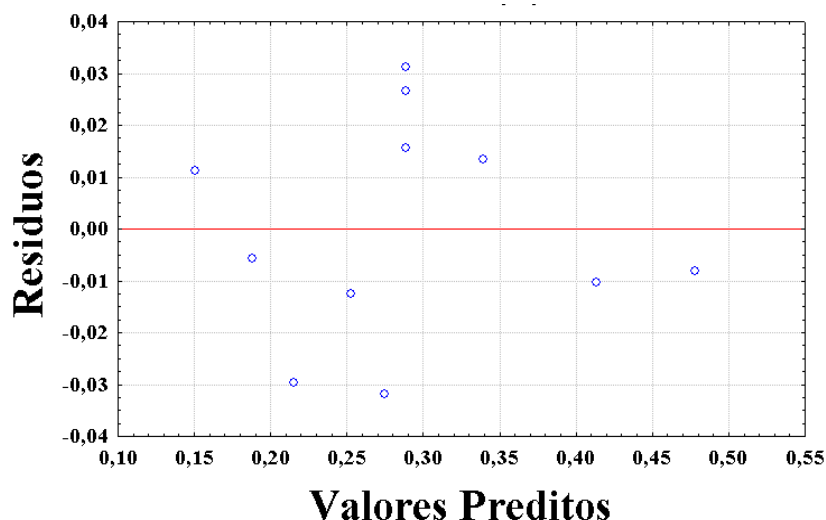


Figura 4.2 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Analisando a Figura 4.1, observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentam valores bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.2, nota-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do traçado no ponto zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. O modelo mostrou-se significativo e com isso construíram-se as superfícies de resposta, analisando-se de duas em duas, e definindo a melhor tendência de acordo com as maiores atividades. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5.

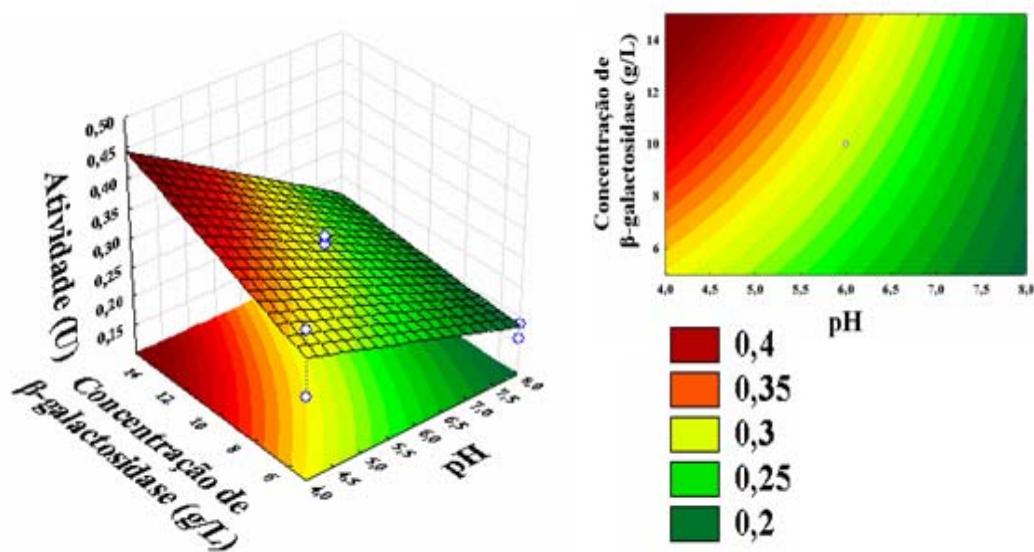


Figura 4.3 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática.

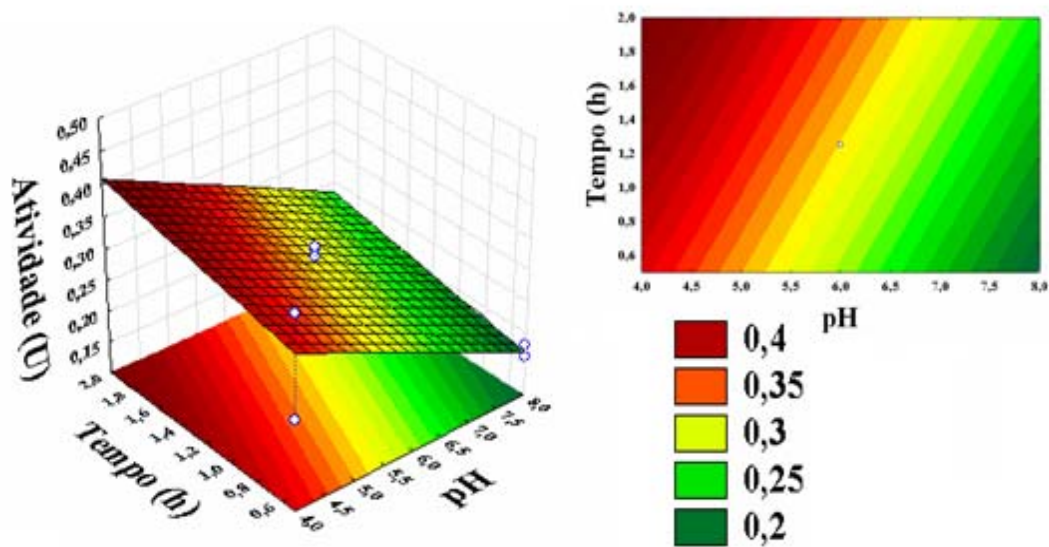


Figura 4.4 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e pH na atividade enzimática.

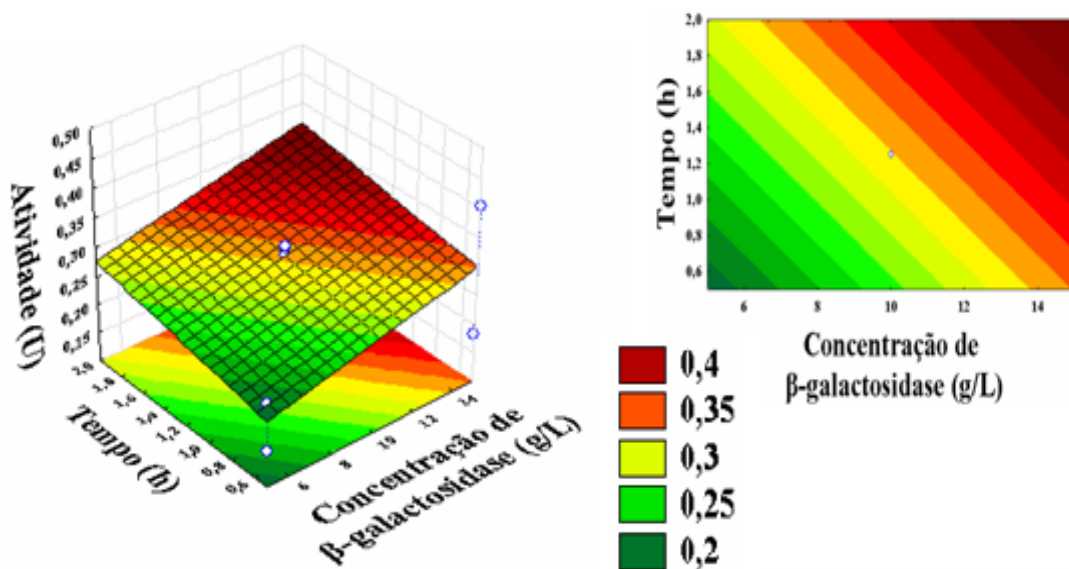


Figura 4.5 – Superfície de resposta da influência do tempo de imobilização e concentração de enzima na atividade enzimática.

A partir dos resultados do Planejamento Fatorial Completo (1) na Tabela 4.2 e através das superfícies de resposta nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5, pode-se analisar que as faixas tenderam para uma maior concentração de enzima, maior tempo e menor pH. Desta forma foi realizado o segundo planejamento. Os resultados das atividades

enzimáticas obtidos pelo Planejamento Fatorial Completo (2) estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento fatorial completo (2).

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U^*)
1	2 (-1)	15 (-1)	2 (-1)	0,020
2	4 (1)	15 (-1)	2 (-1)	0,500
3	2 (-1)	25 (1)	2 (-1)	0,070
4	4 (1)	25 (1)	2 (-1)	0,540
5	2 (-1)	15 (-1)	12 (1)	0,402
6	4 (1)	15 (-1)	12 (1)	0,600
7	2 (-1)	25 (1)	12 (1)	0,496
8	4 (1)	25 (1)	12 (1)	0,640
9	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,456
10	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,462
11	3 (0)	20 (0)	7 (0)	0,451

$$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$$

No segundo Planejamento Fatorial Completo (2), pode-se observar na Tabela 4.5 que a atividade variou de 0,02 a 0,640 U, sendo o maior valor de atividade no experimento 8, com 0,640 U. Isso mostra que a melhor atividade está relacionada a pH maior que 4, alta concentração de β -galactosidase e tempo de imobilização situado em uma região ótima de 12 horas. Para o experimento 1 no qual a atividade foi a menor obtida (0,02) nota-se que o pH foi de 2 (-1), concentração de enzima de 15 g/L (-1) e tempo de 2 horas (-1).

Os resultados obtidos de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. A Tabela 4.6 mostra os parâmetros lineares e as interações das três variáveis estudadas, sendo X_1 a variável pH, X_2 a variável concentração de enzimas e X_3 a variável tempo.

Tabela 4.6 – Resultado da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,4215	0,0111	0,000003
X ₁ (L)	0,1618	0,0130	0,0002
X ₂ (L)	0,0282	0,0130	0,0958
X ₃ (L)	0,1262	0,0130	0,0006
X ₁ X ₂	-0,0082	0,0130	0,5635
X ₁ X ₃	-0,0762	0,0130	0,0042
X ₂ X ₃	0,0052	0,0130	0,7111

Após a realização da regressão múltipla, com os resultados da Tabela 4.5, obteve-se a Equação 4.3 completa com todos os parâmetros relacionados na Tabela 4.6.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,4215 + 0,1618X_1 + 0,0282X_2 + 0,1262X_3 - 0,0082X_1X_2 \\
 & - 0,0762X_1X_3 + 0,0052X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{4.3}$$

Os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). Observa-se na Tabela 4.6 que as variáveis significativas do modelo foram pH, concentração de enzima e tempo nos seus termos lineares ($X_1(L)$, $X_2(L)$ e $X_3(L)$) e as interação pH/tempo X_1X_3 . Com a eliminação dos parâmetros não significativos, obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Resultado da regressão múltipla com os parâmetros significativos.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,4215	0,0096	0
X ₁ (L)	0,1618	0,0113	0,00007
X ₂ (L)	0,0282	0,0113	0,04711
X ₃ (L)	0,1262	0,0113	0,00003
X ₁ X ₃	-0,0762	0,0113	0,00052

O modelo reduzido com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.4.

$$\text{Atividade} = 0,4215 + 0,1618 X_1 + 0,0282 X_2 + 0,1262 X_3 - 0,0762 X_1 X_3 \quad (4.4)$$

O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,98, o qual indica uma juste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica. A Figura 4.6 ilustra a representação dos valores preditos em função observados e a Figura 4.7 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

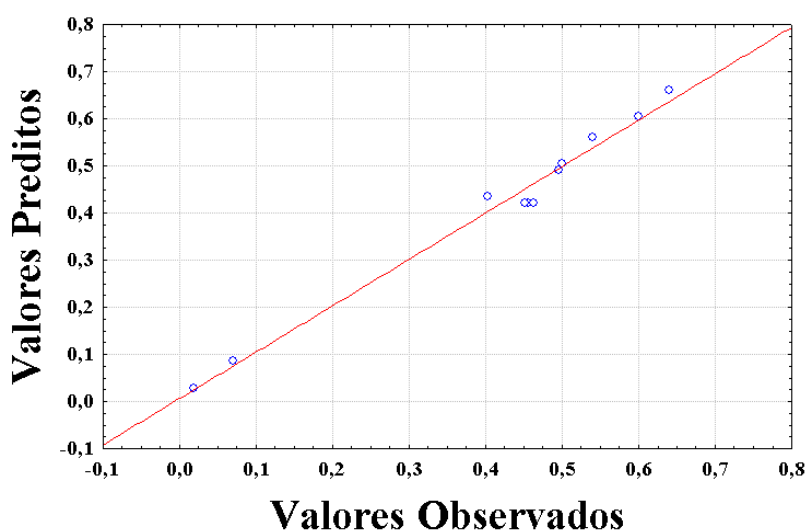


Figura 4.6 – Valores preditos em função dos valores observados.

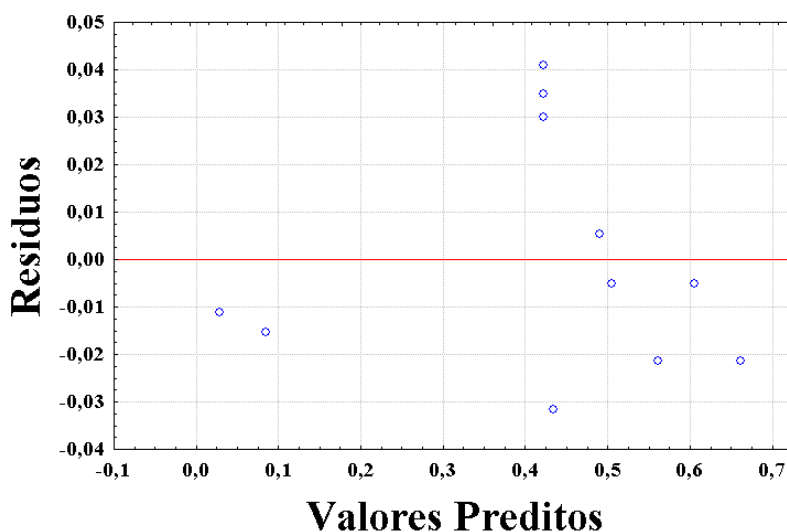


Figura 4.7 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Analisando a Figura 4.6, observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentam valores bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.7, nota-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do traçado no ponto zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. O modelo mostrou-se significativo, com isso construíram-se as superfícies de resposta, analisando-se de duas em duas, e definindo a melhor tendência de acordo com as maiores atividades. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10.

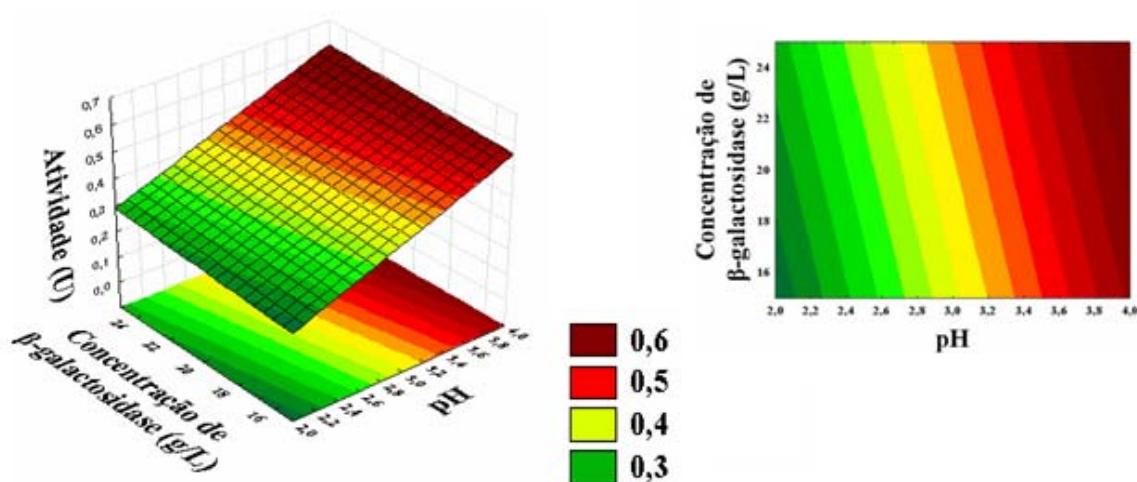


Figura 4.8 – Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e pH na atividade enzimática.

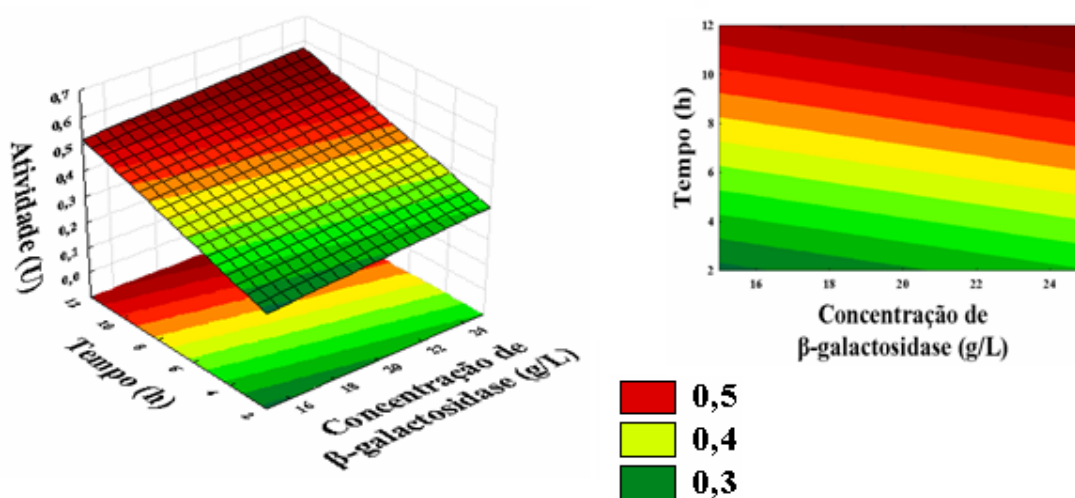


Figura 4.9 – Superfície de resposta da influência do tempo e concentração de enzima na atividade enzimática.

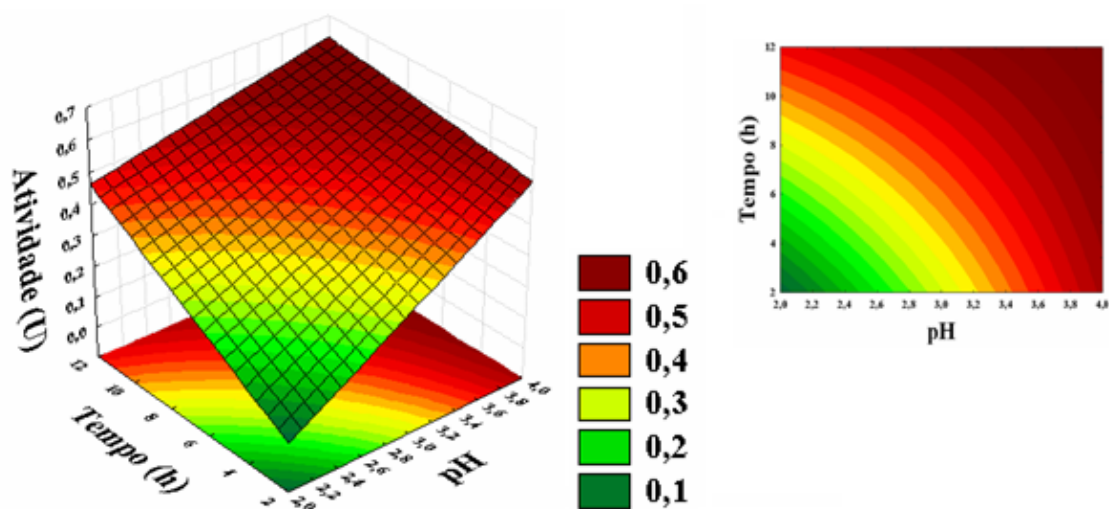


Figura 4.10 – Superfície de resposta da influência do tempo e pH na atividade enzimática

Considerando os resultados dos dois Planejamentos Fatoriais Completos (1) e (2) pode-se determinar as faixas de pH e concentração de enzima para serem otimizadas por um Planejamento Composto Central (PCC). As faixas definidas para este planejamento foram pH de 3,35 ($-\alpha$) a 5,65 (α) e concentração de enzima de 6,82 ($-\alpha$) a 25,18 g/L (α). Com as superfícies de resposta foi possível determinar um tempo fixo de 12 horas de imobilização para todo o trabalho subsequente. Este tempo foi definido por já estar na faixa ótima e por ter obtido boas atividades.

4.3 – Otimização do processo de imobilização

Visando otimizar o processo de imobilização de β -galactosidase em resina Duolite A-568, foram estudadas as influências conjuntas do pH (X_1) e concentração de enzima (X_2) por meio de um Planejamento Composto Central (PCC), conforme item 3.2.4.3. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central da imobilização.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	pH	Concentração de β -galactosidase (g/L)	Atividade (U*)
1	3,5 (-1)	8 (-1)	0,445
2	3,5 (-1)	24 (1)	0,524
3	5,5 (1)	8 (-1)	0,440
4	5,5 (1)	24 (1)	0,509
5	3,35 (- α)	16 (0)	0,410
6	5,65 (α)	16 (0)	0,416
7	4,5 (0)	6,82 (- α)	0,480
8	4,5 (0)	25,18 (α)	0,580
9	4,5 (0)	16 (0)	0,640
10	4,5 (0)	16 (0)	0,660
11	4,5 (0)	16 (0)	0,640

$$U^* = (\text{g glicose} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g resina})$$

Na Tabela 4.8 pode-se observar que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,410 U a 0,660 U. Verifica-se que os maiores valores encontrados foram na região do ponto central, experimentos 9, 10 e 11, onde estes experimentos correspondem a pH 4,5 e concentração de enzima 16 g/L. Para o experimento (5) de menor atividade enzimática, nota-se que a concentração de enzima foi de 16 g/L (0) e pH 3,35 (- α).

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.9 estão representados os termos lineares, termos quadráticos, interações das duas variáveis estudadas e suas respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6282	0,0257	0,000002
X ₁ (L)	-0,0021	0,0182	0,9118
X ₁ (Q)	-0,1321	0,0251	0,0033
X ₂ (L)	0,0396	0,0182	0,0809
X ₂ (Q)	-0,0436	0,0251	0,1432
X ₁ X ₂	-0,0027	0,0234	0,9142

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.5 completa com todos os parâmetros:

$$Atividade = 0,6282 - 0,0021X_1 - 0,1321X_1^2 + 0,0396X_2 - 0,0436X_2^2 - 0,0027X_1X_2 \quad (4.5)$$

Observa-se na Tabela 4.9 que as variáveis significativas do modelo foram: concentração de enzima em seu termo linear X₂ (L), o pH na sua forma quadrática X₁ (Q). A concentração de enzima X₂ (Q) (tornou-se um parâmetro significativo com a eliminação dos parâmetros não significativos X₁(L) e X₁X₂) conforme Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6282	0,0218	0
X ₁ (Q)	-0,1321	0,0212	0,0004
X ₂ (L)	0,0396	0,0154	0,0367
X ₂ (Q)	-0,0436	0,0213	0,0797

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.6.

$$Atividade = 0,6282 - 0,1321X_1^2 + 0,0396X_2 - 0,0436X_2^2 \quad (4.6)$$

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,88, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 88% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 4.11 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.12 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

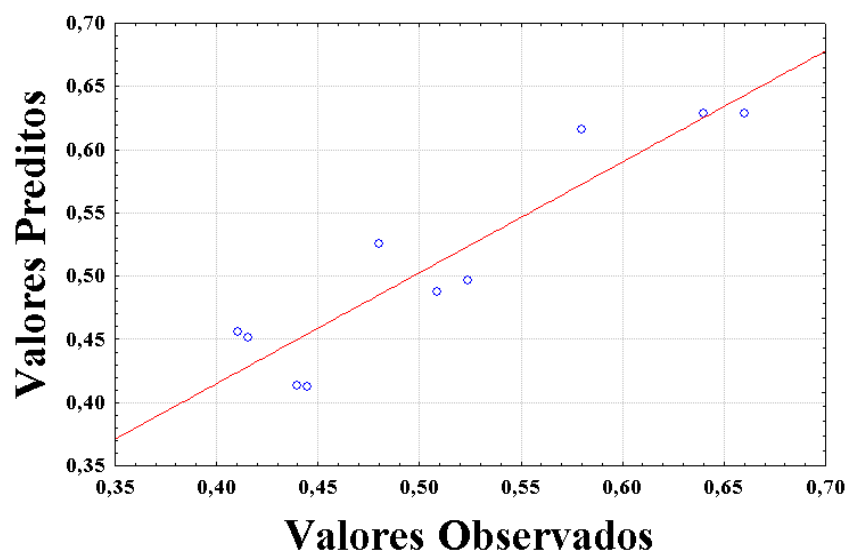


Figura 4.11 – Valores preditos em função dos valores observados.

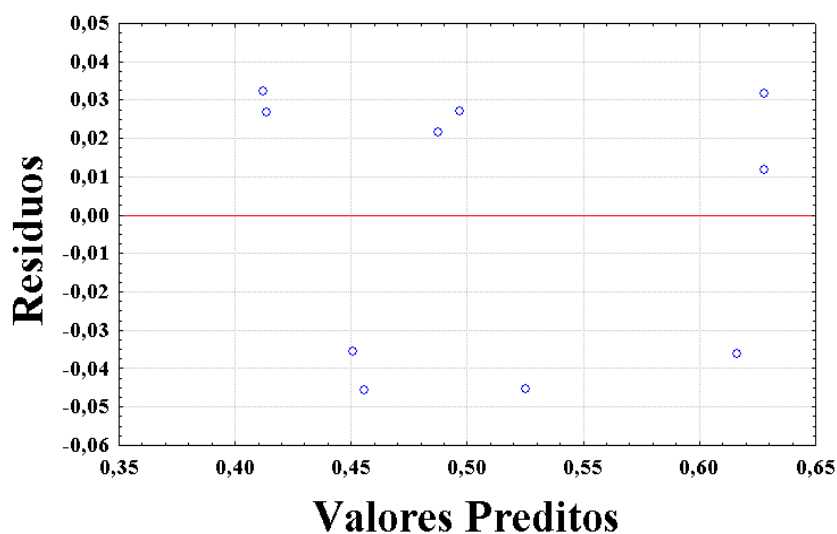


Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando a Figura 4.11, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.12, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto a distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta e otimizar os parâmetros estudados. A superfície de resposta está representada na Figura 4.13.

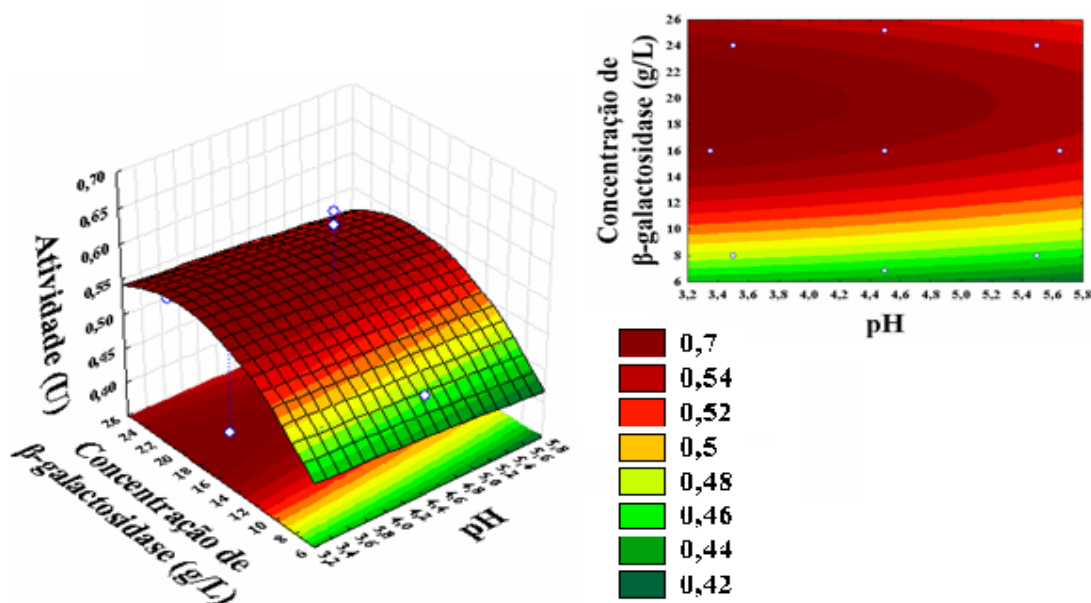


Figura 4.13 – Superfície de resposta da influência da concentração de β -galactosidase e pH na atividade enzimática na imobilização.

Com a equação completa (4.5), foi realizada uma implementação no programa *Maple 9.5* para calcular o ponto ótimo para imobilização da enzima, visando maximizar a atividade enzimática. Utilizando as equações de codificação 3.1 e 3.2, obtiveram-se os valores reais das variáveis estudadas com concentração de β -galactosidase igual a 19,7g/L e pH 4,5 o qual implicou na máxima atividade da enzima imobilizada de 0,637 U.

Para validar o modelo foram realizados dois experimentos, um na condição ótima dada pelo PCC e o outro dentro da região ótima, porém utilizando uma concentração de β -galactosidase igual a 16 g/L em pH 4,5, obtendo atividades respectivamente de 0,652 U e 0,643 U. Isso indica uma boa concordância entre estes valores experimentais e o calculado pelo modelo. O uso da concentração de 16 g/L que

se encontra na região ótima, produziu um biocatalisador com a mesma atividade do ponto ótimo, utilizando menor concentração de enzima na imobilização, o que é uma vantagem econômica.

Para todo trabalho subsequente de imobilização foi utilizado a concentração de β -galactosidase de 16 g/L, pH 4,5 e tempo de imobilização de 12 horas.

4.4 – Resultados dos testes preliminares do processo de ligação cruzada

Com a realização dos dois experimentos conforme item 3.2.4.4, pode-se notar (Tabela 4.11) que a atividade enzimática sofreu um declínio com o processo de ligação cruzada feito antes da imobilização. Já o experimento que foi feito com o processo de reticulação após a imobilização mostrou que a atividade permaneceu próxima a da imobilização sem processo de ligação cruzada.

Tabela 4.11 – Resultado preliminar para o processo de ligação cruzada.

Processo de ligação cruzada	Atividade (U*)
Imobilização sem ligação cruzada	0,649
Processo de ligação cruzada antes da imobilização	0,339
Processo de ligação cruzada depois da imobilização	0,604

$$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$$

4.5 – Otimização do processo de ligação cruzada

Na otimização do processo de ligação cruzada, no intuito de obter um biocatalisador com maior estabilidade em sua atividade, foi proposto um estudo da influência conjunta da concentração de glutaraldeído (X_1) e tempo (X_2) utilizando-se um Planejamento Composto Central (PCC), conforme item 3.2.4.4.1. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central do processo de ligação cruzada.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Concentração de Glutaraldeído (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U*)
1	1 (-1)	1 (-1)	0,460
2	1 (-1)	5 (1)	0,459
3	5 (1)	1 (-1)	0,680
4	5 (1)	5 (1)	0,466
5	0,71 (- α)	3 (0)	0,468
6	5,30 (α)	3 (0)	0,578
7	3 (0)	0,71 (- α)	0,624
8	3 (0)	5,30 (α)	0,516
9	3 (0)	3 (0)	0,672
10	3 (0)	3 (0)	0,656
11	3 (0)	3 (0)	0,666

$$U^* = (\text{g glicose} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g resina})$$

Observando a Tabela 4.12 pode-se notar que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,459 U a 0,680 U. Verifica-se que o maior valor encontrado foi no experimento 3, que corresponde a concentração de glutaraldeído de 5 g/L (+1) e tempo de 1 hora (-1) de processo de ligação cruzada. Nota-se que o tempo do processo de ligação cruzada não teve grande influência, o que é confirmado no experimento 2, no qual a menor atividade foi encontrada na concentração de glutaraldeído de 1 g/L (-1) e tempo de 5 horas (+1).

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.13 estão representados os termos lineares, os termos quadráticos, as interações das duas variáveis estudadas e as respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 4.13 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6567	0,0088	0
X ₁ (L)	0,0531	0,0063	0,0004
X ₁ (Q)	-0,0920	0,0087	0,0001
X ₂ (L)	-0,0510	0,0063	0,0005
X ₂ (Q)	-0,0564	0,0087	0,0013
X ₁ X ₂	-0,0531	0,0081	0,0012

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.7 completa com todos os parâmetros significativos:

$$Atividade = 0,6567 + 0,0531X_1 - 0,0920X_1^2 - 0,0510X_2 - 0,0564X_2^2 - 0,0531X_1X_2 \quad (4.7)$$

Observa-se na Tabela 4.13 que todas as variáveis do modelo foram significativas: a concentração de glutaraldeído e tempo tanto em seus termos lineares (X₁ (L) e X₂ (L)) quanto na sua forma quadrática (X₁ (Q) e X₂ (Q)), a interação concentração de glutaraldeído/ tempo (X₁X₂).

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% (p<0,1). O coeficiente de determinação R² foi de 0,98, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 4.14 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.15 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

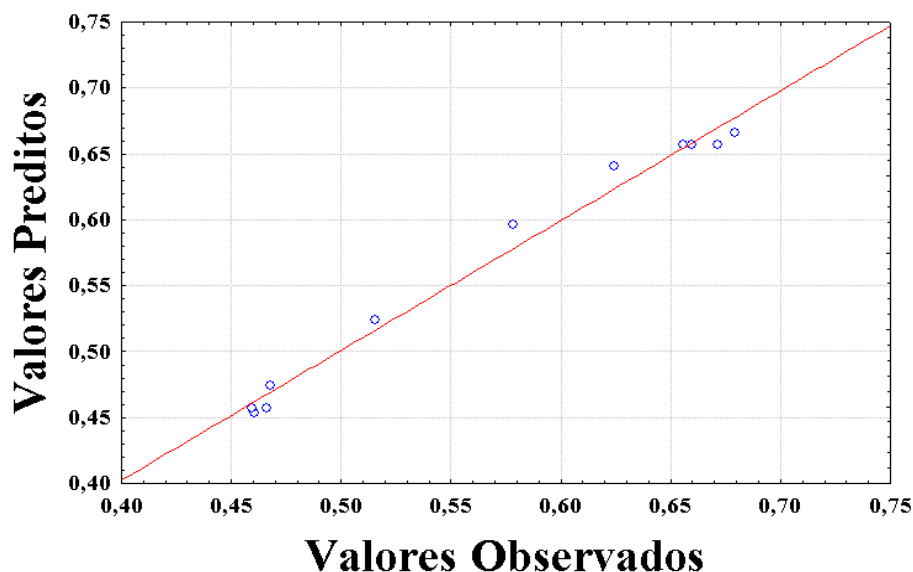


Figura 4.14 – Valores preditos em função dos valores observados.

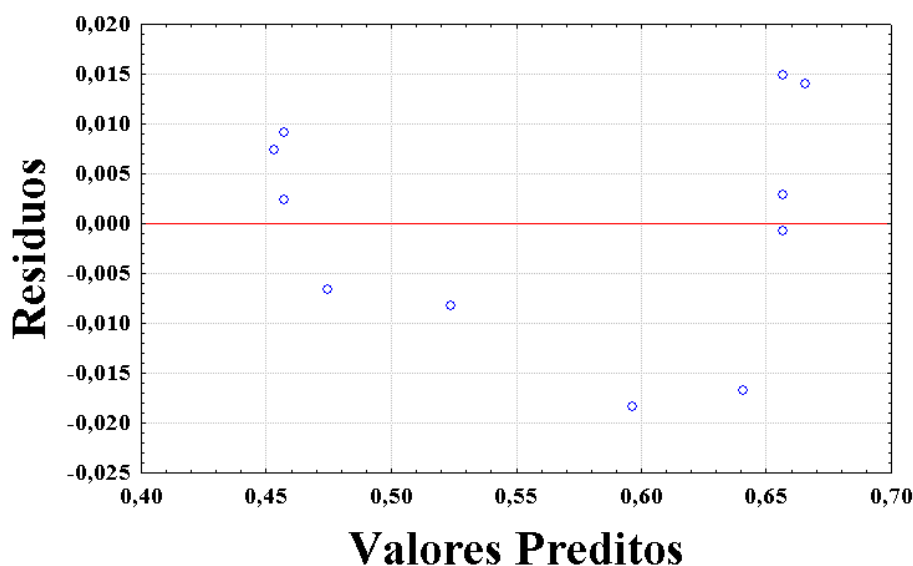


Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando a Figura 4.14, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.15, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta e otimizar os parâmetros estudados no processo de ligação cruzada. A superfície de resposta está representada na Figura 4.16

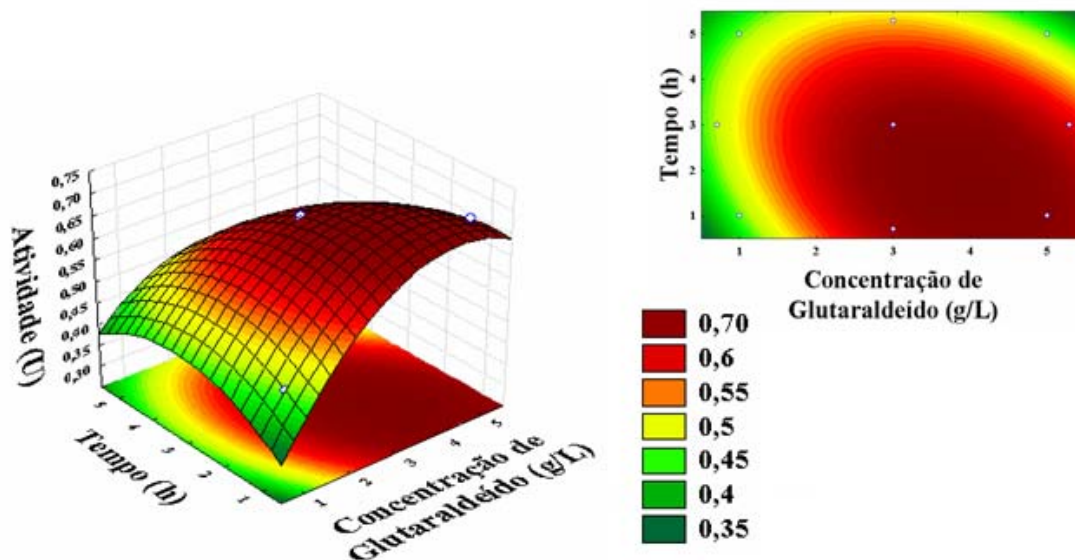


Figura 4.16 – Superfície de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e tempo na atividade enzimática do processo de ligação cruzada.

Com a Equação completa (4.7), foi realizada uma implementação no programa *Maple 9.5* para calcular o ponto ótimo do processo de ligação cruzada, visando maximizar a atividade enzimática. Utilizando as equações de codificação 3.3 e 3.4, obtiveram-se os valores reais das variáveis estudadas para a maximização da atividade, com concentração de glutaraldeído de 3,83 g/L e tempo de 1,87 horas, alcançando uma atividade de 0,66 U. O processo de ligação cruzada não implicou em redução da atividade inicial da enzima imobilizada.

Para validar o modelo, foram realizados dois experimentos. O primeiro na condição ótima dada pelo PCC e o outro em um ponto dentro da região ótima de concentração de glutaraldeído de 3,5 g/L e tempo 1,50 horas, obtendo-se as atividades experimentais respectivamente de 0,64 U e 0,66 U. Isto indica uma boa concordância entre o valor experimental e o calculado, utilizando-se assim a menor concentração de glutaraldeído e tempo no ligação cruzada, o que é uma vantagem econômica. A metodologia usada esta de acordo com o trabalho de LETCA (2004), o que sugere o uso de glutaraldeído para a resina Duolite A-568 como um ligante entre enzima e suporte.

Para todo trabalho subsequente de imobilização com posterior processo de ligação cruzada foi utilizado a concentração de glutaraldeído de 3,5 g/L e tempo de 1,5 horas.

4.6 – Estabilidade da enzima imobilizada em relação ao número de usos

As duas amostras de β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568, conforme item 3.2.4.5, foram analisadas quanto a estabilidade em relação ao número de usos e estão representadas na Figura 4.17.

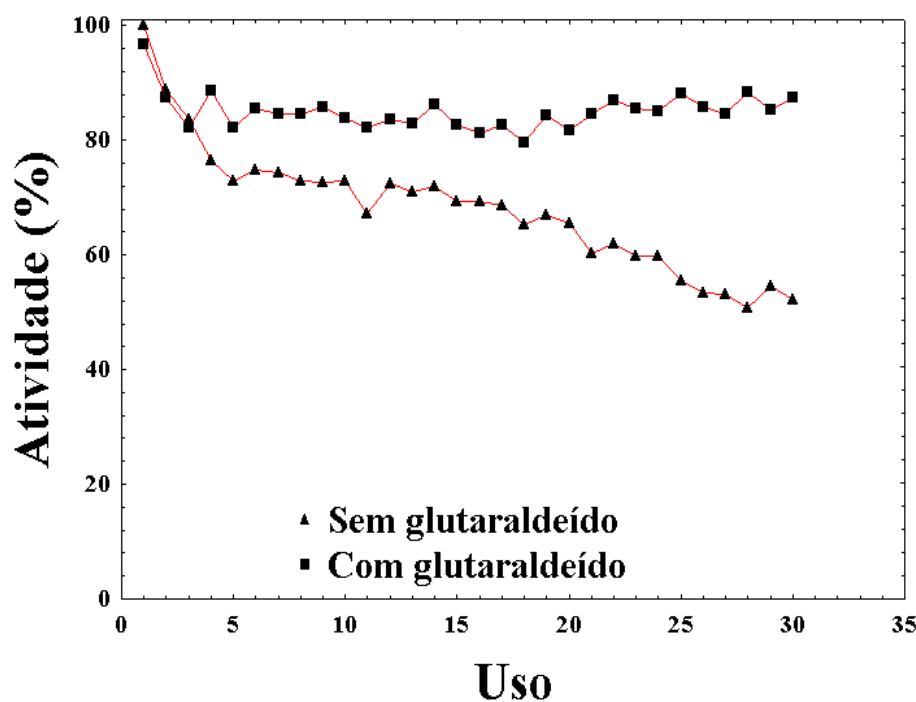


Figura 4.17 – Estabilidade da enzima imobilizada após 30 usos com e sem a adição de glutaraldeído.

A atividade da enzima imobilizada, sem o tratamento com glutaraldeído após 30 usos foi de 51% em relação à inicial, ao passo que aquela da enzima imobilizada com reticulação foi de 90% da inicial, como pode ser observado na Figura 4.17. Esses resultados indicam que o tratamento com glutaraldeído foi eficaz na manutenção da estabilidade da enzima imobilizada. Os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos de OOSTEROM (1998), LETCA (2004) e HAIDER e HUSAIN (2007), que observaram uma maior estabilidade com o processo de ligação cruzada, podendo reutilizar as enzimas imobilizadas com uma maior eficiência.

4.7 – Influência na estabilidade da enzima imobilizada com e sem o processo de ligação cruzada em relação ao pH

O pH do meio reacional exerce grande influência na estabilidade catalítica da maioria das enzimas. A influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada sem o processo de ligação cruzada com o glutaraldeído está apresentada na Figura 4.18. Observa-se que dentro da faixa de pH estudada de 1 à 8, a enzima foi estável em uma estreita faixa de pH de 4 à 5, que coincide com a estabilidade da enzima livre, conforme recomendação do fabricante e citação na literatura TANRISEVEN e DOGAN (2002), HAIDER e HUSAIN (2007) e FREITAS et al., (2007). Pode também observar que de pH 5 a 1 houve uma queda acentuada na atividade enzimática residual de 56,42% e de pH 5 a 8 a queda foi de 13,46 %.

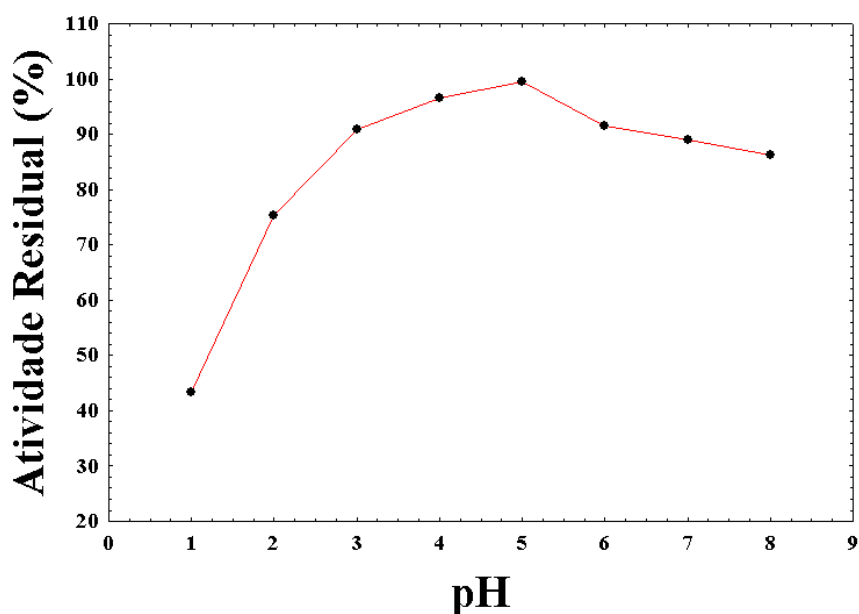


Figura 4.18 – Influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada sem o processo de ligação cruzada.

Para os resultados da influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada com o processo de ligação cruzada com glutaraldeído é observada uma maior estabilidade, conforme mostrado na Figura 4.19. A atividade enzimática residual foi da ordem de 100% para a faixa de pH de 2 a 7. Este biocatalisador imobilizado pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH, para diferentes produtos, tanto soro como leite.

Pode-se verificar que na faixa de pH 4,5 a 1 houve uma queda na atividade enzimática de 9,12% e para faixa de pH 4,5 a 8 foi de 5,36%, o que mostrou que o tratamento com glutaraldeído foi eficaz na manutenção da estabilidade da enzima em relação a diferentes valores de pH, quando comparado com os resultados sem o referido tratamento. Os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos de OOSTEROM (1998), LETCA (2004) e HAIDER e HUSAIN (2007), que observaram uma maior estabilidade da enzima *Escherichia coli* e β -galactosidase, após o tratamento do suporte com glutaraldeído.

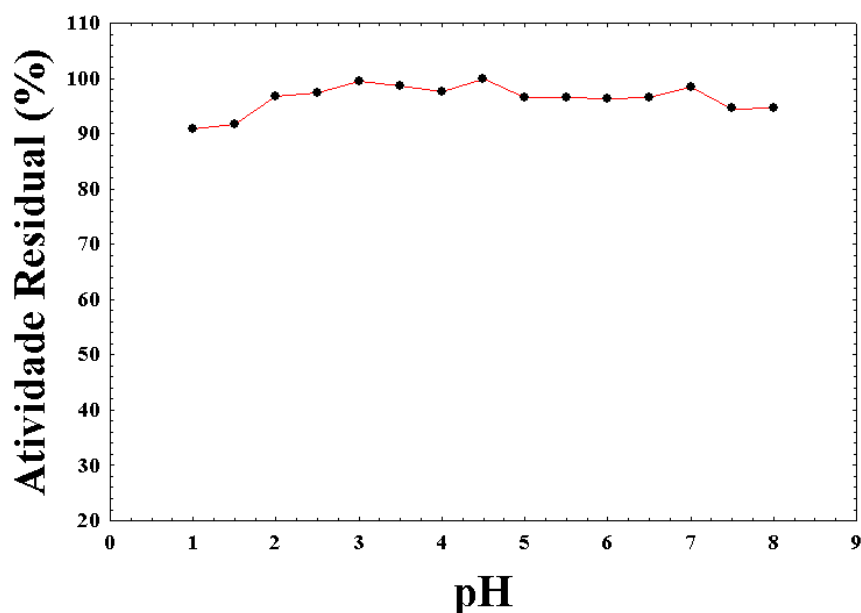


Figura 4.19 – Influência do pH na estabilidade de β -galactosidase imobilizada com o processo de ligação cruzada.

4.8 – Otimização da influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada com ligação cruzada em duolite A-568

Um Planejamento Composto Central (PCC) foi proposto para o estudo da influência conjunta da temperatura (X_1) e pH (X_2) no meio reacional que resultaria em maior atividade enzimática. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central da influência conjunta do pH e temperatura.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Temperatura (°C)	pH	Atividade (U*)
1	30 (-1)	2,3 (-1)	0,530
2	30 (-1)	6,7 (1)	0,172
3	58 (1)	2,3 (-1)	0,048
4	58 (1)	6,7 (1)	0,407
5	28 (- α)	4,5 (0)	0,565
6	60 (α)	4,5 (0)	0,498
7	40 (0)	1,98 (- α)	0,440
8	40 (0)	7,02 (α)	0,221
9	40 (0)	4,5 (0)	0,647
10	40 (0)	4,5 (0)	0,642
11	40 (0)	4,5 (0)	0,668

$$U^* = (\text{g glicose} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g resina})$$

Nota-se na Tabela 4.14 que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,048 a 0,668 U. Verifica-se que os maiores valores encontrados foram nos experimentos 9, 10 e 11 (ponto central), que correspondem a temperatura de 40°C (0) e pH de 4,5 (0). O menor valor encontrado de atividade enzimática foi no experimento 3 com 0,048 U sendo a temperatura de 58°C (1) e pH de 2,3 (-1).

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.15 estão representados os termos lineares, quadráticos, as interações das duas variáveis estudadas, bem como, as respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 4.15 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6507	0,0199	0,000001
X ₁ (L)	-0,0492	0,0131	0,01316
X ₁ (Q)	-0,0989	0,0199	0,00424
X ₂ (L)	-0,0168	0,0132	0,25987
X ₂ (Q)	-0,2561	0,0181	0,00003
X ₁ X ₂	0,1841	0,0166	0,00010

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.8 completa com todos os parâmetros:

$$Atividade = 0,6507 - 0,0492X_1 - 0,0989X_1^2 - 0,0168X_2 - 0,2561X_2^2 + 0,1841X_1X_2 \quad (4.8)$$

Na Tabela 4.15 verifica-se que as variáveis significativas do modelo foram: a temperatura em seu termo linear X₁ (L), temperatura e o pH em sua forma quadrática (X₁ (Q) e X₂ (Q)) e a interação temperatura/pH (X₁X₂). Com a eliminação do parâmetro não significativo (pH (L)), obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,6507	0,0209	0
X ₁ (L)	-0,0492	0,0137	0,01160
X ₁ (Q)	-0,0986	0,0209	0,00320
X ₂ (Q)	-0,2561	0,0190	0,00001
X ₁ X ₂	0,1871	0,0172	0,00004

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.9.

$$Atividade = 0,6507 - 0,0492X_1 - 0,0986X_1^2 - 0,2561X_2^2 + 0,1871X_1X_2 \quad (4.9)$$

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,98, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 4.20 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.21 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

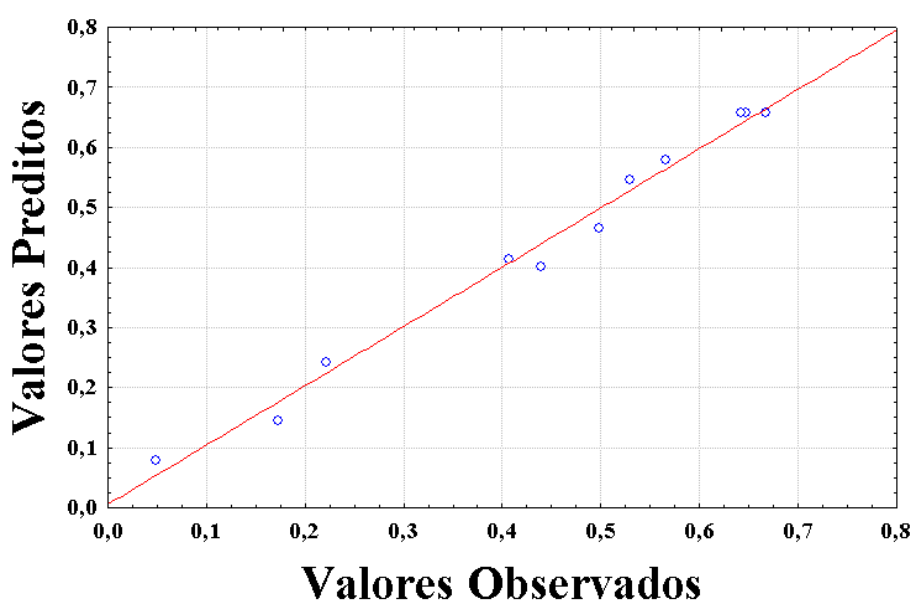


Figura 4.20 – Valores preditos em função dos valores observados.

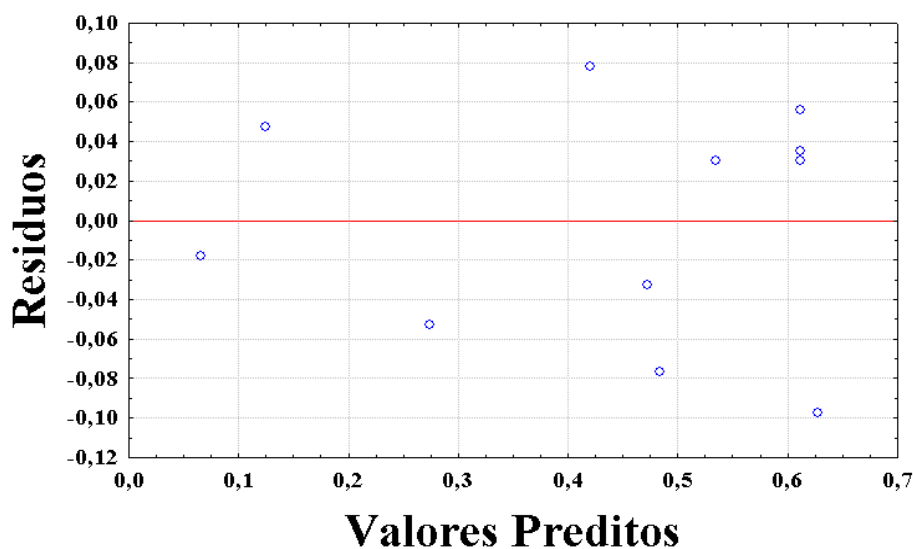


Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando a Figura 4.20, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.21, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta e otimizar os parâmetros estudados para verificar a influência do pH e da temperatura no meio reacional. A superfície de resposta está representada na Figura 4.22.

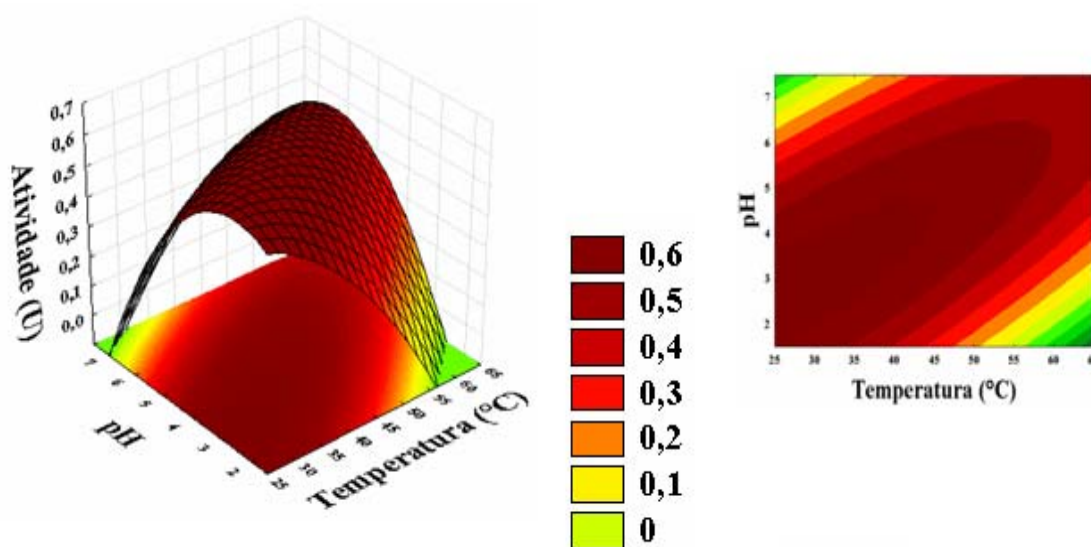


Figura 4.22 - Superfície de resposta da influência do pH e temperatura da reação na atividade enzimática.

A partir da Equação completa (4.8), foi realizada uma implementação no programa *Maple 9.5* para calcular o ponto ótimo da influência da temperatura e pH no meio reacional, visando maximizar a atividade enzimática. Utilizando as equações de codificação 3.5 e 3.6, obtiveram-se os valores reais das variáveis estudadas para a maximização da atividade, com temperatura de 34°C e pH de 4,1, alcançando uma atividade de 0,663 U. Este valor encontra-se bem próximo dos resultados experimentais obtidos no ponto central. Este fato já era esperado porque a condição central encontra-se dentro da região de otimização. Decidiu-se continuar usando o pH de 4,5 e temperatura de 35°C, pelo fato da temperatura ser praticamente igual a da otimização e não haver possibilidade de baixas atividade em função de se utilizar um pH de 4,1. As faixas de

temperatura e pH ótimo aqui citadas estão de acordo com trabalhos da literatura de TANRISEVEN e DOGAN (2002), HUSAIN e HAIDER (2007).

4.9 – Influência da concentração de lactose na cinética de β -galactosidase imobilizada

Os resultados experimentais das velocidades iniciais de reação de hidrólise da lactose (S) para a enzima β -galactosidase imobilizada, em função da concentração inicial de substrato e na ausência de produtos da reação, estão apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração inicial de lactose (S).

Experimentos	Concentração inicial de lactose (g/L)	Atividade (U*)
1	5	0,1602
2	20	0,4146
3	35	0,5956
4	50	0,6470
5	65	0,6454
6	80	0,6406
7	95	0,6302
8	110	0,6168
9	125	0,6302
10	140	0,6320

$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$

Verifica-se na Tabela 4.17 que após o experimento 4, em que iniciou-se a reação com concentração de 50 g/L de lactose, não houve acréscimo na atividade,

mantendo-se constante conforme Figura 4.23. Posteriormente, foi realizado uma regressão não linear pelo *software Statistica 7.0*, utilizando o método numérico Levenberg-Marquardt, com o qual estimaram-se os valores das constantes V_m e K_m que foram respectivamente 0,71 U e 12,07 g/L (35,30 mM), os dois parâmetros mostraram-se significativos ao nível de 5% (valor- $p < 0,05$).

Na Figura 4.23, observa-se boa aproximação dos pontos experimentais com o ajustado pelo modelo de Michaelis-Menten, em que foi obtido um coeficiente de determinação de 98%.

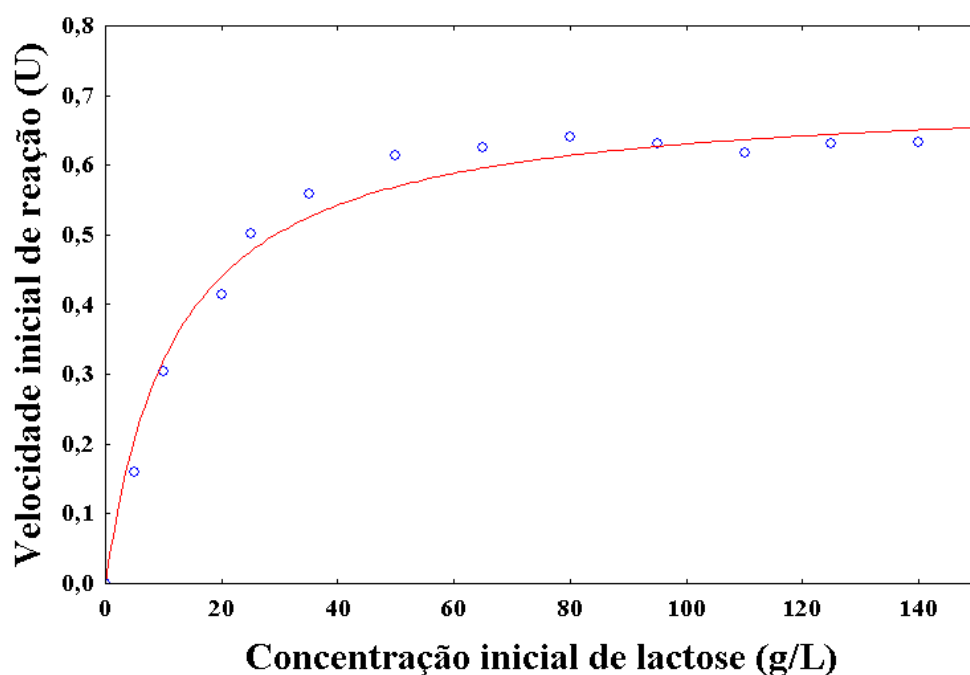


Figura 4.23 – Influência da concentração de lactose (S) na velocidade inicial da reação da enzima β -galactosidase imobilizada.

Neste intervalo de estudo não teve inibição pelo substrato. A Equação final de Michaelis-Menten está representada na Equação 4.10.

$$v = \frac{0,71 \cdot S}{12,07 + S} \quad (4.10)$$

A Figura 4.24 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados.

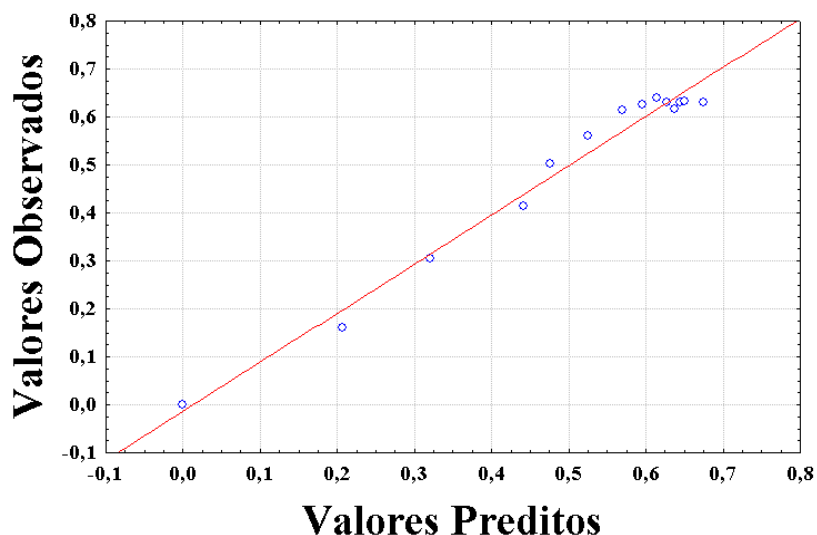


Figura 4.24 – Valores preditos em função dos valores observados.

Observando a Figura 4.24, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica.

O valor de K_m encontrado neste trabalho foi de 35,30 mM. Este valor está próximo com trabalhos da literatura como de FREITAS et al., (2007) que imobilizaram β -galactosidase em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído e obtiveram valor de K_m igual a 46,78 mM.

4.10 – Influência da concentração dos produtos glicose e galactose na cinética da reação da enzima imobilizada

Os experimentos do Planejamento Composto Central proposto neste estudo foram realizados nas condições conforme item 3.2.4.9. Este estudo teve por objetivo analisar qualitativamente quais produtos de reação comportavam-se como inibidores da reação enzimática. Os resultados experimentais de velocidade de reação da hidrólise da lactose estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Atividade enzimáticas em presença de glicose, galactose e lactose.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			Atividade (U*)
	Lactose (g/L)	Glicose (g/L)	Galactose (g/L)	
1	15 (-1)	3 (-1)	3 (-1)	0,37
2	15 (-1)	3 (-1)	20 (1)	0,19
3	15 (-1)	20 (1)	3 (-1)	0,76
4	15 (-1)	20 (1)	20 (1)	0,48
5	50 (1)	3 (-1)	3 (-1)	1,00
6	50 (1)	3 (-1)	20 (1)	0,23
7	50 (1)	20 (1)	3 (-1)	1,17
8	50 (1)	20 (1)	20 (1)	0,79
9	8,82 (- α)	11,5 (0)	11,5 (0)	0,31
10	56,18 (α)	11,5 (0)	11,5 (0)	0,65
11	32,5 (0)	0 (- α)	11,5 (0)	0,3
12	32,5 (0)	23 (α)	11,5 (0)	0,83
13	32,5 (0)	11,5 (0)	0 (- α)	1,05
14	32,5 (0)	11,5 (0)	23 (α)	0,73
15	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)	0,78
16	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)	0,70
17	32,5 (0)	11,5 (0)	11,5 (0)	0,75

$$U^* = (\text{g}_{\text{glicose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}})$$

Observa-se na Tabela 4.18 que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,19 a 1,17 U. Verifica-se que os maiores valores encontrados foram nos experimentos 5, 7 e 13, sendo que os experimentos 5 e 7 correspondem a concentração de lactose no nível (+1) com 50g/L e galactose no nível (-1) com 3 g/L. O experimento 13 corresponde a lactose e glicose no nível 0 com 32,5 g/L e 11,5 g/L, respectivamente, sendo o nível (- α) para a concentração de galactose.

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.19 estão representados os termos lineares, os termos quadráticos, as interações das três variáveis estudadas e as respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 4.19 – Resultados da regressão múltipla de todos os parâmetros.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,7309	0,0480	0,000001
X ₁ (L)	0,1586	0,0270	0,0006
X ₁ (Q)	-0,1283	0,0357	0,0088
X ₂ (L)	0,1824	0,0271	0,0003
X ₂ (Q)	-0,0818	0,0357	0,0557
X ₃ (L)	-0,1752	0,0271	0,0003
X ₃ (Q)	0,0956	0,0357	0,0316
X ₁ X ₂	0,0063	0,0327	0,8538
X ₁ X ₃	-0,0863	0,0327	0,0335
X ₂ X ₃	0,0363	0,0327	0,3040

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.11 completa com todos os parâmetros:

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,7309 + 0,1586X_1 - 0,1283X_1^2 + 0,1824X_2 - 0,0818X_2^2 \\
 & - 0,1752X_3 + 0,0956X_3^2 + 0,0063X_1X_2 - 0,0863X_1X_3 + 0,0363X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{4.11}$$

Na Tabela 4.20 verifica-se que as variáveis significativas do modelo foram: a lactose, glicose e galactose em seus termos lineares (X₁ (L), X₂ (L) e X₃ (L)), lactose, glicose e galactose em sua forma quadrática (X₁ (Q), X₂ (Q) e X₃ (Q)) e a interação lactose/galactose (X₁X₃). Posterior à retirada dos termos não significativos, os parâmetros significativos estão apresentados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,7309	0,0460	0
X ₁ (L)	0,1586	0,0259	0,0002
X ₁ (Q)	-0,1283	0,0342	0,0046
X ₂ (L)	0,1824	0,0259	0,0001
X ₂ (Q)	-0,0818	0,0342	0,0405
X ₃ (L)	-0,1752	0,0260	0,0001
X ₃ (Q)	0,0956	0,0342	0,0209
X ₁ X ₃	-0,0863	0,0313	0,0224

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.12.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 0,7309 + 0,1586X_1 - 0,1283X_1^2 + 0,1824X_2 - 0,0818X_2^2 \\
 & - 0,1752X_3 + 0,0956X_3^2 - 0,0863X_1X_3
 \end{aligned}
 \tag{4.12}$$

Os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$) foram considerados significativos. O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,95, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. A Figura 4.25 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.26 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

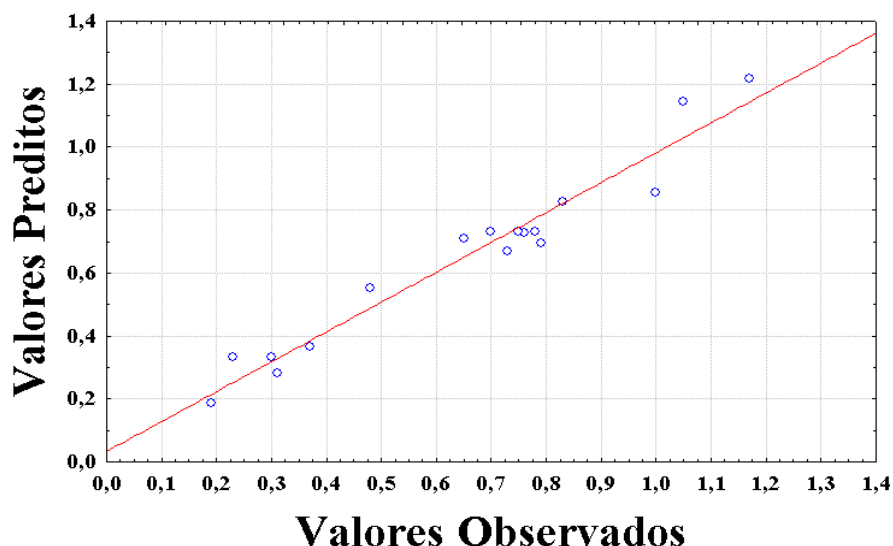


Figura 4.25 – Valores preditos em função dos valores observados.

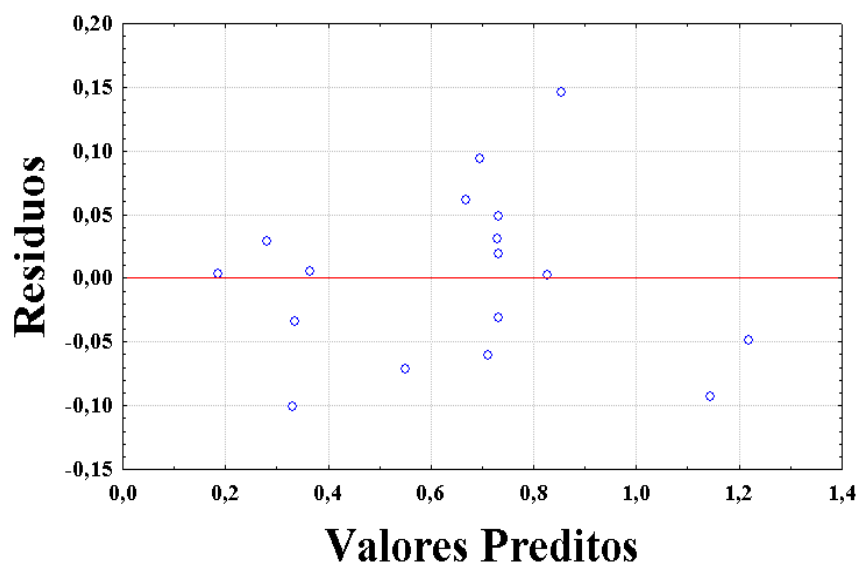


Figura 4.26 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando a Figura 4.25, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.26, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta, duas a duas variáveis, e suas respectivas superfícies de contorno como mostram Figuras 4.27, 4.28 e 4.29.

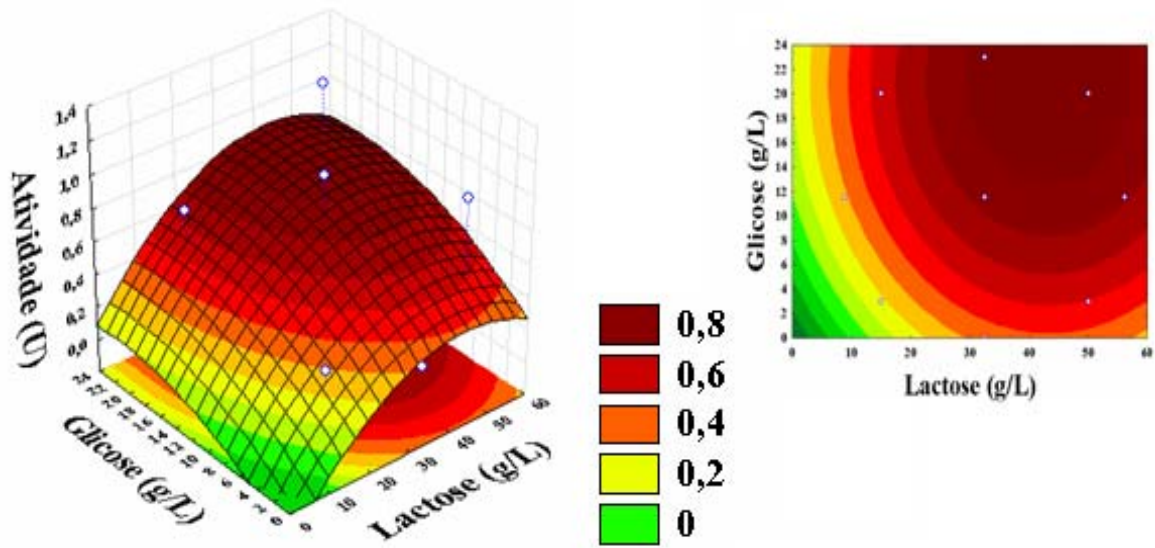


Figura 4.27 - Superfície de resposta da influência da lactose e glicose na atividade enzimática.

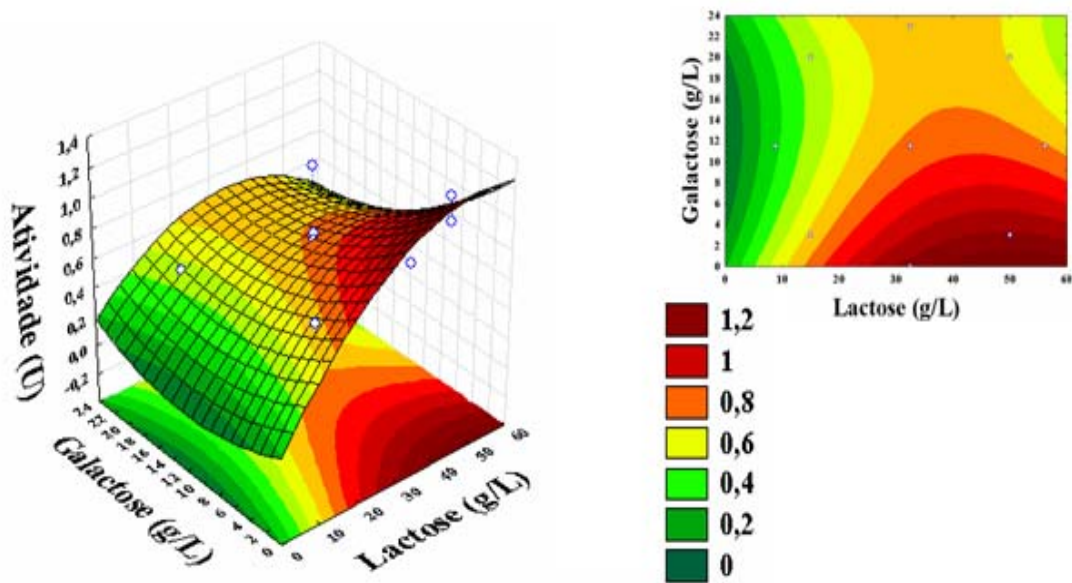


Figura 4.28 - Superfície de resposta da influência da lactose e galactose na atividade enzimática.

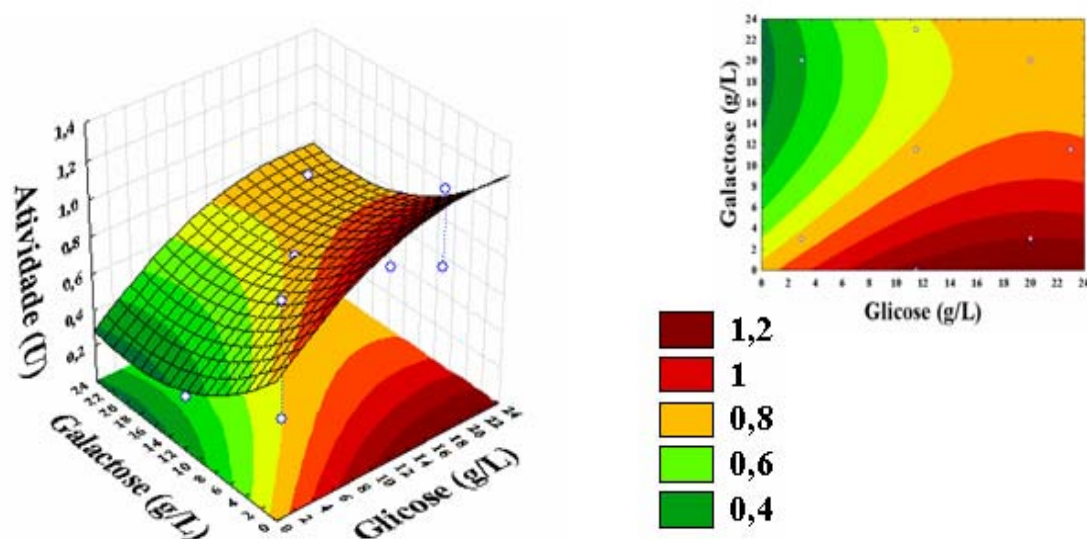


Figura 4.29 - Superfície de resposta da influência da galactose e glicose na atividade enzimática.

Observa-se nas Figuras 4.27 e 4.28 que os altos níveis de lactose se encontram na região de maior atividade, o que já era mostrado em experimentos anteriores que a maior atividade ocorria em concentração de lactose de 50 g/L, conforme item 4.8 (mostra que a concentração de 50 g/L não atingiu a faixa de inibição pelo substrato). Na Figura 4.27 pode-se notar que a glicose não interferiu na atividade máxima (concentração de lactose de 50 g/L).

Nas Figuras 4.28 e 4.29 pode-se observar que a concentração da galactose está agindo como um inibidor, na medida em que se aumenta a concentração de galactose diminui-se a atividade enzimática. Esta característica é notada tanto para a superfície galactose/lactose quanto para a superfície galactose/glicose. Nos trabalhos de JURADO et al., (2002 e 2004) utilizaram β -galactosidase *Kluyveromyces fragilis*, HATZINIKOLAOU et al., (2005) utilizaram β -galactosidase de *Aspergillus niger* e FREITAS et al., (2007) utilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na hidrólise da lactose e obtiveram como inibidor competitivo a galactose.

4.11 – Influência da concentração de galactose na atividade da enzima imobilizada

Com a análise dos resultados do item 4.9 da influência dos produtos da reação na atividade enzimática, pode-se concluir que a galactose teve um efeito significativo de

inibição sobre a atividade de β -galactosidase, o que não ocorreu com a glicose que mostrou um suposto efeito de ativação, portanto neste estudo será analisada apenas a influência da concentração de galactose na atividade da enzima.

As condições de realização dos experimentos seguiram o item 3.2.4.10 e os resultados experimentais de velocidade de reação em presença de galactose estão apresentados na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 – Resultados experimentais de velocidade de reação em função das concentrações iniciais de lactose (S) e galactose (I) no meio reacional.

Experimentos	(S) (g/L)	(I) (g/L)	Atividade (U*)	Experimentos	(S) (g/L)	(I) (g/L)	Atividade (U*)
1	5	0	0,1166	15	30	15	0,2772
2	5	7,5	0,0702	16	30	22,5	0,2312
3	5	15	0,066	17	40	0,	0,5804
4	5	22,5	0,0634	18	40	7,5	0,444
5	10	0	0,2818	19	40	15	0,3584
6	10	7,5	0,1656	20	40	22,5	0,2702
7	10	15	0,1194	21	50	0	0,6912
8	10	22,5	0,1012	22	50	7,5	0,4794
9	20	0	0,4226	23	50	15	0,4268
10	20	7,5	0,2776	24	50	22,5	0,3694
11	20	15	0,186	25	60	0	0,6668
12	20	22,5	0,1624	26	60	7,5	0,5306
13	30	0	0,5788	27	60	15	0,4588
14	30	7,5	0,315	28	60	22,5	0,4136

Os resultados da Tabela 4.21 foram ajustados por uma regressão não-linear, realizados pelo *software Statistica 7.0*. Foi usado o método de Levenberg-Marquardt, nos modelos cinéticos de Inibição Competitiva (Equação 3.10), Inibição Não

Competitiva (Equação 3.11), Inibição Acompetitiva (Equação 3.12), Inibição Mista Linear (Equação 3.13) e Inibição Parcialmente Não Competitiva (Equação 3.14). Na Tabela 4.22 estão apresentados os parâmetros ajustados com as respectivas análises de *t-Student*, os coeficientes de determinação e o somatório dos quadrados dos desvios, para o efeito de inibição dado pela galactose.

Tabela 4.22 – Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de galactose como inibidor.

Modelos de inibição		V_m (U _l)	K_m (g/L)	K_i (g/L)	α	β	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	R^2
I = Galactose								
Competitiva	Parâmetros	0,77	12,07	4,94	-	-	0,0436	98%
	Nível-p	0	0	0	-	-		
Não Competitiva	Parâmetros	0,76	12,07	20,66	-	-	0,1229	93%
	Nível-p	0	0	0	-	-		
Acompetitiva	Parâmetros	0,73	12,07	17,09	-	-	0,1882	89%
	Nível-p	0	0	0,0003	-	-		
Mista Linear	Parâmetros	1	12,07	-7318316	23421	-	0,3911	76%
	Nível-p	0	0	0	0	-		
Parcialmente Não Competitiva	Parâmetros	1	12,07	1848874	-	-43066	0,1446	92%
	Nível-p	0	0	0	-	0		

Com base nos resultados da Tabela 4.22, os parâmetros com nível de significância menores que 5% na análise *t-Student* foram considerados significativos. Para a escolha do melhor modelo de inibição, levaram-se em consideração os significados físicos e estatísticos dos parâmetros, o maior valor do coeficiente de determinação R^2 e o menor valor de soma de quadrados de resíduos.

Analisando o modelo de inibição mista linear, verifica-se que o parâmetro α apresentou valor muito alto (23421), substituindo este valor na Equação 3.13 o termo $(I/\alpha.K_i)$ tende a zero, transformando-se na Equação 3.10 do modelo de inibição competitiva e ainda o parâmetro K_i não apresenta significado físico. Com isto, eliminou-se este tipo de inibição como o ajuste ideal para a modelagem de inibição pela galactose.

Para o modelo parcialmente não competitivo, observa-se a não significância física do parâmetro β .

Os modelos de inibição incompetitivo e não competitivo, apesar de apresentar significância física e estatística, foram eliminados da escolha de melhor ajuste de

inibição por apresentarem valores maiores das somas dos quadrados dos resíduos e valores de R^2 menores que a inibição competitiva.

Portanto, pela análise dos coeficientes de determinação, pelos valores das somas dos quadrados dos desvios, pela significância dos parâmetros pela análise *t-Student* e pelo significado físico dos mesmos, o modelo que melhor se ajustou foi o de inibição competitiva pela galactose. O ajuste do modelo de inibição competitiva (Equação 3.10) pela galactose está apresentado na Figura 4.30, na forma de superfície de resposta. Na Figura 4.31 nota-se que os valores observados experimentalmente estão próximos aos preditos pelos modelos.

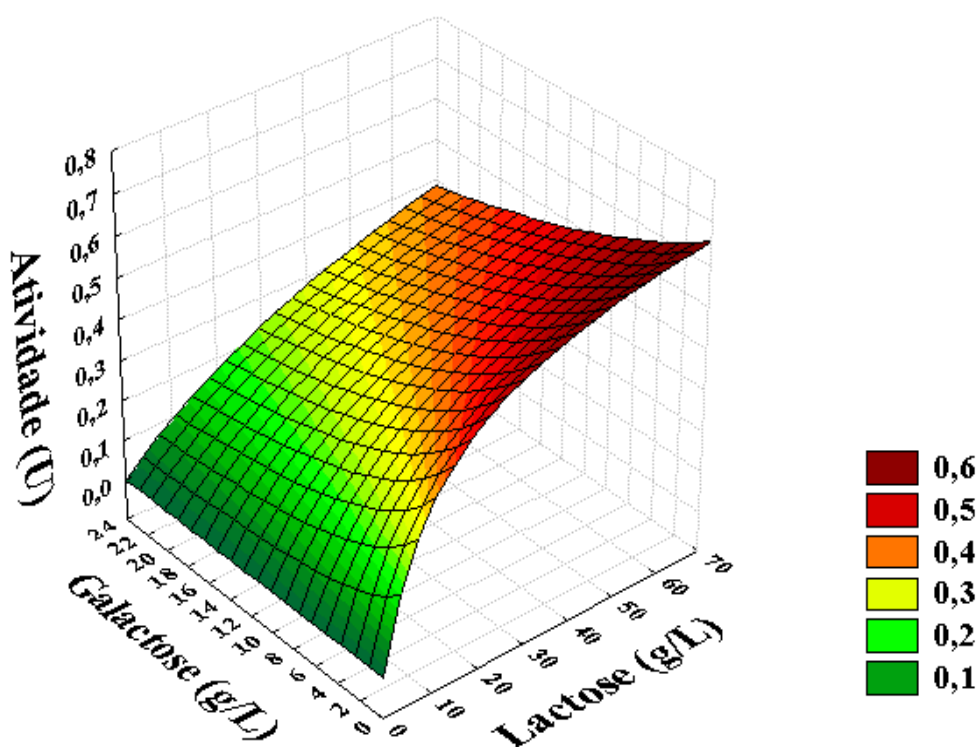


Figura 4.30 – Perfil da influência da concentração de galactose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.

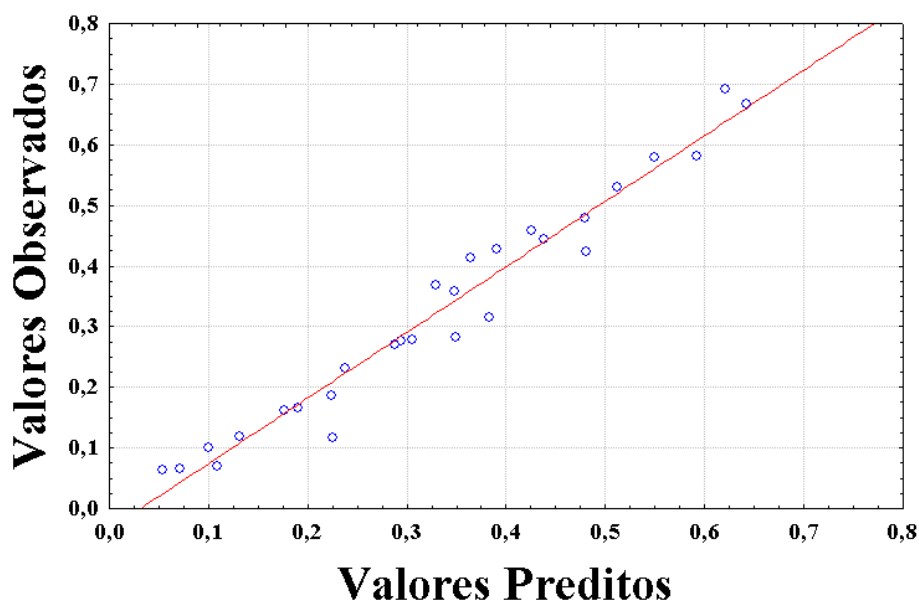


Figura 4.31 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta da atividade enzimática.

A Equação 4.13 ilustra o modelo de inibição competitiva com os valores dos parâmetros obtidos.

$$v = \frac{(0,77.S)}{(S + 12,07.(1 + (I/4,94)))} \quad (4.13)$$

Os valores de K_m e K_i obtidos neste trabalho foram 35,30 mM (12,07 g/L) e 27,44 mM (4,94 g/L) respectivamente. Em outros trabalhos da literatura foram encontradas inibições pela galactose, PORTACCIO et al., (1998) utilizaram a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de quitosana e membrana de nylon. No trabalho destes pesquisadores, foram encontrados os valores de K_m de 110 e 150 mM e K_i de 5 e 30mM, para a enzima imobilizada em membrana e quitosana respectivamente, utilizando leite como substrato. No trabalho de NAKKHARAT e HALTRICH (2006) a enzima β -galactosidase de *Talaromyces thermophilus* foi imobilizada em um suporte insolúvel (Eupergit C) por ligação covalente. Quando o substrato utilizado foi ONPG, observou-se a inibição tanto pela glicose quanto pela galactose. Já quando o substrato utilizado foi a lactose, a inibição ocorreu apenas pela galactose em que os valores de K_m e K_i foram 21 e 355 mM, respectivamente. Verifica-se que o alto valor para K_i faz com que a galactose seja um fraco inibidor. FREITAS et

al., imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído e encontraram valores de K_m e K_i de 46,78 e 53,33 mM.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir:

- A resina que apresentou melhor resultado na imobilização de β -galactosidase por adsorção iônica foi a Duolite A-568;
- As condições ótimas para o processo de imobilização foram: tempo de 12 horas, pH 4,5 e concentração de enzima do meio de 16 g/L atingindo uma atividade de 0,64 U;
- O processo de ligação cruzada apresentou melhor atividade quando realizado após a imobilização;
- Para a otimização do processo de ligação cruzada, usando o glutaraldeído como agente reticulante, as condições ótimas de reação foram concentração de glutaraldeído 3,5 g/L e tempo de reação 1,5 horas, atingindo atividade 0,66 U;
- A atividade da enzima imobilizada, sem o tratamento com glutaraldeído, após 30 usos foi de 51% em relação à inicial, ao passo da atividade da enzima imobilizada com reticulação foi de 90% da inicial;
- O estudo da influência da estabilidade da enzima em relação ao pH obteve um resultado eficaz com o uso do processo do ligação cruzada após a imobilização, com uma queda menor de 10% na atividade para a faixa de pH estudada, já para o estudo sem o processo de ligação cruzada houve uma queda de até 57% na atividade.
- Utilizando a superfície de resposta foi possível realizar uma análise conjunta das variáveis pH e temperatura e determinar o ponto de maximização das variáveis estudadas com pH 4,1, temperatura de 34°C e atividade de 0,663U;
- Para a faixa de concentração de lactose estudada, de 5 a 140 g/L, não houve inibição pelo substrato para enzima imobilizada, pelo modelo de Michaelis-Menten estimou-se os valores das constantes V_m e K_m que foram respectivamente 0,71 U e 35,30 mM (12,07 g/L);

- No estudo cinético a glicose praticamente não apresentou influência como inibidor na atividade de β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568;
- O modelo cinético que melhor se ajustou aos resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada foi o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por galactose. Os valores dos parâmetros V_m , K_m e K_i para a enzima imobilizada em Duolite A-568 foram 0,77 U, 35,30 mM (12,07 g/L) e 27,44 mM (4,94 g/L).

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568;
- Estudar outros métodos de imobilização nas resinas trocadoras de íons;
- Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada;
- Estudo da transferência de massa na cinética com a enzima imobilizada;
- Estudar a cinética da hidrólise da lactose para a enzima imobilizada utilizando leite como substrato;
- Estudar o comportamento cinético de β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 em um reator de leito fixo.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAYRAK, N. YANG, S. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on Tosylated Cotton Cloth. Enzyme and Microbial Technology, v 31, p. 371–383, 2002.
- ALEKSANYAN, E. R., MARKOSYAN, L. S. Microbial β -fructofuranosidase (survey). Appl Biochem Microbiol, v.22, p.133–45, 1986.
- 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.
- ALMEIDA, M.M., PASTORE, G.M. Galactooligossacarídeos – Produção e Efeitos Benéficos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, SBCTA, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.
- ARICA M. Y., BAYRAMOGLU G. Invertase Reversibly Immobilized onto Polyethylenimine-grafted Poly (GMA-MMA) Beads for Sucrose Hydrolysis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 38, p. 131-138, 2006.
- AXELSSON, A., ZACHI, G. Appl. Biochem. Biotechnol, v. 24, p. 679, 1990.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BAKKEN, A. P., HILL Jr., C. G., AMUDSON, C. H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized β -Galactosidase Reactor to Hydrolyze the Lactose Constituent of Skim Milk. Biotechnology and Bioengineering, v.36, n.3, p. 293-309, 1990.
- BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation Kinetics of Immobilized Glucose Oxidase for Production of Calcium Gluconate in an External Loop Airlift Bioreactor. Biochemical Engineering Journal, v. 22, pp. 33-41, 2004.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., RUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos*. 2º edição, Unicamp, 2002, p.412.
- BASSETTI, F. J. Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 1995, p.188.
- BAYRAMOGLU, G., YILMAZ, M., ARICA, M.Y. *Food Chem.*, v.84, p. 591, 2004.

- BAYRAMOGLU, G.; AKGÖL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalente Immobilisation of Invertase onto a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl Metacrylate and Glycidyl Methacrylate: Properties and Application in a Continuous Flow System. Biochemical Engineering Journal, v. 14, pp. 117-126, 2003.
- BICKERSTAFF, G. F. Em Immobilization of Enzymes and Cells. ed.: Human Press. New Jersey, 1997, cap.1, p. 1-11.
- BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Principles of Catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker, 1997.
- BLOWEY, R. W. Factors Affecting Milk Quality. In: ANDREWS, A. H. et al. Ed. Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle. Blackwell, Oxford. p. 329 – 334, 1992.
- BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A.. Introdução à Química de Alimentos. 2a ed, São Paulo. 1995.
- BODALO, A., GOMEZ, J. L., GOMEZ, E., MAXIMO, M. F., HIDALGO, A. M. Simulation of Transient State in Enzymatic Membrane Reactors for Resolution of dl-valine and Experimental. J. Chem. Technol. Biotechnol, v. 9, p. 978–984, 2001.
- BÓDALO, A., GÓMEZ, E., GÓMEZ, J.L., BASTIDA, J., MÁXIMO, M.F., DÍAZ, F. A Comparison of Different Methods of β -galactosidase Immobilization. Process Biochemistry v. 26, pp349-353, 1991.
- BRENA, B.M., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., BATISTA-VIEIRA, F. Effect of Increasing Co-solvent Concentration on the Stability of Soluble and Immobilized β -galactosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 21, pp.25-29, 2003.
- BRENA, B.M., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., BATISTA-VIEIRA, F. Influence of the Immobilization Chemistry on the Properties of Immobilized β -galactosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic v.11, pp 597-606, 2001.
- BULCHHOLZ K.; KASCHE V.; BORNSCHEUER U. T. Biocatalysts and Enzyme Technology. 2005.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art: Current Opinion in Chemical Biology, v.9, pp.217–226, 2005.
- CARPIO, C., GONZALEZ, P., RUALES, J., BATISTA-VIERA, F. Bone-bound Enzymes for Food Industry Application. Food Chem, v.9, p.68-403, 2000.
- CARRARA, C. R., RUBIOLO, A. C. Immobilization of β -galactosidase on Chitosan. Biotechnol. Prog. v.10, p 220–224, 1994.
- CHANG, M., JUANG, R. Activities, Stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan–clay Composite Immobilized Enzymes. Enzyme and Microbial Technology. v.36, pp. 75–82, 2005.

- CHAPLIN, M. F., BUCKE, C. Enzyme Technology, Cambridge University, 1990.
- CHIBATA, I. Immobilized Enzymes – Research and Development. New York: John Wiley & Sons, 1978.
- CLAMP, J.R., HOUGH, L., HICKSON, J.L., WHISTLER, R.L. Lactose, in Advances in Carbohydrate Chemistry, v.16, Academic Press, New York, pp. 159-206, 1961.
- COLLINS H.C.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Editora da Unicamp. Campinas, 1993.
- COVILLE, D., COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromices lactis*. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 11, p.55-64, 1995.
- DIXON M. & WEBB E. C. Enzymes. 3 ed. London, Longman Group Limited, 1979.
- DONER, L.W., HICKS, K.B. Lactose and the Sugars of Honey and Maple: Reactions, Properties and Analysis, in Food Carbohydrates, AVI Publishing Co., Westport, CT, p. 74-112, 1982.
- FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry, Springer, Berlin, 2004.
- FABER, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer- Verlag, New York Inc., 1997.
- FARIAS, F.F., FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos Carboidratos. The Electronic Journal of Pediatric, v. 8, n. 3, 2004.
- FERNANDES, P., ROCHA, J.R., CATANA, R., FERREIRA, B.S., CABRAL, J.M.S. Design and Characterisation of a Enzyme System for Inulin Hidrolysis. Food Chemistry, v.95, pp.77-82, 2006.
- FLYNN A. & JOHNSON D. B. Some Factors Affecting the Stability of Glucoamylase Immobilized on Hornblende and on Orther Inorganic Supports. Biotechnology Bioengineering, v. 20, p. 1445-1454, 1978.
- FOGLER, H.S. Elements of Chemical Reaction Engineering. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 838p.
- FREITAS, F. F. Otimização do Processo de Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de Sódio com Gelatina e Glutaraldeído. Uberlândia, UFU, 2007, p.220.
- FREYER, J. Elaboration de dulce de leche. Primer curso de Capacitacion em Industria Lechera. FAO, Uruguai. p. 27, 1972.
- FURLONG, E.B. Bioquímica: um Enfoque para “Alimentos”. Edgraf. Rio Grande, 2000.

- GALVÃO C. M. A. Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.
- GÄNZLE, G.M., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: Crystallization, Hydrolysis and Value-added Derivatives. International Dairy Journal Elsevier, Canadá, p.685-694, 2008.
- GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S.K. Galacto-oligosaccharide by Immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. Food Chemistry, v.97, p. 426-430, 2006.
- GÉKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. Process Biochemistry, v. 20, pp. 2-12, 1985.
- GHALY, A. E. e BEN-HASSAN, R. M. Kinetics of Batch Production of Single-cell Protein from Cheese Whey. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.50, n.1, p.79-92.1995.
- GIRELLI, A. M., MATTEI, E., J. CHROMATOGR. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.v.3, p.819, 2005.
- GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of Chitosan-modified Invertase on Alginate-coated Chitin Support via Polyelectrolyte Complex Formation. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, pp. 22-27, 2005.
- HAGE, D. S., CHROMATOGR, J., ANA, L B. Technol. Biomed. Life Sci, v.3, p. 768, 2002.
- HAIDER, T., HUSAIN, Q. Hydrolysis of Milk/whey Lactose by β -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2008.
- HAIDER, T., HUSSAIN, Q. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae* β - galactosidase: Its stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose International Journal of Biological Macromolecules . p.72-80, 2007.
- HAIDER, T., HUSAIN, Q. Preparation of Lactose Free Milk by Using Salt Fractionated Almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase. J. Sci. Food Agric. p.1278–1283, 2007.
- HATZINIKOLAOU, D.G., KATSIFAS, E., MAMMA, D., KARAGOUNI, A.D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D. Modeling of the Simultaneous Hydrolysis-Ultrafiltration whey Permeate by a Thermostable β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Biochemical Engineering Journal, v. 24, p.161-172, 2005.

HENG, M. H. e GLATZ, C. E. Íon Exchange Immobilization of Charged β -galactosidase Fusions for Lactose Hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, v.44, n.6, p.745-752. 1994.

HERNAIZ, M. J., CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an β -galactosidase from *Aspergillus Oryzae*. Enzyme Microb. Technol., v. 27, p. 26–32, 2000.

HOBMAN, P.G. Review of Process and Products for Utilization of Lactose in Deproteinized Milk Serum. Journal of Dairy, v.67, n.11, p.2630-2653,1984.

HOLSINGER, V.H. Physical and Chemical Properties of Lactose. In: Lactose, water, Salts and Vitamins, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.1-38, 1997.

HOLSINGER, V.H. Lactose. In: WONG, P.N; JENNES,R.; KEENEY,M.; MARTH,E.H. Fundamentals of Dairy Science. New York, Van Nostrand Reinhold. 3 ed. p. 279-342, 1988.

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acessado em 17/01/2009.

<http://www.cienciadoleite.com.br>. Acessado em 25/04/2009.

<http://www.criareplantar.com.br>. Acessado em 13/01/2009.

<http://www.embrapa.br>. Acessado em 15/01/2009.

<http://www.eufic.org>. Acessado em 22/07/2009.

<http://www.fapesp.br>. Acessado em 15/01/2009.

<http://www.leitebrasil.org.br>. Acessado em 13/01/2009.

HUDSON, C. S. Further Studies on the Forms of Milk Sugar. Journal of the American Chemical Society, v.30, p.1767–1783, 1908.

HUSAIN, Q. IQBAL, J. M. Saleemuddin. Biotechnol. Bioeng, v. 27, p.1102, 1985.

JOSIC. D. BUCHCHER, A. JUNGBAUER, A. J. CHROMATOG. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., p.191, 2001.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZON, G., VICARIA, J. M. Kinetic and Enzymatic Adsorption Model in a Recirculation Hollow-fibre Bioreactor. Bioprocess Biosyst. Eng. v. 28, p. 27–36, 2005.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J.M. Kinetic Model of Activity for Proposed for β -galactosidases: Influence of pH, Ionic Concentration and Temperature. Enzyme and Microbial Technology v. 34, pp 33-40, 2004.

- JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J.M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis of Lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology v.31, p. 300-309, 2002.
- KARDEL, G.; FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. Lactase na Indústria de Laticínios (Parte 1). Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”. Juiz de Fora, v.50, n.294, p.15-17, 1995.
- KAREL, S. F., LIBICKI, S. B., ROBERTSON, C. R. The Immobilization of whole cells: Engineering principles. Chemical Engineering Science. v.40, p.1321-54, 1985.
- KENNEDY, J.F. & CABRAL, J.M.S. Enzyme Immobilization. Enzyme Technology, p. 761, 1987.
- KHAN, A.A., AKHTAR, S. HUSAIN, Q. Process Biochem, v. 40, p. 2379, 2005.
- KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A. and SURAZYNSKI, A. Utilizacion de la β -D-galactosidase en la Elaboration de la Lecha Condensada Azucarada. Le Lait. 527:10-15, 1973
- KOLDVOSKY, O: Digestive - Absorptive Functions in Fetuses, Infants and Children, in Polin R, Fox WW (eds): Fetal and Neonatal Physiology Philadelphia , v.2, p. 1059– 1070, 1992.
- KRETCHMER, M. Sci. Am, p.227, 1972 .
- LADERO, M., FERRERO, R., VIAN, A., SANTOS, A., GARCIA-OCHOA, F. Enzyme Microb. Technol, v.37, p.505, 2005.
- LADERO, M., SANTOS, A., GARCIA, J.L., GARCÍA-OCHOA. Activity over Lactose and ONPG of a Genetically Engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in Solution and Immobilized: Kinetic Modeling. Enzyme and Microbial technology v.29 pp. 181-193, 2001.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis with an Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 27, pp. 583 – 592, 2000.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 22, pp. 558 – 567, 1998.
- LETCA, D., HEMMERLING. C., WALTER, M., WULLBRAND, D., BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinant Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. Roumanian Society of Biological Sciences, v. 9, p. 1879-1886, 2004.
- LEVITON, A., LEIGHTON, A. Separation of Lactose and Soluble Proteins of whey by 387 Alcohol Extraction, Ind. Eng. Chem, v.30, p 1305–1311, 1938.

- LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnología Industrial: Procesos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, 2001. vol.3, 593p.
- LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2006. 89p.
- LOPES, R. R. S., SABRA, A., CABRAL, G. C., RODRIGUES, G., SABRA, S. Prevalência de Intolerância à Lactose em Pré-Escolares e Escolares no Município de Duque de Caxias. In: 6º AMOSTRA ACADÊMICA INIMEP. Piracicaba, 2008.
- LOURESMA, J. Aplicaciones de Lactasa para el Dulce de Leche. *Ind. Lacteas*. 27(5): 25-26, 1978.
- MAHONEY, R.R. . Lactose: Enzymatic Modification. In: *Lactose, Water, Salts and Vitamins*, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, pp.77-125, 1997.
- MALCATA, F. X., REYES, H. R., GARCIA, H. S., HILL Jr, C. G., AMUNDSON, C. H. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils. A review. Journal of the American Oil Chemist's Society, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.
- MAMMARELLA, E. J., RUBIOLO, A. C. Predicting the Packed Bed Reactor Performance with Immobilized Microbial Lactase. Process Biochem, v. 41, p. 1627–1636, 2006.
- MARKOGLOU, N., WAINER, I. W. Em *Bioanalytical Separations*, New York, ed.; Elsevier Science, 2003, cap. 7.
- MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H. Biossensores Baseados no Processo de Inibição Enzimática. *Química Nova*, v. 31, n 7, 2008.
- MARQUEZ, L.D.S. Produção De Açúcar Invertido Pelo Uso De Invertase Imobilizada Em Resinas. Dissertação de Mestrado, UFU, 2007.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORETE, G., GUIZA, J. M., FERNANDEZ-LORETE, R.; *Enzyme Microb. Technol*, v.40, p.1451, 2007
- MOFFAT, G., WILLIAMS, R. A., WEBB, C., STIRLING, R. Selective Separations in Environmental and Industrial Processes Using Magnetic Carrier Technology. Minerals Engineering, p.1039–1056, 1994.
- NAJAFPOUR, G. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Boston, Elsevier, 2007, p.421.
- NAKANISHI, K., MATSUNO, R., TORII, K., YAMAMOTO, K., KAMIKUBO, T. Properties of Immobilized β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. Enzyme and Microbial Technology, v.5, n.2, p.115-120. 1983.

- NAKKHARAT, P., HALTRICH, D. Lactose Hydrolysis And Formation Of Galactooligosaccharides By A Novel Immobilized β -Galactosidase From The Thermophilic Fungus *Talaromyces Thermophilus*. *Applied Biochemistry And Biotechnology* pp. 129–132, 2006.
- NELSON J. M.; GRIFFIN E. G. Adsorption of Invertase. *Journal American Chemical*, v. 38, pp. 1109-1114, 1916.
- NICKERSON, T. A., *Fundamentals of Dairy Chemistry*, New York, 1988.
- NICKERSON, T.A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 2nd ed. Connecticut. The AVI Publishing Co. pp. 224-260, 273-324, 1974.
- NIJPELS, H. H., BIRCH, C. G., BLAKEBROUGH, H., PARKER, K. J. *Enzymes and Food Processing*. *Appl. Sci*, v.42, p.89, 1981.
- O'CONNELL, S., WALSH, G. Physicochemical Characteristics of Commercial Lactases Relevant to their Application in the Alleviation of Lactose Intolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.134, p. 179-191, 2006.
- OOSTEROM M. W., BELLE H. J. A., RANTWIJL F., SHELDON R.A. Immobilised β -galactosidases and their Use in Galactoside Synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.134, p. 267-274, 1998.
- ÖZDURAL, A. R., ALKAN-SUNGUR, A., BOYACI, I. H., WEBB, C. Determination of Immobilized Enzyme Apparent Kinetic Parameters in Packed-bed Reactors: Presentation of a new Methodology. *Food and Bioproducts Processing*, v. 86, p.104–108, 2008.
- ÖZDURAL, 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, pp. 27-36, 2003.
- PAIVA, A. P. Metodologia de Superfície de Resposta Multivariada – Uma Proposta de otimização para processos de Manufatura com Múltiplas Respostas Correlacionadas. Tese de Doutorado –UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá. . 2006. 279p.
- PARK, J. K., CHANG, H. N. Microencapsulation of Microbial Cells. *Biotechnology Advances*. v.18, p.303-319, 2000.
- PEPPLER, H.J., REED, G. *Enzymes in Food and Feed Processing*, in: H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), *Biotechnology*. v 7a, p. 578-580, 1987.
- PEREIRA, G. H. A. Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil. São Carlos, UFSCar, 1996.

- PHADTARE, S., D'BRITTO, V., PUNDLE, A., PRABHUNE, A., SASTRY, M. Invertase-lipid Biocomposite Films: Preparation, Characterization and Enzyme Activity. Catal. Commun., v. 20, p.156–161, 2004.
- PILKINGTON, P. H., MARGARITIS, A., MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. Criticals Reviews in Biotechnology, v. 18, p.237-255, 1998.
- PORTACCIO, M., STELLATO, S., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., ELDIN, M.S.S., GAETA, F.S., MITA, D.G. Galactose Competitive Inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) Immobilized on Chitosan and Nylon supports. Enzyme Microbial Technology, v.23, p.101 – 106, 1998.
- PRENOSIL, J.E, STUKER, E., BOURNE, J.R. Formation of Oligosaccharides Using Enzymatic Lactose: Part I: State of Art. Biotechnology and Bioengineering, v.30, p. 1019-1025, 1987.
- REED, G., NAGODAWITHANA, T. Enzymes in Food Processing. New York, Academic Press. 3^a ed. 1993.
- RIBEIRO E. J. Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.
- RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Casa do Pão Editora. FEA – Campinas. 2005.
- ROY. I., GUPTA, M.N. Lactose Hydrolysis by Lactosym TM Immobilized on Cellulose Beads in Batch and Fluidized Bed Modes. Process Biochemistry, v. 39, p.325-332. 2003.
- SANTOS, A., LADERO, M., GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromices fragilis*. Enzyme and Microbial Technology, v.22, n.7, p.558-567, 1998.
- SCOUTEN, W. H. Methods in Enzymology. Mosbach, K. ed., vol. 135, 1987, p.30-65.
- SECUNDO, F., CARREA, G. MOL. J. Catal. A: Enzyme, v.93, p.19–20, 2002.
- SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics. New York, John Wiley, 1993.
- SHELDON, R. A. Adv. Synth. Catal.v. 349, p.1289, 2007.
- SHUKLA, T.P. β -Galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem. Critical Reviews in Food Technology, v.1, p.325 – 356. 1975.
- SMITH, E. L., HILL, R. L., LEHMAN, I. R., LEFKOWITZ. R. J., HANDLER, P., WHITE. A. Bioquímica: Aspectos Gerais. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 1985.

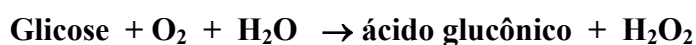
- SORENSEN, R., NOVAK, N. The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Physiology Teaching Laboratories. *Biochemical Education*, v.24, n.1, p.26-28,1996.
- SUENAGA, C. I. Intolerância à lactose. UNIFESP: Escola Paulista de Medicina, 2001.
- SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, v. 10, p. 631–637, 2000.
- SZYMANSKA K., BRYJAK J., MROWIEC-BIALON J., JARZEBSKI A. B. Application and Properties of Siliceous Mesostructured Cellular Foams as Enzymes Carriers to Obtain Efficient Biocatalysts. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 99, p. 167-175, 2007.
- TANRISEVEN, A.S.; DOGAN, E. A Novel Method for the Immobilization of de β -galactosidase. *Process Biochemistry* v.38, p 27-30, 2002.
- TAQIEDDIN, E., LEE, C., AMIJI, M. Perm-selective Chitosan-alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology. *Pharm. Eng*, v.22, p.1–3, 2002.
- THELWALL, L.A.W. Developments in the Chemistry and Chemical Modification of Lactose, in *Developments in Dairy Chemistry- 3- Lactose and Minor Constituents*, (P.E. Fox ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London, p. 35-67, 1985.
- TISCHER, W., KASCHE, V. *Trends Biotechnol.* V,17, p.326, 1999.
- TWIEG, W.C., NICKERSON, T.A. Kinetics of Lactose Crystallization. *Journal Dairy Science*. V.51(11), p.1720-1724, 1968.
- UHLIG, H. *Enzyme Arbeiten für uns*, *Technische Enzyme und ihre Anwendung*, München, Carl Hanser Ed, 1991, p.198-211.
- VICENTE A. A. *Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química . Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2000.
- VILLELA, G. G., BACILA, M., TASTALDI, H. *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 1978.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y Física Lactologia*, Editora Acribia, S.A., Zaragoza, 1984.
- WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H., ANFORD, J.A. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 2nd ed. Westport, AVI publishing, p.480, 1974.

- WEETALL H. H. Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry. Process Biochemistry, p. 3-30, 1975.
- WHITE, A.; HANDLER, P., SMITH, E. Princípios de Bioquímica. Guanabara Koogan. 5 ed., 1976.
- WHITTIER, E. O. Lactose and its Utilization - a review. Journal of Dairy Science, 1994. p.505–537, c.27.
- WOODWARD, J. Immobilised Cells and Enzymes- A practical approach. Ed. by IRL Press Oxford. Washington DC, USA, 1984, p.3-17.
- YANG, S., OKOS, M. R. Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized β -galactosidase in Plug-Flow Reactor. Biotechnology and Bioengineering, v.33, n.7, p.873-885, 1989.
- YANG, S. T., SILVA, M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. J. Dairy Sci., Champaign, v. 78, p.2541-2562, 1995.
- ZADOW, J.G. Lactose: Proprieties and Uses. Journal of Dairy Science. Champaign, v.67, p. 2654-2679, 1984.
- ZANIN G. M. Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade estadual de Campinas, 1989.
- ZHOU, Q. Z. K., CHEN, X. D., XUEMELI, L. Kinetics of Lactose Hydrolysis by β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* Immobilized on Cotton Fabric. Biotechnol. Bioeng, v. 81, p.127–133, 2003.

ANEXO A

Determinação de Glicose:

A glicose, em todos experimentos, será dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se Kits Glicose Enzimática, conforme procedimento descrito por TOMÁS, 1998. Esse método é específico para a glicose e se baseia na oxidação da mesma, de acordo com a seguinte reação, catalisada pela glicose-oxidase (G-O):



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

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

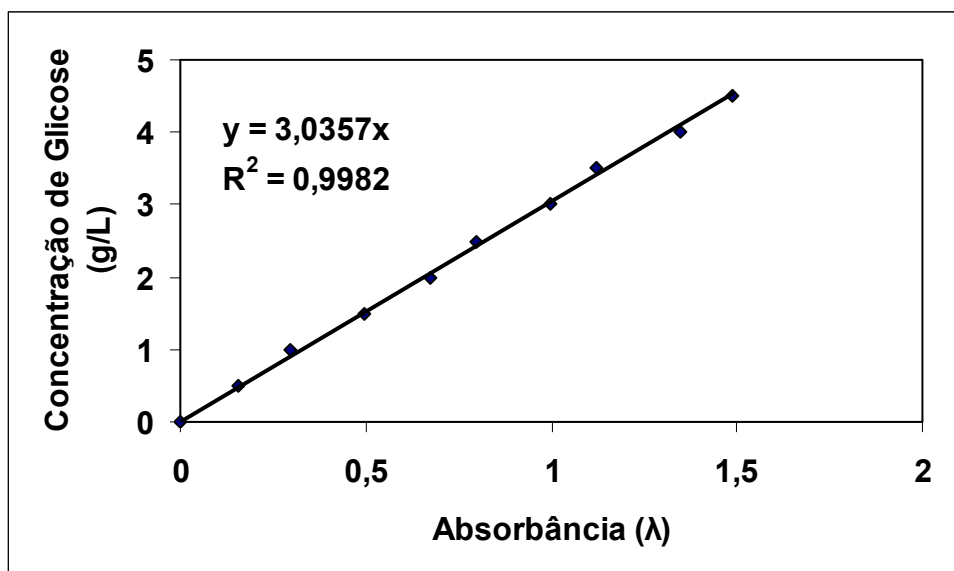
Para a determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi a determinação da curva padrão, de absorbância em função das concentrações de glicose. Para isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 2 mL da solução de glicose-oxidase preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,5 g/L, deixando reagir por 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias a 500nm para os vários tubos, em um espectrofotômetro Genesys 10 UV usando cubetas de vidro, considerando como branco a solução de glicose-oxidase. Com os valores de absorbância em função da concentração de glicose na faixa de 0,0 a 4,5 g/L, com intervalos de 0,5 g/L, foram

construídas retas e determinadas as equações das mesmas, considerando o intervalo de concentração adotado. Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o mesmo procedimento anterior, determinando-se a sua absorbância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.

APÊNDICE A

Curva de calibração

Soluções	Absorbância (λ)	Concentração de Glicose (g/L)
0	0	0
1	0,156	0,5
2	0,299	1
3	0,496	1,5
4	0,673	2
5	0,797	2,5
6	0,996	3
7	1,121	3,5
8	1,348	4
9	1,488	4,5



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)