



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo

Autora: Janaína Fischer

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Co-orientador: Miriam Maria de Resende (UFU)

Uberlândia - MG

Julho 2010

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

Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo

Janaína Fischer

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

Dedico esta dissertação

Aos meus pais Romeu e Celina, e aos meus queridos irmãos, pelo apoio, compreensão e amor incondicional, em todos os momentos desta e de outras caminhadas. E em especial aos meus sobrinhos Anna Betieli e Rodrigo, que tanto alegram minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas alegrias proporcionadas, por iluminar o meu caminho e estender a mão nas horas de dificuldades. Aos meus pais, Romeu e Celina, que sempre me deram amor, segurança e apoio para minha formação pessoal e acadêmica. Aos meus irmãos, Oraci e Marlei, por estarem ao meu lado toda a vida, e principalmente por agraciarem a minha vida com meus sobrinhos: Anna Betieli e Rodrigo, e em breve mais um amado bebê em nossa família. Não tenho palavras para expressar tamanho amor e gratidão que sinto por vocês. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao Prof. Eloízio Júlio Ribeiro pela orientação, por toda a dedicação, paciência e confiança, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada também, pelas palavras amigas, pelo sorriso e pelo carinho, o Sr. é iluminado!

À Prof^a. Miriam Maria Resende pela orientação, por toda a ajuda, dedicação e paciência, carinho, durante a realização deste trabalho. Prô obrigada!

À Prof^a. Vicelma Luís Cardoso, um agradecimento especial, pelos valiosos ensinamentos e ajuda no fechamento deste trabalho.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo.

As colegas de laboratório e do “Lar das Gaúchas”: Carla e Maurielem, pela amizade, carinho, companherismo, pelas horas de estudo, enfim apoio incondicional durante esse dois anos de mestrado,

Aos colegas, pois juntos trilhamos uma etapa importante em nossas vidas: Thályta, Juliana, Christiane, Letícia, Daniela, Ballu, Flávia, Bruno, Rafael, Wesley, Ruy, Jefferson Obrigada pelos ensinamentos, momentos compartilhados e amizade ímpar.

Aos meus amigos do Rio Grande do Sul, pelo apoio e amizade!

Aos estudantes de Graduação em Engenharia Química, Larissa, Camila e Marcela por toda a ajuda.

Aos funcionários da FEQUI: Silvino, Cléo, Zuleide, Roberta, Rodrigo, e José Henrique pela colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro.

Enfim, a todos, que com boa intenção, colaboraram pela realização e finalização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO	
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SIMBOLOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 – Leite	3
2.2 – Soro lácteo.....	4
2.3 – Lactose.....	8
2.4 – Intolerância à lactose.....	10
2.5 – Hidrólise da lactose.....	12
2.6 – Enzimas.....	15
2.6.1 – Enzima β -galactosidase.....	16
2.6.1.1 – Principais fontes de β -galactosidase.....	17
2.7 – Imobilização de enzimas.....	20
2.7.1 – Métodos de imobilização de enzimas.....	22
2.7.1.1 – Imobilização por retenção física.....	23
2.7.1.2 – Ligação a suportes insolúveis.....	24
2.7.1.3 – Ligação cruzada.....	26
2.7.2 – Suportes para imobilização.....	28
2.7.2.1 – Imobilização em resinas.....	30
2.8 – Reatores enzimáticos.....	31
2.8.1 – Reatores descontínuos.....	34
2.8.2 – Reatores contínuos.....	34
2.8.3 – Problemas operacionais.....	35
2.8.4 – Distribuição de tempos de residência.....	36
2.9 – Cinética enzimática.....	37
2.9.1 – Presença de inibidores no meio reacional.....	39
2.9.2 – Influência do meio na atividade e estabilidade das enzimas.....	42
2.9.2.1 – Influência do pH.....	42
2.9.2.2 – Influência da temperatura.....	44
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 – Material.....	49
3.1.1 – Enzima.....	49
3.1.2 – Suporte para imobilização.....	49
3.1.3 – Substrato.....	50
3.1.4 – Unidade experimental.....	50
3.1.4.1 – Reator tipo cesta (batelada).....	50
3.1.4.2 – Reator de leito fixo (contínuo).....	51
3.2 – Métodos.....	53
3.2.1 – Preparação do biocatalisadore.....	53
3.2.1.1 – Ativação do suporte.....	53
3.2.1.2 – Imobilização da β -galactosidase seguido de ligação cruzada.....	53
3.2.2 – Determinação da atividade de β -galactosidase imobilizada pelo método das atividades iniciais.....	54
3.2.3 – Procedimentos analíticos.....	54
3.2.3.1 – Determinação de glicose.....	54
3.2.3.2 – Determinação de lactose.....	55
3.2.4 – Preparação do soro de leite.....	55
3.2.5 – Influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada.....	55
3.2.6 – Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	56
3.2.7 – Estudo da estabilidade de estocagem da enzima imobilizada.....	57

3.2.8 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na hidrólise de lactose pela enzima imobilizada em reator de leito fixo.....	57
3.2.9 – Hidrólise da lactose em dois reatores de leito fixo em série.....	59
3.2.10 – Estudo da estabilidade operacional da enzima imobilizada.....	59
3.2.11 – Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR).....	59
3.2.11.1 – Cálculo do tempo de residência médio.....	60
3.2.11.2 – Cálculo da variância.....	61
3.2.11.3 – Cálculo da dispersão axial.....	61
3.2.12 – Estudo cinético.....	62
3.2.12.1 – Modelagem matemática.....	62
3.2.12.2 – Modelo cinético.....	63
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
4.1 – Influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada.....	66
4.2 – Estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	68
4.3 – Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada.....	76
4.4 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na hidrólise de lactose pela enzima imobilizada em reator de leito fixo.....	77
4.4.1 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise da lactose.....	78
4.4.2 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na conversão de lactose.....	83
4.5 – Hidrólise da lactose em dois reatores de leito fixo em série.....	87
4.5.1 – Resultados dos testes preliminares de hidrólise da lactose presente no soro de leite.....	88
4.5.2 – Resultados dos testes preliminares de hidrólise da lactose presente no leite desnatado “in natura”.....	89
4.6 – Estudo da estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise de lactose em reator de leito fixo.....	90
4.7 – Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR).....	91
4.8 – Modelagem.....	93
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	97
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	99
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Possibilidades de utilização do soro de queijo.....	7
Figura 2.2 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose	9
Figura 2.3 - Processos de hidrólise de lactose.....	13
Figura 2.4 - Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase.....	13
Figura 2.5 - Métodos para imobilização de enzimas.....	23
Figura 2.6 - Tipos de reatores enzimáticos.....	33
Figura 2.7 - Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten.....	38
Figura 2.8 - Efeito do pH na atividade e estabilidade de uma enzima.....	43
Figura 2.9 - Representação da variação da constante de velocidade k com a temperatura absoluta T.....	45
Figura 3.1 - Resina Duolite A568 empregada para imobilização da enzima β -galactosidase.....	49
Figura 3.2 - Reator tipo cesta.....	51
Figura 3.3 - Representação esquemática da unidade experimental com reator tipo cesta.....	51
Figura 3.4 – Reator de leito fixo e dois reatores de leito fixo em série.....	52
Figura 3.5 – Representação esquemática da unidade experimental com reator de leito fixo.....	52
Figura 4.1 –Influência da temperatura na atividade.....	66
Figura 4.2 – Ajuste dos valores da etapa de ativação térmica à Equação de Arrhenius.	67
Figura 4.3 – Atividade relativa (A_i/A_0) em função do tempo de incubação para as temperaturas estudadas.....	68
Figura 4.4 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 65°C.....	70
Figura 4.5 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.....	71
Figura 4.6 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C.....	72
Figura 4.7 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.....	72
Figura 4.8 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 55°C.....	73
Figura 4.9 – Ajuste dos valores de k_d à Equação de Arrhenius.....	75
Figura 4.10 – Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada.....	76
Figura 4.11 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose obtida em cada experimento do planejamento composto central para o estudo da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação.....	78
Figura 4.12 – Valores preditos em função dos valores observados.....	80
Figura 4.13 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	81
Figura 4.14 – Superfície de resposta e curvas de contorno da influência da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise	82
Figura 4.15 – Valores preditos em função dos valores observados.....	85
Figura 4.16 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.....	85
Figura 4.17 – Superfície de resposta e curvas de contorno da influência da concentração de lactose e vazão de alimentação na conversão da lactose.....	86
Figura 4.18 – Soro de leite desnatado e desproteínizado.....	88
Figura 4.19 – Estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da lactose em reator de leito fixo em regime contínuo.....	90
Figura 4.20 – Distribuições cumulativas adimensionais	91
Figura 4.21 – Distribuição $E(\Theta)$ para os cinco diferentes tempos de residência estudados.....	92

Figura 4.22 – Concentração de lactose adimensional em função do comprimento do reator adimensional a diferentes velocidades superficiais para $C_{s0} = 50$ g/L.....	93
Figura 4.23 – Concentração do produto (galactose) em função do comprimento do reator adimensional para diferentes velocidades superficiais.....	94
Figura 4.24 – Concentração de lactose adimensional em função do comprimento do reator adimensional a diferentes velocidades superficiais para $C_{s0} = 50$ g/L e modelo com dispersão axial.....	94
Figura 4.25 – Conversão ao longo do comprimento do reator para diferentes velocidades e modelo com dispersão axial.....	95
Figura 4.26 – Comparação entre os resultados experimentais e simulados para a conversão na saída do reator em função das velocidades superficiais.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro do queijo doce e ácido.....	5
Tabela 2.2 – Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos	10
Tabela 2.3 – Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada.....	15
Tabela 2.4 – Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase.....	17
Tabela 2.5 – Propriedades de algumas enzimas microbianas.....	18
Tabela 2.6 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.....	27
Tabela 2.7 – Classificação dos suportes de acordo com a composição.....	29
Tabela 2.8 – Classificação de reatores enzimáticos.....	33
Tabela 2.9 – Alguns modelos cinéticos enzimáticos.....	41
Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A568.....	50
Tabela 3.2 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise e na conversão da lactose.....	58
Tabela 4.1 – Ajustes dos parâmetros para a desativação térmica.....	69
Tabela 4.2 – Tempo de meia vida para as temperaturas estudadas.....	74
Tabela 4.3 – Valores de k_d e tempos de meia calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica.....	74
Tabela 4.4 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose obtida em cada experimento do planejamento composto central para o estudo da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação.....	77
Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	79
Tabela 4.6 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	80
Tabela 4.7 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros.....	83
Tabela 4.8 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos.....	84
Tabela 4.9 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose.....	87
Tabela 4.10 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão de lactose utilizando soro de leite como substrato.....	88
Tabela 4.11 - Taxa média de reação de hidrólise e conversão de lactose utilizando leite como substrato.....	89
Tabela 4.12 – Valores estimados para os parâmetros tempos de residência, velocidade intersticial, variância e coeficiente de dispersão axial.....	92

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
k	Constante da taxa da reação na fase de ativação térmica
E_a	Energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima
R	Constante da lei dos gases
T	Temperatura absoluta
E	Concentração de enzima ativa
k_d	Constante de desativação térmica
E/E_0	Atividade relativa da enzima
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida $t_{1/2}$
E_1	Estados de enzima na etapa de desativação térmica
E_2	Estados de enzima na etapa de desativação térmica
α_1	Razão de atividade específicas
α_2	Razão de atividade específicas
k_1	Constante de velocidade de desativação térmica – única etapa
k_2	Constante de velocidade de desativação térmica – duas etapas
A	Atividade relativa total
E_d	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
k_{d0}	Constante de proporcionalidade
V_m	Velocidade máxima de reação
K_m	Constante do modelo de Michaelis-Menten
S	Substrato
K_i	Constante de inibição
U	Atividade (grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de resina imobilizada)
I	Inibidor
R^2	Coefficiente de Correlação
t	t de student
ρ	Nível de significância
$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios
α	Alfa de ortogonalidade
X_1	Variável estudada 1
X_2	Variável estudada 2

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada por adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído, utilizando como suporte a resina de troca iônica Duolite A568. A temperatura de máxima atividade para a enzima imobilizada para a faixa estudada foi de 60°C, com energia de ativação de 5,32 kcal/mol de lactose, utilizando uma concentração inicial de lactose de 50 g/L em solução a pH 4,5. A estabilidade térmica da enzima foi estudada na faixa de 55 a 65°C. O modelo de desativação térmica de primeira ordem se ajustou melhor para descrever a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada. A energia de ativação do processo de desativação térmica de β -galactosidase imobilizada foi 66,48 kcal/mol com tempos de meia vida de 8,9 horas a 55°C. A enzima imobilizada manteve sua atividade após 90 dias de armazenamento, em tampão acetato pH 4,5 a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. A influência da concentração de lactose e da vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose em reator de leito fixo, operando em regime contínuo, com escoamento ascendente foi estudada empregando um Planejamento Composto Central (PCC) fixando uma temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A melhor condição para a taxa média de reação de hidrólise e conversão foi: concentração de lactose igual a 50 g/L e vazão de alimentação igual a 6 mL/min, atingindo taxa média de reação de 2074 U e conversão de 65%. Com a finalidade de aumentar a conversão de lactose foram realizados testes em dois reatores de leito fixo em série, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, na melhor condição definida pelo PCC para um reator de leito fixo. A utilização do segundo reator em série aumentou a conversão de lactose em 17%. A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 30 dias de operação em reator de leito fixo, com vazão de alimentação de solução de lactose 50 g/L igual a 0,3 mL/min, à temperatura ambiente. As determinações de distribuição de tempos de residência para as vazões de alimentação na faixa de 0,6 a 12 mL/min indicaram um escoamento não ideal para a coluna utilizada com formação de curtos-circuitos “by-pass” no reator de leito fixo. Para o estudo da cinética em reator de leito fixo, as vazões de alimentação estudadas foram as mesmas das utilizadas nas determinações de DTR, com lactose 50 g/L em solução a pH 4,5, temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, empregando o modelo cinético de inibição competitiva por galactose. A cinética de hidrólise de lactose em reator de leito fixo se ajustou adequadamente ao modelo dispersão axial.

Palavras-chave: β -galactosidase, hidrólise da lactose, imobilização, Duolite A568, reator de leito fixo.

ABSTRACT

In this work was studied the lactose's hydrolysis by β -galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized by adsorption and cross-linking with glutaraldehyde, using as carrier the ion exchange resin Duolite A568. The temperature of maximum activity for the immobilized enzyme in the range studied was the 60°C, with activation energy of 5,32 kcal/mol of lactose, using an initial concentration of lactose from 50 g/L in solution in pH 4,5. The thermal stability of enzyme was studied in the range of 55 to 65°C. The model of thermal deactivation of first order fitted best to describe the kinetics of thermal deactivation of immobilized enzyme. The activation energy of thermal deactivation process from β -galactosidase immobilized was 66,48 kcal/mol with times of half life from 8,9 hours in 55°C. The immobilized enzyme kept its activity after 90 days of storage, in buffer acetate pH 4,5 in $4 \pm 2^\circ\text{C}$. The influence of lactose concentration and the feed flow in the average rate of reaction from hydrolysis and lactose's conversion in fixed bed reactor, operating in continuous duty, with upflow was studied employing a Central Composite Design (CCD) fixing a temperature of $35 \pm 1^\circ\text{C}$. The best condition for the average rate of reaction from hydrolysis and conversion was: lactose concentration equal to 50 g/L and feed flow equal to 6 mL/min, reaching an average rate of reaction and conversion in 2074 U and 65%, respectively. In order to increase the lactose conversion were performed experiments in two reactors of fixed bed in series, operating in continuous duty, upflow, in the best condition determined by CCD for a fixed bed reactor. The utilization of the second reactor in series increased the lactose conversion in 17%. The immobilized enzyme kept its activity during 30 days of operation in fixed bed reactor, with feed flow of lactose solution 50 g/L equal to 0,3 mL/min, in the room temperature. The determinations of distribution of residence times for the feeding flows in the range of 0,6 to 12 mL/min indicated a non-ideal flow for the column used with formation of short circuits "by-pass" in the fixed bed reactor. For the study of kinetics in fixed bed reactor, the feeding flows studied were the same of those used in the Residence Time Distribution (RTD) determinations, with lactose 50 g/L in solution at pH 4.5, temperature of $35 \pm 1^\circ\text{C}$, employing the kinetic model of competitive inhibition by galactose. The kinetics of lactose hydrolysis in fixed bed reactor fitted accordingly to the axial dispersion model.

Keywords: β -galactosidase, lactose hydrolysis, immobilization, Duolite A568, fixed bed reactor.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A lactose é um importante componente do leite e do soro de queijo. Mas sua utilização em produtos lácteos é bastante limitada, devido à sua baixa solubilidade, forte tendência a absorver odores e sabores, além de ser um açúcar higroscópico, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Outra restrição é devido à intolerância a este dissacarídeo por grande parte da população mundial. A utilização de soro de queijo tem sido também limitada e assim, o mesmo normalmente é descartado como um efluente de difícil degradação, em função de seu alto teor de lactose (CARRARA e RUBIOLO, 1996).

A produção mundial do leite de vaca em 2009 foi de 701 bilhões de litros, com uma projeção de aproximadamente 714 bilhões de litros para 2010. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite e primeiro da América do Sul, com aproximadamente 28 bilhões de litros/ano (<http://www.embrapa.br>). Quanto à produção de queijos, o Brasil é o sétimo maior produtor mundial, com um total de aproximadamente 480.000 toneladas em 2005, gerando em torno de 4,3 milhões de toneladas de soro de queijo (USDA, 2009).

Nos laticínios, a hidrólise da lactose do soro de leite, apresenta-se como alternativa para ampliar as possibilidades de uso comercial deste insumo, além de contribuir com a redução dos impactos ambientais causados pelo efeito poluidor do mesmo (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003).

A hidrólise da lactose em glicose e galactose por β -galactosidase é preferível a hidrólise ácida, pois ocorre em condições mais brandas de temperatura e pH, e os produtos obtidos preservam as suas propriedades (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005). Sendo um importante processo na indústria de alimentos, pois proporciona uma melhoria nas características tecnológicas e sensoriais de produtos lácteos, conferindo a estes, maior poder adoçante, maior solubilidade, além de permite a obtenção de novos produtos, economicamente atrativos e adequados a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose (JURADO *et al.*, 2002).

A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* é adequada para a hidrólise da lactose, em especial a do soro de leite, devido à mesma ser estável em ampla faixa de pH, ter atividade ótima em pH ácido e alta estabilidade térmica (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

Os processos enzimáticos empregam as enzimas nas formas livre (solúveis) ou imobilizada. A utilização de enzimas livres em processos industriais tem certas limitações

devido ao seu alto custo, à dificuldade de recuperação das mesmas no final do processo e ainda à sua instabilidade (HAIDER e HUSAIN, 2008). A aplicação da enzima na forma imobilizada pode apresentar várias vantagens em relação à forma livre, tais como reutilização do biocatalisador heterogêneo, redução de custo, possibilidade de melhor controle de processo, operação contínua, aumento de estabilidade. Alguns fatores essenciais devem ser levados em consideração para a escolha do suporte adequado à imobilização, tais como compatibilidade suporte-enzima, eficiência, produtividade, estabilidade no processo e disponibilidade do suporte (CAO, 2005; KRAJEWSKA, 2009).

A imobilização em resinas de troca iônica envolve interações entre os íons da proteína e os íons de carga oposta da resina. A estabilidade da enzima adsorvida pode ser melhorada através da criação de ligações cruzadas adicionais, usando-se um reagente bifuncional, como o glutaraldeído (LETCA *et al.*, 2004; TOMOTANI e VITOLO, 2006). A resina Duolite A568 é uma resina de troca iônica fracamente básica, muito utilizada como suporte para imobilização de enzimas em bioprocessos alimentícios.

Tendo em vista o aumento significativo na expansão do consumo mundial de leite, queijos e derivados lácteos, e ao alto volume de soro de leite gerado, seu valor nutricional e também poluente, torna-se necessário a busca de novas alternativas para o aproveitamento deste importante insumo.

Com base no exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi estudar a hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada na resina de troca iônica Duolite A568. E os objetivos específicos foram:

- Estudar a influência da temperatura na atividade e estabilidade da enzima imobilizada;
- Analisar a estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da lactose;
- Avaliar a hidrólise de lactose utilizando β -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Leite

O leite sob o ponto de vista legal é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2002). É considerado o mais nobre dos alimentos, pois sua composição é rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, garantindo proteção imunológica e maior fonte de cálcio absorvível ao homem, seja ele criança, jovem ou adulto. Além do seu elevado valor nutritivo, oferece elementos anticarcinogênicos presentes na gordura, como o ácido linoléico conjugado, ácido butírico, β -caroteno, vitaminas A e D (MÜLLER, 2002 apud TREVISAN, 2008).

A composição do leite de vaca varia de acordo com a espécie, a raça, a individualidade, a alimentação, o tempo de gestação e outros fatores. Assim, é difícil definir uma composição “normal” do leite. Entretanto, as relações entre seus diferentes constituintes são muito estáveis, e podem ser utilizadas para indicar se houve qualquer adulteração na sua composição. O leite em condições normais contém aproximadamente 87,5% de água, 3,8% de gordura, 4,6% de lactose, 3,1% de proteína, 0,8% de cinzas/vitaminas (BLOWEY, 1992).

A água é o componente mais abundante, no qual se encontram em solução os demais compostos. Os lipídeos, também denominados como gordura do leite, são constituídos de triglicerídeos (97-98% do total de lipídeos), pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolipídeos. Os glóbulos de gordura encontram-se protegidos por uma membrana de natureza protéica, na qual ficam associados fosfolipídeos, proteínas e outras substâncias, esta membrana impede a união de todos os glóbulos, mantendo a gordura do leite como uma emulsão (TRONCO 2003).

As proteínas do leite são subdivididas em caseína (80%), sendo a principal proteína do leite, é uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coalho e/ou álcool; e proteínas do soro (20%), que se encontram completamente dissolvidas na água do leite, são formadas pelas frações: albumina do soro, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e protease-peptonas (TRONCO 2003)

A lactose está totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite, representando aproximadamente a metade dos sólidos não gordurosos e contribuindo para o valor energético do leite, pois cerca de 30% das calorias fornecidas pelo leite são devidas à lactose (quatro calorias por grama). Pequenas quantidades de outros carboidratos são encontrados no leite, parcialmente ligadas a fosfatos, lipídeos e/ou proteínas e parcialmente livres, como por exemplo, os monossacarídeos glicose e galactose a uma concentração de aproximadamente 10 mg/L e os oligossacarídeos a aproximadamente 100 mg/ (RENNER, 1983 apud VINHAL, 2001).

As substâncias minerais são designadas cinzas e são formadas pelo cálcio, fósforo, e pequenas quantidades de sódio, potássio, magnésio, flúor, iodo, enxofre, cobre, zinco, ferro, entre outras. O leite contém ainda diversas vitaminas, classificadas como lipossolúveis, A, D, E, e K e hidrossolúveis, B e C (TRONCO 2003 apud TREVISAN, 2008).

O leite fresco normal tem um sabor ligeiramente adocicado, devido principalmente a lactose. Entretanto, todos os elementos do leite, participam de forma direta ou indireta na sensação de sabor. Possui uma cor definida como branco-amarelada e opaca, que se deve principalmente à dispersão da luz, pelas micelas de fosfocaseinato de cálcio. Os glóbulos de gordura também dispersam a luz, mas contribuem muito pouco para a cor branca do leite. O caroteno e a riboflavina contribuem para a cor amarelada (BELITZ, GROSCH e SCHIERBELE, 2009).

As principais propriedades físico-químicas do leite são: pH, que varia de 6,4 a 6,9; acidez, que varia de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico em 100 mL; densidade relativa, que varia de 1,028 a 1,034 g.mL⁻¹ e índice crioscópico máximo de -0,512°C, sendo esta característica mais constante do leite, e utilizada pelos laticínios para detectar adulteração do leite com água. Essas propriedades auxiliam na caracterização do leite e determinação da sua qualidade (BRASIL, 2002)

2.2 – Soro lácteo

As indústrias de laticínios geram três resíduos na forma líquida: o soro, resultante da produção de queijos; o leitelho, resultante da produção de manteiga e o leite ácido. Desses, o soro é o de maior importância, devido ao volume produzido, ao amplo espectro de possibilidades de reutilização visto seu potencial nutritivo e, principalmente, pelo seu elevado poder poluente (ZIMMER, 2006).

O soro do queijo pode ser definido como a porção aquosa que se separa do coágulo durante a fabricação convencional do queijo ou manufatura da caseína. É um líquido quase opaco, de cor amarelo-esverdeado, consiste em aproximadamente 85 a 90% do volume do leite utilizado na produção de queijo e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. A composição natural do soro é rica em lactose (4,0 a 5,0%), proteínas (0,7 a 0,9%) e possui pequenas quantidades de ácido orgânico, lipídeos e sais minerais (MIZUBUTI, 1994).

Existem dois tipos de soro de queijo, o soro doce e soro ácido. O soro doce é proveniente da coagulação enzimática do leite (pH 6,3 a 6,7), é obtido de queijos tipo cheddar, minas frescal, minas padrão, mussarela. O soro ácido (pH 4,6 a 4,7) é resultante de manufatura de caseína ou de queijos feitos com leite coagulados inicialmente por ácido, tal como o queijo cottage, quarq, requeijão e ricota (MORR e HÁ, 1993 apud VEREDAS, 2000).

Os principais constituintes do soro são basicamente os mesmos do leite, sendo que a gordura e a caseína foram retiradas no processo de produção do queijo. A composição do soro é variável, sendo função do leite que lhe deu origem e também das perdas que ocorrem durante a fabricação do queijo. Uma comparação entre as composições do leite integral, leite desnatado, soro doce e ácido é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro do queijo doce e ácido (USDEC, 2009)

Componente (%)	Leite	Leite	Soro Doce	Soro Ácido
	Integral	Desnatado	(pH 6,7)	(pH 4,6)
Umidade	84,7	90,4	93,7	93,5
Lactose	4,8	5,1	4,9	4,9
Gordura	3,5	0,1	0,5	0,04
Proteína	3,5	3,6	0,8	0,7
Cinzas	0,7	0,7	0,5	0,8

Permanece no soro, doce e ácido, aproximadamente metade dos sólidos contidos no leite, dos quais a lactose é o constituinte presente em maior quantidade, correspondendo 70 a 80% dos 7% de sólidos totais do soro.

Para cada litro de leite processado na fabricação de queijos, cerca de 9 litros de soro são gerados. Este grande volume representa um problema ambiental significativo, devido seus elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), na faixa de 30.000-60.000 mg O₂/L, sendo a lactose o principal responsável pela alta DBO. Seu descarte diretamente em rios

ou esgotos públicos atualmente não é permitido, mas em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 450 pessoas (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

Durante muito tempo o soro foi considerado como um problema de resíduos industriais, ou produto com valor comercial residual, utilizado na alimentação animal. Nas três últimas décadas, foi percebido o potencial econômico da utilização do soro como fonte de produtos de valor agregado, visto que contém metade dos sólidos do leite e alto valor nutritivo.

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 (HAIDER e HUSAIN, 2007). Foram encontrados muitos usos para o soro e a lactose, incluindo-se formulações para bebês; produtos de panificação, laticínios e confeitaria; alimento animal; e suprimento alimentar para derivados da lactose após fermentação (MATIOLI, MORAES e ZANIN 2001). A demanda ainda é insuficiente para toda a lactose disponível no soro. O resultado é um baixo valor de mercado. Aproximadamente metade do soro produzido não é utilizada, tornando-se um significativo problema de desperdício (MATIOLI *et al.*, 2001). O Brasil importa cerca de 120 toneladas de lactose por mês para uso em produtos farmacêuticos e em alimentos (MINAS AMBIENTE/CETEC, 1999 apud TREMARIN, 2007).

Industrialmente, o soro pode ser processado utilizando-se uma série de técnicas diferentes, que incluem filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, desmineralização, osmose reversa, fermentação, entre outros métodos de separação física, para obtenção de diferentes produtos de soro, com teores variáveis de proteína, minerais, lactose, propriedades funcionais, e outras especificações. A Figura 2.1 mostra as diversas possibilidades de utilização do soro de queijo na indústria alimentícia e farmacêutica (RIBEIRO, 2000).

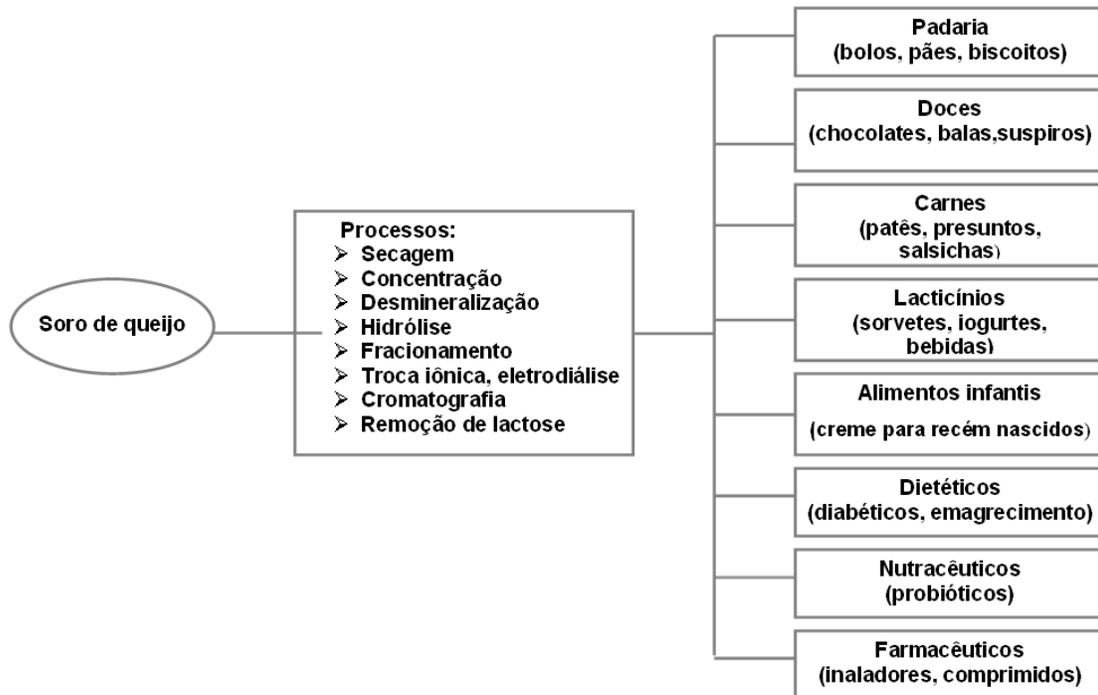


Figura 2.1 - Possibilidades de utilização do soro de queijo (RIBEIRO, 2000)

Para utilização do soro e manutenção de suas características, alguns critérios devem ser levados em consideração:

- O soro a ser utilizado deve ser fresco, o que corresponde utilizá-lo o mais rapidamente possível após a fabricação do queijo que o originou.
- Deve também ser resultante da elaboração de leite coalhado por coalho, com acidez máxima de 12°D, livre de substâncias inibidoras (antibióticos) e que não contenha água de lavagem de massa ou sal.
- Deverá ser tratado ou processado imediatamente sua extração, visto que sua temperatura (32 a 38°C) favorece o desenvolvimento bacteriano. Poderá ser filtrado ou clarificado em desnatadeiras ou padronizadoras para eliminação de partículas de massa ou extração da gordura presente.
- Opcionalmente pode ser resfriado, em torno de 5°C, sendo posteriormente estocado por um período de até 18 horas ou pasteurizado/resfriado para estocagem prolongada (até 48 horas a temperatura de 5°C).
- Antes de sua utilização e após os tratamentos de extração e conservação, deve ser submetido a um tratamento térmico em torno de 70°C, para verificação de sua resistência ao aquecimento (RODRIGUES, 2010).

A caracterização do soro de queijo e sua padronização são importantes para que se possa utilizá-lo como matéria-prima de qualidade, visto que sua composição varia de acordo com a composição do leite trabalhado e do tipo de queijo produzido. A padronização é base para o gerenciamento da rotina do trabalho diário e deve ser conduzida de forma a obter redução do custo e aumento da eficiência do processo de produção (MINAS AMBIENTE/CETEC, 1999).

2.3 – Lactose

A lactose, principal carboidrato do leite e outros produtos lácteos, está presente no leite de mamíferos, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue. É o componente majoritário do extrato seco do leite de vaca, aproximadamente 40 a 50%, e no soro de leite em torno de 70 a 80%. Já no leite humano, a lactose é encontrada na proporção de 7% (GÄNZLE, HAASE e JELEN, 2008). É a mais importante fonte de energia durante o primeiro ano de vida de um ser humano, fornecendo quase metade da necessidade energética total em criança (INSUMOS, 2010).

É um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical α -D-glicose unidos por ligação glicídica β -1,4. Por apresentar ambas as moléculas em forma de anel piranosídico, a lactose deve ser denominada propriamente de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosose. É considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000).

A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas α e β , que são responsáveis pelas diferentes propriedades deste açúcar. Na temperatura do corpo do animal, encontra-se em equilíbrio, com duas partes de α -lactose por três de β -lactose (FREYER, 1972 apud VINHAL, 2001). Quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação (a forma alfa se transforme em beta e vice versa), que influi na sua solubilidade. A estrutura da α -lactose e da β -lactose são apresentadas respectivamente na Figura 2.2.

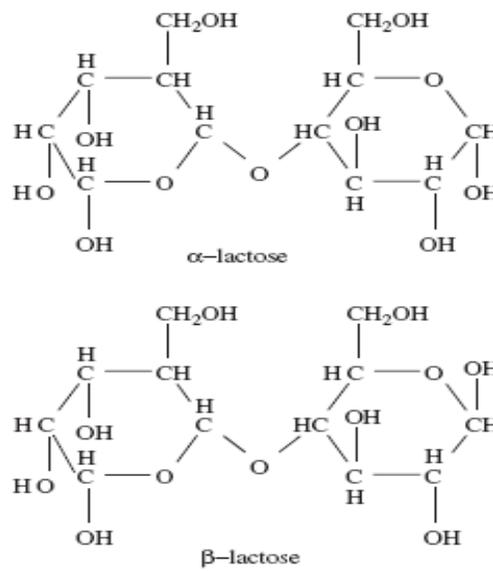


Figura 2.2 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose (GÄNZLE, HAASE e JELEN, 2008)

Como a 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 e 37,3% na forma alfa. As formas alfa e beta possuem características físicas distintas. A α -lactose é menos solúvel que a forma β -lactose, cristaliza em soluções aquosas com temperaturas inferiores a 93,5°C. A β -lactose dissolve-se em água até que a solução se torne saturada. Devido ao fenômeno de mutarotação, 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 à formação dos cristais de α -lactose monohidratada, que são duros e pouco solúveis (NICKERSON, 1974 apud VINHAL, 2001).

O processo de cristalização da lactose é condicionado a vários fatores, como a velocidade de mutarotação das formas α e β , o grau de saturação da solução, viscosidade, pH e a temperatura dos produtos lácteos. A formação de cristais de dimensões superiores a 10 micrômetros contribui para o aparecimento de uma estrutura arenosa nos produtos lácteos, causando sua depreciação (KISKA *et al.*, 1973 apud VINHAL, 2001).

Em relação a outros açúcares, a lactose possui baixo poder adoçante e baixa solubilidade, contudo seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem um alto poder adoçante, além de outras características desejáveis. A Tabela 2.2 relaciona a doçura de vários açúcares e suas solubilidades.

Tabela 2.2 – Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos (ZADOW, 1984)

	Poder adoçante relativo	Solubilidade (g lactose/100 g água)		
		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 lactose possui uma forte tendência a absorver odores e sabores, e é um açúcar higroscópico, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Ela cristaliza em baixas temperaturas, causando muitos defeitos em alimentos lácteos, tais como desenvolvimento de textura arenosa e formação de depósito (CARRARA e RUBIOLO, 1996). Além disso, não é adequada a pessoas que sofrem de intolerância à lactose.

Portanto, estes problemas limitam a utilização do leite/soro, sendo uma alternativa 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 a intolerância à lactose (MAHONEY, 1997).

2.4 – Intolerância a lactose

A intolerância à lactose é uma inabilidade do organismo para digerir completamente a lactose, ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase na mucosa intestinal. Essa condição afeta mais de 75% da população mundial, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa, e mais de 90% em alguns países da Ásia e da África. No Brasil, 20 a 25% da população sofrem de intolerância à lactose, estudos mostram prevalências de 8% a 45% nas regiões sudeste e sul, com aumento significativo na região nordeste, 75% (SPARVOLI, 1989; PRETTO *et al.*, 2002; PEREIRA FILHO e FURLAN, 2004; BULHÕES *et al.*, 2007 apud MOREIRA *et al.*, 2009).

É importante entender a clara diferença existente entre três situações possíveis com relação à lactose, a saber, a intolerância, a alergia e a sensibilidade, as quais são constantemente confundidas. A intolerância é uma reação adversa que envolve a digestão ou o metabolismo, causando inchaço, flatulência, dores abdominais, diarreia, porém não envolve o sistema imunitário. A alergia consiste numa resposta do sistema imunitário a componentes alimentares, geralmente proteínas; é quase que exclusivamente limitada aos recém-nascidos. A sensibilidade evidencia-se como uma resposta anormal, por vezes com uma reação semelhante a da alergia (INSUMOS, 2010).

A deficiência de β -galactosidase é geralmente diagnosticada com base em história de sintomas gastrointestinais, que ocorrem após ingestão do leite; por teste para níveis anormais de hidrogênio na respiração (a fermentação da lactose digerida resulta na produção de hidrogênio); ou medição da atividade dissacaridásica da mucosa intestinal por intubação intestinal (LOMER, PARKES e SANDERSON, 2008).

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.

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. Existem apenas algumas dúzias de casos levantados no mundo todo.

Diminuição enzimática secundária: 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, sendo eliminada à medida que houver recuperação dessas células, mas pode levar à intolerância.

Deficiência primária ou ontogenética: é o tipo mais comum na população, consiste em uma tendência natural do organismo em diminuir a 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) (FARIAS e FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006 apud FREITAS, 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 ontogênica, 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. Uma das grandes preocupações com a diminuição da lactose na alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, que tem no leite e em seus derivados sua maior fonte (UGGIONI e FAGUNDES, 2006).

Segundo O'CONNELL e WALSH (2006), nenhuma das preparações comerciais, 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 e não ajudam a todos os indivíduos da mesma forma. Isto justifica a importância da hidrólise antes da ingestão do alimento.

A hidrólise da lactose é uma das principais tecnologias aplicadas para a produção de produtos lácteos com baixa lactose; ainda existem outras técnicas para remoção da lactose do leite. 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, evitando os inconvenientes e desconfortos causados pela má absorção da lactose (TANRISEVEN e DOGAN, 2002 apud GUIDINI, 2009).

2.5 – Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose é um processo promissor a nível industrial, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato, além oferecer certas vantagens tecnológicas, como a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos (leite condensado, doce de leite, iogurte, sorvete, concentrados de leite ou soro), e o aumento do poder adoçante.

Dois métodos podem ser citados como principais na hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático, conforme Figura 2.3:

- Método ácido: a reação é muito rápida, mas envolve soluções diluídas de ácido fortes como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ($1,0 < \text{pH} < 2,0$; $100 < \text{temperatura} < 150^\circ\text{C}$), e por isto tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois acarreta

alterações no sabor e cor dos alimentos, além causar desnaturação das proteínas do leite.

- Método enzimático: pode ser aplicado no leite ou soro sem um tratamento prévio, a hidrólise é catalisada pela β -galactosidase e se processa em condições amenas de pH e temperatura (30 a 40°C), reduz não só a possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

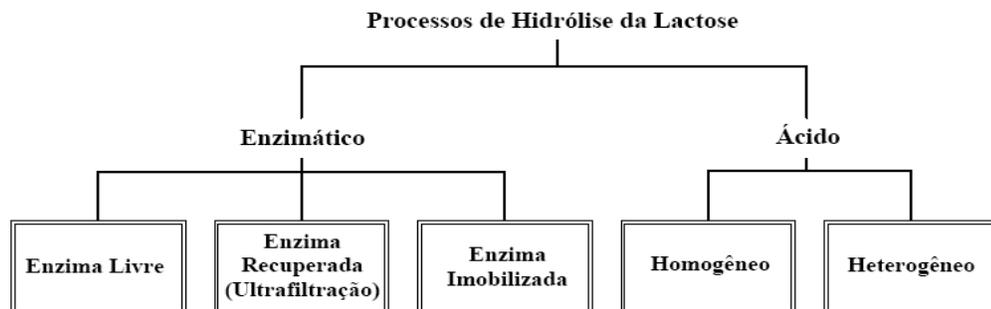


Figura 2.3 - Processos de hidrólise de lactose (HOBMAN, 1984 apud GUIDINI, 2009)

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Nela a enzima β -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação $\beta(1-4)$ da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose conforme Figura 2.4, de grande interesse para a indústria de laticínios (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

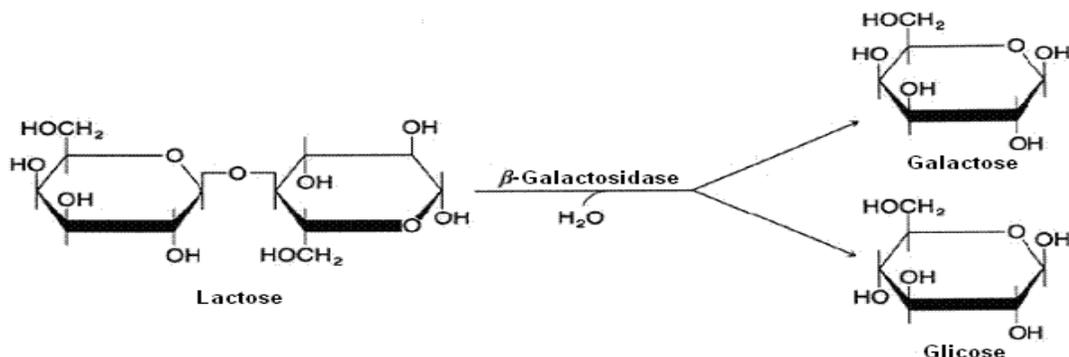


Figura 2.4 - Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase

A doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% da doçura da sacarose. A hidrólise da lactose em leite resulta em economia de sacarose na preparação de produtos açucarados, pois diversos produtos fabricados a partir de leite com baixo teor de lactose requerem pouca ou nenhuma adição de sacarose. O soro de leite hidrolisado é adequado para adocicar produtos lácteos, tais como iogurtes de frutas, sorvetes e bebidas à base de soro. Os xaropes são utilizados em produtos alimentícios processados, como doces e produtos de panificação. Uma das razões para usar a lactose hidrolisada, além de aumentar a doçura e a solubilidade, é a formação de cores e substâncias aromáticas devido à reação de Maillard (INSUMOS, 2010).

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, FURTADO e NETO, 1995; MAHONEY, 1997 apud GUIDINI, 2009) e produzir oligossacarídeos, que favorecem o crescimento bacteriano da microflora intestinal (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; PRENOSIL, STUKER e BOURNE, 1987; ALMEIDA e PASTORE, 2001; JURADO *et al.*, 2002).

Existe também um método de separação cromatográfico para eliminar a lactose do leite, desenvolvido pela empresa finlandesa de laticínios Valio, maior do gênero na Finlândia, e a nível mundial oferece a maior variedade de produtos com baixo teor de lactose ou sem lactose. Com esse processo pode-se obter uma solução sem lactose de proteínas lácteas e seus sais. O leite sem lactose (e sem carboidratos) não apresenta o gosto doce do leite hidrolisado, o que pode agradar alguns consumidores, mas por outro lado este leite possui apenas 40% do valor energético do leite normal (68 calorias) (INSUMOS, 2010).

Inúmeros trabalhos sobre hidrólise de lactose têm sido apresentados na literatura:

BAKKEN *et al.* (1989) utilizaram a lactase extraída de *Aspergillus oryzae* imobilizada em um reator de fluxo espiral para estudar a hidrólise da lactose contida em leite desnatado. Os dados de tempo de residência foram utilizados para avaliar a dispersão longitudinal. A 30 °C e um tempo de residência de 7 minutos, 80% da lactose presente foi convertida em glicose e galactose.

BAKKEN, HILL e AMUDSON (1990) imobilizaram a β -galactosidase obtida de *Aspergillus oryzae* em um reator de fluxo axial-anular para hidrolisar a lactose presente em leite esnatado. Os dados foram obtidos a três temperaturas (30, 40 e 50 °C). Utilizando um tempo de residência de 10 min e a temperatura de 40 °C, 70% da lactose foi hidrolisada utilizando o reator de fluxo axial-anular.

PETERSON, HILL e AMUNDSON (1989 a e b) estudaram a hidrólise da lactose utilizando lactase imobilizada em um reator contínuo de leito capilar operando a 30 °C. Soluções contendo 50, 100 e 150 g de lactose foram utilizadas no reator. A análise dos dados indicou uma conversão da lactose de 24 a 99% para tempos de reação variando de 0,06 a 6,3 min.

A hidrólise da lactose ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos. A Tabela 2.3 compara as propriedades de soluções de lactose pura e hidrolisada

Tabela 2.3 – Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada

Propriedades	Lactose	Lactose 90% hidrolisada	Referência
Solubilidade (g/100 mL) a 25°C	17	55	TALLEY e HUNGER (1952)
Viscosidade (cP) de solução a 50% a 25°C	17	105	HEMME <i>et al.</i> (1979)
Fermentabilidade	Limitada	Boa	-
Taxa relativa de escurecimento	1	3,4	POMERANZ, JOHNSON e SHELLENBERGER (1962)
Doçura relativa à solução de sacarose	30-40	65-90	GUY, EDMONSON (1978); AMERINE, PANGBOM e ROESSLER (1965)
Propriedades umectantes	-	Comparável à sacarose	SHAH e NICKERSON (1978)

Fonte: VINHAL (2001)

2.6 – Enzimas

Enzimas são macromoléculas de natureza protéica ou glicoprotéica, com atividade intracelular ou extracelular, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação necessária para converter o substrato no produto, sem alterar o equilíbrio da reação. 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; FABER, 2004).

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (KRAJEWSKA, 2004). Com enzimas, a catálise é realizada em condições brandas, sob pressão e temperaturas amenas. Além disso, as enzimas são mais seletivas, resultando em um produto mais limpo e um maior rendimento, devido principalmente a estas características são preferíveis a catalisadores químicos (MOFFAT *et al.*, 1994 apud VIEIRA 2009).

As enzimas são utilizadas em ampla variedade de aplicações, nas industriais de alimentos, químicas e farmacêuticas. Também são muito utilizadas para fins analíticos. A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação em 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). A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para viabilizar a utilização das enzimas, pois possibilita sua reutilização e promove um aumento significativo na estabilidade da mesma (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

2.6.1 – Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático β -D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -D-glicose (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH e CLARK, 1997).

Enquanto todas as lactases são β -galactosidase, o inverso não é verdadeiro, uma vez que muitas de células de plantas e órgãos de mamíferos, que não o intestino, tem pouca, ou até mesmo nenhuma atividade sobre a lactose, que é seu substrato específico. As β -galactosidase são distribuídas na natureza de acordo com suas múltiplas funções. Já as lactases, são encontradas essencialmente em micro-organismos, como bactérias, leveduras

(enzima intracelular), fúngicas (enzima extracelular), e no trato intestinal de mamíferos (VINHAL, 2001).

O uso da β -galactosidase para produzir pequenas quantidades de leite com baixo teor de lactose para alimentação de crianças e adultos foi feito durante anos em clínicas médicas. Mas o interesse comercial no produto acentuou-se nos anos sessenta, estimulado pela oportunidade de vender mais leite e pela necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de queijo (MAHONEY, 1997).

2.6.1.1 – 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 (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 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 2.4 estão relatadas fontes de obtenção de β -galactosidase.

Tabela 2.4 – Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase (SHUKLA, 1975)

LEVEDURAS	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>
	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i>
	<i>Candida 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 niger</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Aspergillus phoenecis</i>

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para a utilização na indústria de alimentos, a *Escherichia coli*, por exemplo, é a lactase mais conhecida em níveis estruturais e catalíticos, entretanto, ela não adequada nos processos de alimentos devido ao

fato de oferecer problemas de toxidade, associados aos extratos brutos de coliformes. 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 (GEKAS E LOPEZ-LEIVA, 1985).

As propriedades dependem da fonte de obtenção de cada enzima, conforme pode ser observado na Tabela 2.5, e também de acordo com o método de preparação comercial. (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Embora existam várias informações na literatura sobre o comportamento cinético de β -galactosidases de várias destas fontes, pouco é conhecido sobre sua estrutura protéica e seu mecanismo catalítico, com exceção da *Escherichia coli*, onde foi identificada uma estrutura tridimensional para a enzima desta fonte (JACOBSON, 1993).

Tabela 2.5 – Propriedades de algumas enzimas microbianas (MARIOTTI, 2000)

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

As enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são ativas a pH neutro e, portanto, convenientes para hidrólise do leite e do soro doce. Elas são menos estáveis que as fúngicas e podem ser usadas somente em temperaturas moderadas, e são completamente dependentes de metais como Mn⁺, Mg⁺ e K⁺ (cofatores necessários). Os metais e as enzimas estão envolvidos em uma reação reversível que promove a formação de um complexo enzimático. Esse complexo enzima-íon metálico é 50% mais ativo do que a enzima sozinha

(LADERO *et al.*, 2002 apud VIEIRA, 2009). É relatado que enzimas deste gênero são inibidas na presença de produtos da reação (MATEO *et al.*, 2004 apud VIEIRA, 2009).

As enzimas com pH ótimo ácido e temperatura ótima relativamente alta (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) são convenientes para a hidrólise de lactose em soro ácido. Comparada com a lactase de bactérias e leveduras, as fúngicas são proteínas relativamente pequenas, com ampla faixa de pH de estabilidade, que não requerem íons metálicos para a estabilidade ou atividade, como mostrado na Tabela 2.4, uma grande vantagem em processos alimentícios. A lactase de *Aspergillus oryzae* possui elevada atividade na síntese de oligossacarídeos (YANG e OKOS, 1989 apud VIEIRA, 2009).

A inibição pela galactose (produto) é uma propriedade que depende da fonte da lactase. Segundo SEVERINSEN (1979), a enzima de *Aspergillus niger* é mais fortemente inibida pela lactose do que a enzima de *Aspergillus oryzae*. A inibição pela galactose, segundo a literatura disponível, é do tipo competitiva com o substrato, ou seja, a lactose.

Cabe salientar que apesar de uma extensiva tecnologia tenha sido empregada usando as diversas fontes de β -galactosidase, existe ainda uma grande procura por enzimas com propriedades superiores, tais como melhor estabilidade térmica a pH neutro, ou boa atividade a baixas temperaturas. Algumas fontes originadas de micro-organismos termófilos, são muito interessantes em relação à termoestabilidade da enzima. Enzimas termoestáveis, capazes de permanecer com sua atividade a temperaturas maiores ou iguais a 60°C por prolongados períodos, maiores conversões, ou menores tempos de residência para uma dada taxa de conversão, além de serem menos susceptíveis a contaminação microbiológica (VINHAL, 2001).

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). Devido ao 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, além de conferir uma maior estabilidade (SZCZODRAK, 2000).

2.7 – Imobilização de enzimas

Entende-se por enzima imobilizada, aquela física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente insolúvel e inerte, que não seja essencial a sua atividade. O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas ou uso contínuo, insolubilidade e estabilidade, características desejadas comercialmente.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Porém, não deverão ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo (VIEIRA, 2009).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzima foi em 1916, quando NELSON e GRIFFIN 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 prática de se imobilizar enzimas por diversos protocolos de imobilização vem se expandindo extensivamente nos últimos 30 anos na medida em que seus benefícios vêm sendo reconhecidos e empregadas na produção de alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos biologicamente importantes (MATEO et al., 2007).

No início dos anos 70, pesquisadores da empresa finlandesa Valio, desenvolveram um método para hidrólise da lactose, utilizando uma enzima própria, a Valio IML, que é uma β - galactosidase imobilizada a uma resina adsorvente de qualidade alimentícia. Esse processo rende um grau de hidrolisação de até 95%, com as vantagens adicionais de permitir um processamento contínuo e um baixo custo de enzimas. No centro do sistema Valio tem uma coluna com enzimas, Valio IML (Immobilized Lactase), as quais, sob condições normais de operações, continuam ativas por vários anos (INSUMOS, 2010).

A imobilização enzimática tem um custo elevado, tanto o suporte como as enzimas são caros, mas a imobilização de enzimas se torna viável, a medida que possibilita 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 (ALBAYRAK e YANG, 2002; GÓMEZ *et al.*, 2005; SZYMANSKA *et al.*, 2007):

- Transmite uma maior estabilidade para a enzima, de modo que possa ser utilizado em processos contínuos;

- Permite um grande aproveitamento econômico, pelo fato da possibilidade de sua reutilização;
- Permite processamento de grandes quantidades de substrato, uma vez que pode ser separado e recuperado o produto da mistura de substrato-produto;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- A redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- Proporciona um maior controle do processo catalítico;
- Melhor controle operacional;
- Flexibilidade do design do reator;
- A enzima não contamina o produto.

No entanto, 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).

- 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.
- Efeitos estereoquímicos: uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível.
- Efeitos de partição: 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 massa molecular presente na solução, levando a uma modificação de microambiente.
- 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.

Todos esses fatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e V_m , deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes de acordo com temperatura (KENNEDY e CABRAL, 1987; MARKOGLU, 2003).

Entretanto, os problemas citados acima podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do método de imobilização e suporte adequado, bem como o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliados e otimizados (VIEIRA, 2009).

2.7.1 – Métodos de imobilização de enzimas

Não existe um método universal de imobilização. 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. Cada método tem suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática. 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 (SCOUTEN, 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).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade térmica e em solventes orgânicos (VIEIRA, 2009).

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no encerramento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas (HAIDER e HUSAIN, 2008), conforme pode ser verificado na Figura 2.5.

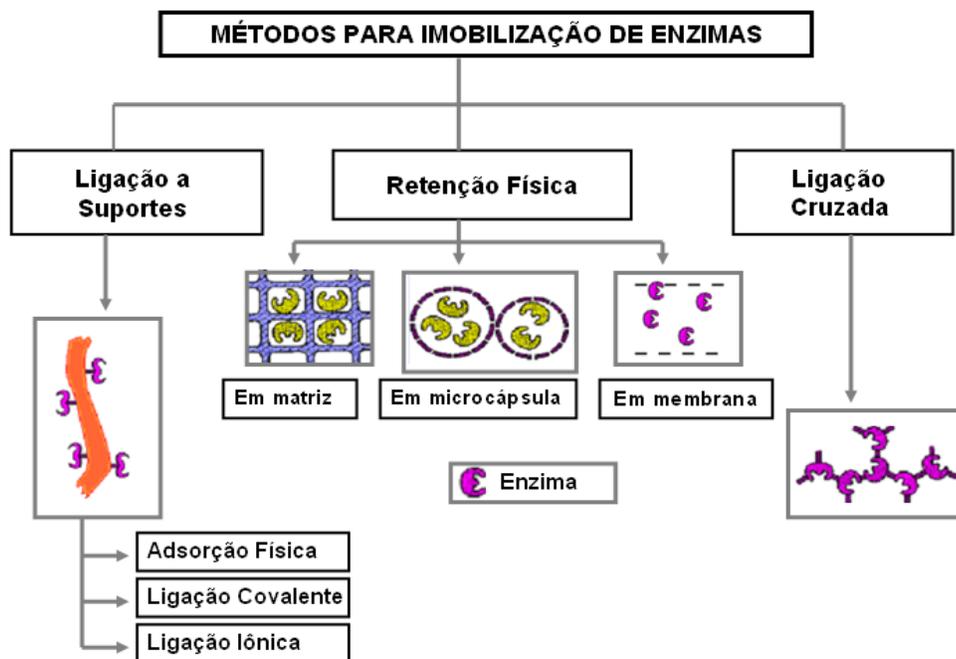


Figura 2.5 - Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004) (adaptado)

2.7.1.1 – Imobilização por retenção física

Este método consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional (matriz), ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Consequentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada. Esse método inclui encapsulação em gel e em fibras e a microencapsulação (ROSEVEAR, KENNEDY e CABRAL, 1987).

- *Encapsulação em gel*: Este método envolve a retenção da enzima no interior de uma matriz polimérica insolúvel no meio da reação. Estes métodos são baseados na mistura da enzima com um fluido precursor do gel e subsequente gelificação por polimerização ou precipitação, ficando a enzima distribuída no interior da matriz, a qual é utilizada preferencialmente as do tipo hidrogel, que podem ser obtidas nas mais variadas formas.

- *Encapsulação em fibras*: Ocorre quando a enzima é envolvida nas microcavidades de fibras sintéticas. As vantagens desse método é que as fibras são resistentes a ácidos fracos,

a alta força iônica e a alguns solventes orgânicos. Mas seu uso também é limitado para substrato de baixa massa molecular (MARIOTTI, 2000).

Uma grande vantagem da encapsulação de enzimas é a grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima no interior do suporte, porém, existem algumas desvantagens que devem ser levadas em conta, como a possível inativação da enzima durante o processo de imobilização, os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa, a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e ainda a restrição de que o substrato tem que ser de baixa massa molecular (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MARIOTTI, 2000).

- *Microencapsulação*: Consiste em aprisionar a enzima em membranas poliméricas semipermeáveis, com grande superfície de contato. É um sistema limitado para substrato com baixa massa molecular, pois este precisa atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Há uma grande vantagem na utilização desta técnica; a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MARIOTTI, 2000).

- *Membrana*: 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 enzimas a serem imobilizadas (KAREL, LIBICKI e ROBERTSON, 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).

2.7.1.2 – Ligação a suportes insolúveis

O método de ligação a suportes insolúveis pode ser dividido em adsorção física, ligação metálica, ligação covalente e ligação iônica:

- *Adsorção física*: O método de adsorção física é o procedimento mais fácil para se preparar um sistema imobilizado, 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).

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e após um tempo de contato, é feita a separação do 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 da enzima durante sua utilização (KENNEDY e CABRAL, 1987). Uma etapa posterior com ligação cruzada contribui para a estabilidade do biocatalisador imobilizado. Reagentes bi ou multifuncionais, como glutaraldeído e disocianato de tolueno podem ser utilizados como agentes de ligação cruzada (WOODWARD, 1984; CAO, 2005).

- *Ligação metálica:* Neste método usa-se um metal de transição como ativador da superfície do suporte, permitindo o acoplamento direto da enzima. Também é um método de simples preparação e força de ligação intermediária. Mantêm a atividade da enzima, porém a estabilidade operacional obtida, quando se trabalha com substratos de alta massa molecular, é baixa, devido aos metais envolvidos (ZANIN e MORAES, 2004).

- *Ligação covalente:* A ligação covalente entre suporte e enzimas é baseada na ligação forte entre moléculas de enzimas e suporte. A seleção das condições para imobilização por 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).

As condições de reação requerida para a formação dessa ligação geralmente não são brandas. Em alguns casos, a ligação altera a estrutura conformacional da enzima e o centro ativo da mesma, resultando em diminuição da atividade e mudança de especificidade de substrato. Por outro lado, 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.*, 2003).

A grande variedade de processos covalentes de imobilização, e de matrizes com grupos químicos capazes de participarem diretamente ou serem ativados para formar as ligações, faz desse método uma aplicação quase geral. A maior dificuldade é o conhecimento da estrutura da enzima, o que dificulta o estabelecimento de uma regra geral para a imobilização (VICENTE, 2000).

- *Ligação iônica*: O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido, que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (FERNANDES *et al.*, 2006).

O procedimento deste método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Como desvantagem, neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, visto que para este método há total dependência destes. As vantagens são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas (WEETALL, 1975).

A combinação de métodos de imobilização de enzimas como, por exemplo, a ligação iônica seguida de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído, é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (MATEO *et al.*, 2006).

2.7.1.3 – 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, que induzem a auto-reticulação das enzimas, resultando assim na formação de uma rede tridimensional de moléculas de enzima (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Como desvantagem do método está à necessidade de grande quantidade de enzima, resultando em baixas retenções da atividade e 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 entecruzamento (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, 2002; SHELDON, 2007 apud GUIDINI, 2009).

Cada método tem suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática de acordo com critérios propostos de imobilização, atividade, rendimento, estabilidade, simplicidade e viabilidade econômica (SCOUTEN, 1987). A Tabela 2.6, apresenta algumas vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 2.6 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização

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

2.7.2 – Suportes para imobilização

De acordo com KENNEDY (1987), na seleção de um suporte para imobilização de enzimas, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como características primordiais tais como:

- **Estabilidade térmica:** Esta é uma característica muito importante, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, o suporte pode sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura.
- **Natureza hidrofílica:** São mais desejáveis suportes com características hidrofílicas, de modo a se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Os suportes de natureza hidrofóbica costumam diminuir a estabilidade, e a atividade da enzima imobilizada, por um mecanismo semelhante à desnaturação das enzimas em solventes orgânicos.
- **Porosidade:** A morfologia do suporte é muito importante, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permite ter uma grande área superficial interna para a imobilização da enzima, e poros com diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e do substrato.
- **Insolubilidade:** É uma característica essencial, não somente para prevenir a liberação da enzima do suporte, mas principalmente para evitar a contaminação do produto pelo suporte dissolvido e pela enzima.
- **Resistência mecânica:** O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes, requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica.
- **Resistência química:** O suporte deve ser quimicamente resistente, nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação, devem possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la.
- **Resistência ao ataque microbiológico:** O suporte deve resistir à degradação por micro-organismos, evitando a liberação da enzima para a solução.

- **Capacidade de carga:** o suporte deve fixar um número elevado de unidades enzimáticas por unidade de área; um pequeno reator com uma grande capacidade catalítica.

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. A possibilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser considerada na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada. Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados), conforme Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Classificação dos suportes de acordo com a composição (KENNEDY, 1987)

ORGÂNICOS		INORGÂNICO		
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro (PC)*
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica (PC)*
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)*
Agar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminosilicatos
Quitosana	Seda	Poliâmidas		Óxido de ferro
Amido		Vinil		Óxido de níquel

* (PC): Porosidade controlada.

Para o uso industrial, os suportes inorgânicos são mais adequados, por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao 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).

Quanto à morfologia, os suportes podem ser: porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como vantagem grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa e permite o acesso das moléculas de produtos e substratos. Os não-

porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato (PEREIRA, 1996).

2.7.2.1 – Imobilização em resinas

Segundo LETCA *et al.* (2004) a utilização de resinas de troca iônica como suporte, são muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores, pois permite um rápido isolamento e separação ao final da reação, reduzindo o custo operacional na separação da enzima imobilizada com o meio. Estes suportes magnéticos são adotados em diferentes indústrias, tais como: indústria alimentícia, farmacêutica, processos químicos e tratamento de resíduos.

As resinas de troca iônica sintéticas são constituídas, na sua maioria, por matrizes de copolímeros como estireno-divinilbenzeno ou fenol-formaldeído, na forma de partículas esféricas. Os grupamentos ácidos ou básicos inseridos nos núcleos de benzeno dos monômeros utilizados dão funcionalidade às resinas (KREMER, 2007).

Entre os grupamentos básicos inseridos nas cadeias das resinas aniônicas, tem-se aminas terciárias que produzem resinas fracamente básicas e os quaternários de amônio, que produzem resinas fortemente básicas. Entre os grupamentos ácidos, o mais comum é o ácido sulfônico, produzindo a resina catiônica fortemente ácida e o menos comum, o ácido carboxílico, produzindo a resina catiônica fracamente ácida (GONZALES, 2010).

Duolite A568 é uma resina de troca aniônica, fracamente básica, granular e altamente porosa, com matriz de fenol-formaldeído policondensado. Sua estrutura hidrofílica, combinada com uma distribuição controlada do tamanho dos poros, torna esta resina mais adequada para ser utilizada como suporte para imobilização de enzimas em muitos bioprocessos. A força iônica, o tamanho das partículas, tamanho e volume de poro da Duolite A568, foram projetados para otimizar a imobilização de enzimas utilizadas em indústrias de amido, gordura, entre outras indústrias de alimentos.

Dentro do vasto campo da biotecnologia, destaca-se o uso de resinas como suporte para imobilização de enzimas. Encontram-se na literatura vários trabalhos, com diferentes enzimas:

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 A568, 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 *Escherichia coli* geneticamente modificada e obteve a melhor atividade para a resina Duolite A568.

MARQUEZ *et al.* (2008) estudaram a imobilização de invertase em resinas de troca iônica para a hidrólise de sacarose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A568.

ÖZDURAL *et al.* (2008) imobilizaram β -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A568, em um reator contínuo. Concluiu-se que a equação que melhor se ajustou ao estudo cinético foi a de Michaelis- Menten.

GUIDINI (2009) estudou a imobilização β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica para a hidrólise de lactose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A568.

Resinas de troca iônica são matrizes sólidas que contém sítios ativos. A operação de troca iônica é a troca entre íons presentes numa solução e os íons sólidos presentes na resina. As resinas aniônicas trocam seus ânions disponíveis (OH^-) com os ânions do meio até atingir o equilíbrio. As resinas catiônicas são semelhantes, trocam cátions (Na^+ ou H^+) com o meio (KREMER, 2007).

2.8 – reatores enzimáticos

Define-se como biorreator, um reator químico convencional adaptado para operar com biocatalisadores (células, enzimas, organelas). O reator enzimático, portanto, é um biorreator onde a reação é catalisada por uma enzima.

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 (<http://www.fcf.usp.br>), conforme Figura 2.6.

Quando a enzima encontra-se na forma livre e solúvel o único reator utilizável é o reator em batelada. Os processos que utilizam enzimas imobilizadas podem ser conduzidos de forma descontínua (batelada) ou contínua. Em alguns casos, estes reatores vêm sendo

operados de forma semi-contínua através da retirada intermitente de parte do meio reacional e adição de nova solução de substrato.

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, MARGARITIS e MENSOUR, 1998; CAO, 2005).

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

- Modo de operação:

Descontínuo: menor custo de investimento, mais indicados para processos de pequena escala, utilizados em caráter multi propósito-menor ociosidade.

Contínuo: elevado custo do investimento, desenhado para um processo específico custo de mão-de-obra reduzido, possibilita automação, apresentam maior produtividade, constância na qualidade dos produtos, fácil controle automático e operacional, estabilização das condições de operação.

- Custo do catalisador frente ao custo total do processo;
- Estabilidade da enzima ao longo do processo;
- 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;
- 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 (LIMA *et al.*, 2001).

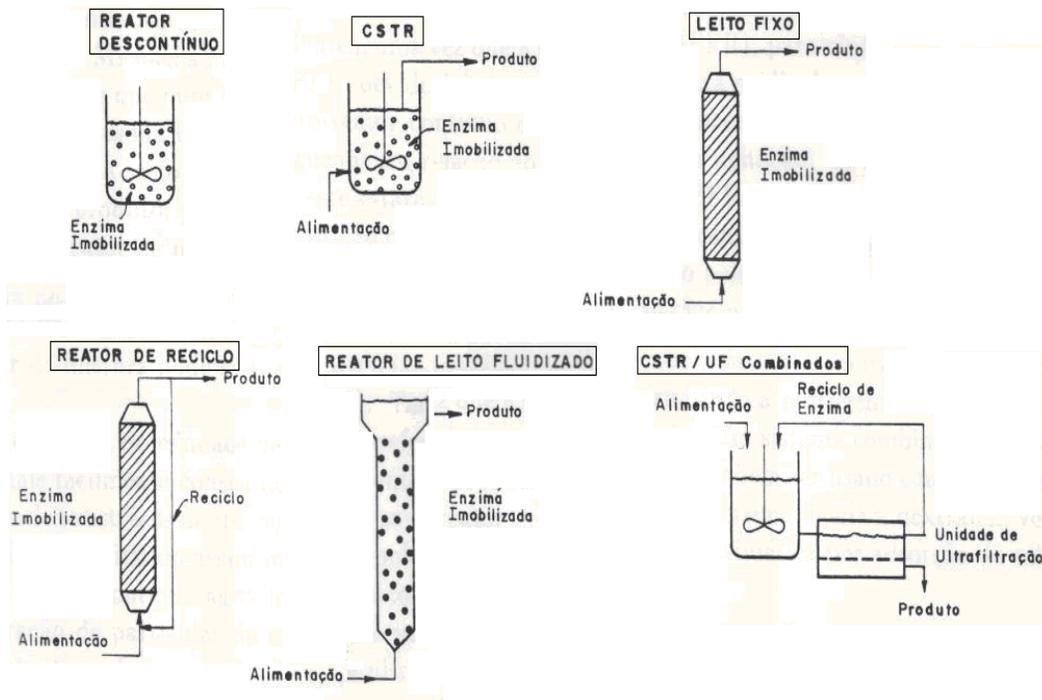


Figura 2.6 - Tipos de reatores enzimáticos (VIETH *et.al.*, 1976 apud RIBEIRO 1989)

A 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 Ideal	Reator batelada de tanque agitado (BSTR)
	Tipo Pistão	Reator batelada com recirculação (BRR)
Contínuo	Mistura Ideal	Reator contínuo de tanque agitado (CSTR)
		Reator contínuo com agitação e com membranas de ultrafiltração (CSTR-UF)
	Tipo Pistão	Reator de leito fixo (PBR), leito fluidizado (PFR)

2.8.1 – 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 promovem a conversão, com concentração de substrato decrescendo e de 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, controle de contaminação e adequação flexível a variações das características da matéria prima (ZANIN, 1989).

O reator batelada de tanque agitado (Batch Stirred Tank Reactor- BSTR) é um tipo de reator muito simples, que apresenta um sistema de agitação. Este reator é usado para processos que apresentam solução de alta viscosidade e para enzimas imobilizadas com baixa atividade.

2.8.2 – 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. Estes reatores 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 (Packed Bed Reactor) é o mais utilizado na catálise com enzimas imobilizadas. Se o perfil de velocidade do fluido é perfeitamente plano na seção transversal, diz-se que o reator opera de forma pistonada (PFR). Num reator desse tipo, existe um fluxo

ordenado de líquido através do leito da enzima imobilizada, numa direção espacial escolhida. O modelo idealizado deste tipo de reator assume que um elemento de fluido entrando no leito movimenta-se pelo reator como um pistão de material que preenche completamente a seção transversal do reator. Num reator real, o escoamento do fluido tende a se diferenciar dessa condição idealizada, devido à existência de gradientes na direção normal ao escoamento, difusão do substrato na direção axial e a existência de gradientes de temperatura normais à direção do escoamento (VIETH *et.al.*, 1976 apud RIBEIRO 1989).

Para CHIBATA (1978), o reator de leito fixo 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. Se ocorrer compactação do leito, é preferível o reator com fluxo ascendente.

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 devem-se tomar alguns cuidados para não haver destruição e decomposição de enzima imobilizada (CHIBATA, 1978). Estes reatores necessitam de uma potência mais elevada para fluidizar o leito, são difíceis de modelar e o projeto do reator deve ser baseado em correções empíricas. Também, os reatores de leito fluidizado são maiores que os de leito fixo correspondentes, devido à expansão do leito de partículas de enzima imobilizada e pode ter que operar com recirculação total ou parcial da solução de substrato, para se conseguir a conversão desejada (VIETH *et.al.*, 1976 apud RIBEIRO 1989).

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

2.8.3 – Problemas operacionais

Os principais problemas operacionais em reatores enzimáticos são:

- Efeitos difusionais;
- Retro-mistura;
- Gradientes de temperatura e pH no interior do reator;
- Variação da pressão interna;
- Queda do desempenho do reator com o tempo.

A queda do desempenho do biorreator com o tempo pode ser devido à perda de enzima pelo reator (desintegração do suporte, solubilização do suporte e/ou liberação da enzima pelo reator-enzima do suporte); interação enzima/substrato deficiente (padrão de fluxo irregular dentro do reator e/ou formação de película sobre as partículas do suporte); perda da atividade enzimática (envenenamento, desnaturação e/ou degradação microbiana); perda do produto (degradação microbiana) e estabelecimento de gradiente de pH no interior do biorreator (LIMA *et al.*, 2001).

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 (GUIDINI, 2009).

2.8.4 – Distribuição de tempos de residência (DTR)

Uma informação importante na prática industrial em reatores químicos (ou biológicos) é o conhecimento da DTR. A determinação da DTR permite diagnosticar problemas de escoamento no reator.

Os principais defeitos são:

- Existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas;
- Curto-circuitagem extrema e subpassagem do fluido;
- Existência de canalização, especialmente em operações em contracorrente;
- Dispersão axial em reatores tubulares;
- Segregação, resultante das condições de mistura.

Outras técnicas além da DTR são necessárias para a previsão do comportamento para o projeto de um reator real, tais como, modelos matemáticos com parâmetros a serem ajustados a partir de informações experimentais.

Esses parâmetros são correlacionados como funções de propriedades do fluido, do escoamento e da configuração do reator. Esses modelos são por natureza semi-empíricos. Em detrimento disto, usa-se um certo modelo, preferencialmente à outro, para um certo tipo de escoamento. Por exemplo, um dos modelos que melhor representa fisicamente o escoamento em um reator com enchimento (leito fixo) é denominado modelo de dispersão axial. Reatores de escoamento em mistura em série são bem representados utilizando-se o modelo de tanques em série (FOGLER, 1999).

2.9 – Cinética enzimática

A cinética enzimática é definida como o estudo da velocidade da reação enzimática e como ela é alterada devido às mudanças nas condições experimentais, principalmente em respeito à concentração de enzima, concentração substratos, inibidores e ativadores, pH, força iônica e temperatura. O estudo da cinética enzimática faz-se necessário para conhecer as melhores condições para a ação da enzima e os efeitos de diversos fatores sobre ela (DIXON e WEBB, 1979; SEGEL, 1993). Dentre os seus objetivos estão:

- Medir as velocidades das transformações que se processam;
- Estudar a influência de condições de trabalho: concentrações de reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e de inibidores naquelas velocidades;
- Correlacionar (equações empíricas ou modelos matemáticos) as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;
- Colaborar na otimização do processo;
- Estabelecer critérios para o controle do processo;
- Projetar o reator mais adequado.

Para todos os procedimentos enzimáticos a velocidade da reação depende das concentrações da enzima e de seu substrato (mantendo-se constantes as demais condições). 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.

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

Sendo:

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 constante de Michaelis-Menten é uma constante dinâmica, ou de pseudoequilíbrio, que expressa a relação entre as concentrações reais no estado estacionário ao invés de concentrações no equilíbrio. K_m é equivalente à concentração de substrato na qual V é igual à metade de V_{\max} , indica a “afinidade” de uma enzima pelo seu substrato (S). Quanto menor for o valor de K_m maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

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

Em todas as reações enzimáticas há sempre a formação de um complexo enzima-substrato, proporcional pelo menos nos primeiros instantes da reação, à concentração da enzima, cuja formação, provavelmente, se dá através de várias fases.

A velocidade inicial (V) de uma reação pode ser relacionada com a concentração de substrato, tal como representado pela curva hiperbólica da Figura 2.7 e pela Equação de Michaelis-Menten (2.1).

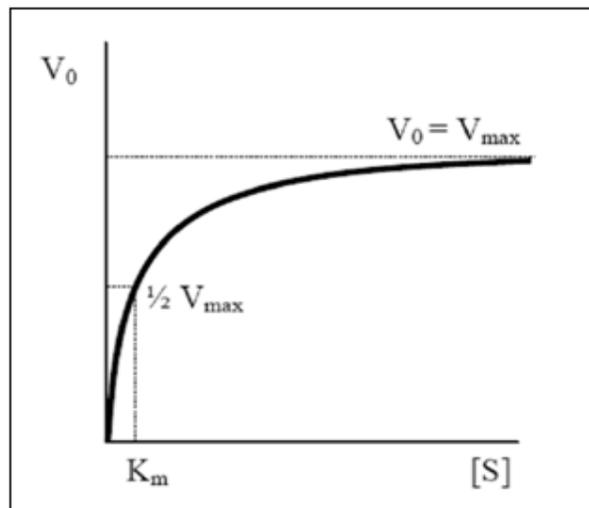


Figura 2.7 - Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten

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 filamentosos. 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).

2.9.1 – Presença de inibidores no meio reacional

A catálise enzimática pode ser impedida por compostos, que, quando presentes no meio, ligam-se diretamente à enzima, impedindo sua ação, logo reduzindo a velocidade da reação. Os inibidores competitivos são substâncias que têm forma estrutural suficientemente semelhante à do substrato para poderem ligar-se ao sítio ativo da enzima. Faltam-lhe, entretanto, grupos químicos que pudessem levar a reação a cabo; o resultado da sua presença no meio de reação é o estabelecimento de uma competição entre as moléculas do inibidor competitivo e as do substrato pela ligação com o sítio ativo da enzima (MARIOTTO, 2006).

A inibição enzimática pode ser classificada em dois tipos: inibição reversível e inibição irreversível. Na inibição reversível a atividade enzimática é recuperada com a remoção do inibidor. É caracterizada por um equilíbrio entre o inibidor e a enzima definido por constante de equilíbrio, K_i (FURIGO e PEREIRA, 2001).

A inibição reversível 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 descrita da mesma maneira que a combinação com o substrato, embora o inibidor não seja quimicamente transformado em produto.

-Inibição não-competitiva: é o tipo de inibição em que o intercepto ($1/V_m$) 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. .

-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 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 monoiodoacético ou sua amina, a iodoacetamida, que bloqueia grupos sulfidrícos da enzima por reação de alcoilação. Além desses compostos, devem ser mencionados os inibidores organofosforados.

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).

As Equações dos modelos cinéticos estão representadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 – Alguns modelos cinéticos enzimáticos (SANTOS, LADERO, GARCÍA-OCHOA, 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 incompetitiva 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)

A reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase de várias fontes, tanto na forma livre como imobilizada, tem sido modelada em termos de inibição pelos produtos, especialmente pela galactose. Na grande maioria das citações, a galactose atua como um inibidor competitivo, ao passo que a glicose não exerce efeito inibidor:

GUIDINI (2009) estudou a imobilização β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica, neste estudo o modelo cinético que melhor se ajustou aos resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada em Duolite A568 foi o modelo de Michaelis-Menten, com inibição competitiva por galactose. Os valores dos parâmetros V_m , K_m e K_i foram 0,77 U, 35,30 mM (12,07 g/L) e 27,44 mM (4,94 g/L).

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.

LADERO, SANTOS e GARCÍA-OCHOA (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.

PETERSON, HILL e AMUNDSON (1989a e b) estudaram o desempenho de um reator de leito capilar na hidrólise da lactose dissolvida em uma solução tampão de acetato e modelaram a reação de hidrólise bem como a desativação da enzima durante o tempo de operação. O modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto foi utilizado para obter os parâmetros cinéticos da hidrólise no reator.

2.9.2– Influência do meio na atividade e estabilidade das enzimas

A estrutura e a forma do sítio ativo são decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isto torna a atividade e estabilidade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e da temperatura (MARIOTTO, 2006).

2.9.2.1– Influência do pH

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 (SMITH *et al.*, 1985).

O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como a temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração do substrato, cofatores e concentração de enzima (SEGEL, 1993).

Os vários aminoácidos que compõe a proteína possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são frequentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim a enzima para estar cataliticamente ativa só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. A taxa da reação aumenta com o pH até um valor ótimo a partir do qual a taxa decresce, ou devido à desnaturação ou a existência de estados de ionização inadequados na enzima (SEGEL, 1993; DIXON e WEBB, 1979).

Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Esse pH ótimo depende do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga (MARIOTTO, 2006).

A Figura 2.8 apresenta uma curva experimental da V_0 com relação à variação do pH (curva A) e a curva de estabilidade (curva B) para uma enzima.

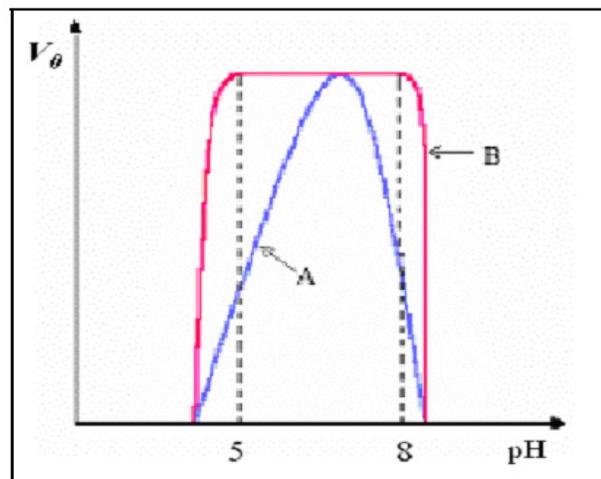


Figura 2.8 - Efeito do pH na atividade e estabilidade de uma enzima, curva A: atividade da enzima, curva B: V_0 em pH 6,8 após incubação em outros valores de pH

Observa-se que a incubação da enzima em pH 5 ou pH 8 não produz nenhum efeito na atividade medida em pH 6,8. Então, o declínio da atividade entre pH 6,8 e 8 e entre pH 6,8 e 5 deve resultar da constituição de uma forma iônica não adequada da enzima e/ou substrato.

Quando a enzima é incubada em $\text{pH} > 8$ ou $\text{pH} < 5$, a atividade total não é obtida em $\text{pH} 6,8$. Portanto, parte do declínio na atividade acima de $\text{pH} 8$ e abaixo de $\text{pH} 5$ resulta em uma inativação irreversível da enzima. O efeito do pH sobre a afinidade pode ser eliminado utilizando-se altas concentrações de substrato de modo a se saturar a enzima em todos os valores de pH (MARIOTTO, 2006).

2.9.2.2 – Influência da temperatura

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: no princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante termolábeis, desencadeia-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida. A temperatura que provoca desnaturação está, geralmente, pouco acima de sua temperatura ótima (MARIOTTO, 2006).

A melhor temperatura de operação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo. A temperatura de estabilização da enzima depende de outros fatores que incluem o pH , a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos freqüentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor (SEGEL, 1993).

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, 1993). 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.

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

Em que:

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 intervalo de validade do referido modelo é bastante limitado, pois qualquer temperatura significante superior aquela do ambiente biológico natural, pode desnaturar a enzima (BAILEY e OLLIS, 1986).

Na reação enzimática a constante de velocidade k é função crescente da temperatura do sistema. A Figura 2.9 representa a Equação 2.8 (MARIOTTO, 2006):

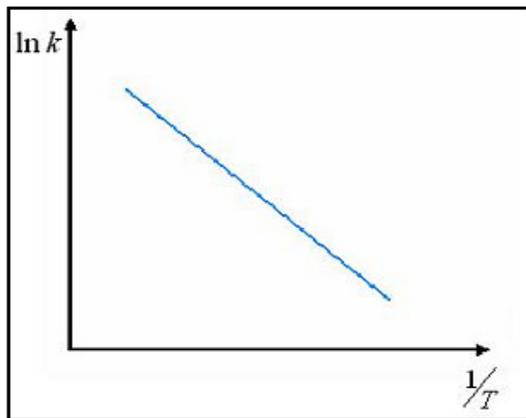


Figura 2.9 - Representação da variação da constante de velocidade k com a temperatura absoluta T

Lembrando que as enzimas são termolábeis, ao mesmo tempo em que ocorre a reação enzimática, desenvolve-se também a reação de inativação térmica da enzima.

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. A estabilidade das enzimas é um dos fatores primordiais na determinação da possibilidade de sua aplicação em muitos processos biotecnológicos

(COLAÇO *et al.*,1992). Na maioria dos estudos considera-se a cinética de primeira ordem para relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura (RIBEIRO 1989).

Supondo desativação de primeira ordem, tem-se a Equação 2.9.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A \quad (2.9)$$

Sendo A: Atividade da enzima ativa.

Integrando a Equação 2.9 para o intervalo de tempo t=0 até t, obtém-se a Equação 2.10.

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_d * t \quad (2.10)$$

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 (A/A_0), da Equação 2.10, 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. Da Equação 2.10, e com o conceito de meia vida, tem-se a Equação 2.11.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.11)$$

Por outro lado, k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.12.

$$k_d = A * \exp\left(\frac{-E_d}{R * T}\right) \quad (2.12)$$

A Equação 2.12, na forma linearizada, pode ser representada através da Equação 2.13, sendo possível determinar a energia de ativação do fenômeno de desativação térmica da enzima estudada.

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} * \frac{1}{T} \quad (2.13)$$

Sendo:

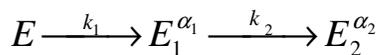
k_d = constante da taxa da reação de desativação térmica à temperatura T;

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

T = temperatura absoluta;

R = constante da lei dos gases.

Segundo HENLEY e SADANA (1985), o modelo de desativação de primeira ordem é frequentemente adequado para representar a cinética de desativação enzimática. No entanto, através de uma revisão na literatura, verifica-se que a taxa de decréscimo em atividade não é sempre constante. Esses 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, encontrados nesta literatura, em várias categorias diferentes. 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 2.14 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).

$$A = \left[1 + \frac{\alpha_1 k_d}{k_2 - k_d} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_d} \right] \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_d}{k_2 - k_d} \right) (\alpha_1 - \alpha_2) \exp(-k_2 t) + \alpha_2 \quad (2.14)$$

Se k_2 for igual a zero a Equação 2.14 se reduz à 2.15.

$$A = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t) + \alpha_1 \quad (2.15)$$

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1 – Enzima

Neste trabalho utilizou-se a enzima β -galactosidase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*. Essa enzima foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Chemical CO (Sigma-Aldrich), lote 097K1349, 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 definida como 1 μ mol do substrato reagido por minuto a pH 4,5 e temperatura de 30°C. Os reagentes utilizados nos experimentos apresentavam grau de pureza analítica.

3.1.2 – Suporte para imobilização

O suporte utilizado para imobilização foi a resina de troca iônica Duolite A568 (Rohm Haas), doada pela Dow Chemical Company. Uma amostra desta resina está apresentada na Figura 3.1.



Figura 3.1 – Resina Duolite A568 empregada para imobilização da enzima β -galactosidase

Duolite A568 é um trocador aniônico fracamente básico, baseado em ligação cruzada de fenol-formaldeído, usado como suporte (orgânico sintético) de enzimas em aplicações de bioprocessos, cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 3.1 (Rohm Haas).

Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A568 (Rohm Haas)

Características	Propriedades
	Matriz: Fenol-formaldeído
Estrutura hidrofílica	Grupo funcional: Amina terciária
Alta porosidade	Forma física: Granular
	Cor: Verde a cinza
Distribuição do tamanho e volume dos poros	pH: 7,0 - 9,0
	Tamanho de poro: 15 a 25 nm
	Volume de poro: 0,78 a 1 mL/g
	Densidade: 1,10 a 1,14 g/mL
	Capacidade total de troca iônica: ≥ 1,20 equivalente/litro

3.1.3 – Substratos

Para este trabalho utilizou-se os seguintes substratos:

- Solução de lactose em tampão acetato pH 4,5;
- Leite desnatado de marca CALU (utilizado “*in natura*”);
- Soro de leite (preparado conforme item 3.2.4).

3.1.4 – Unidade experimental

As unidades experimentais foram montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química, onde foram realizados os experimentos com a enzima imobilizada. Estando descritas a seguir:

3.1.4.1 – Reator tipo cesta (batelada)

A unidade experimental, mostrada na Figura 3.2 e 3.3, consistia em um microrreator de mistura, de volume útil de 200 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostaticado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas de enzima imobilizada 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 6,2 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro.

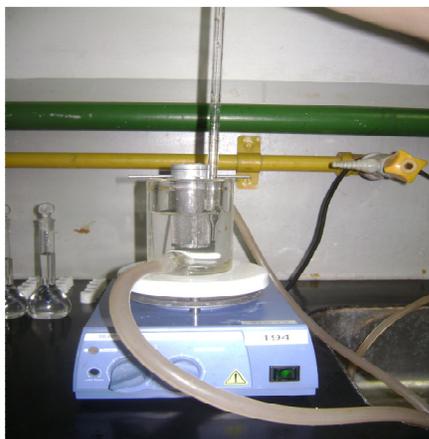


Figura 3.2 – Reator tipo cesta

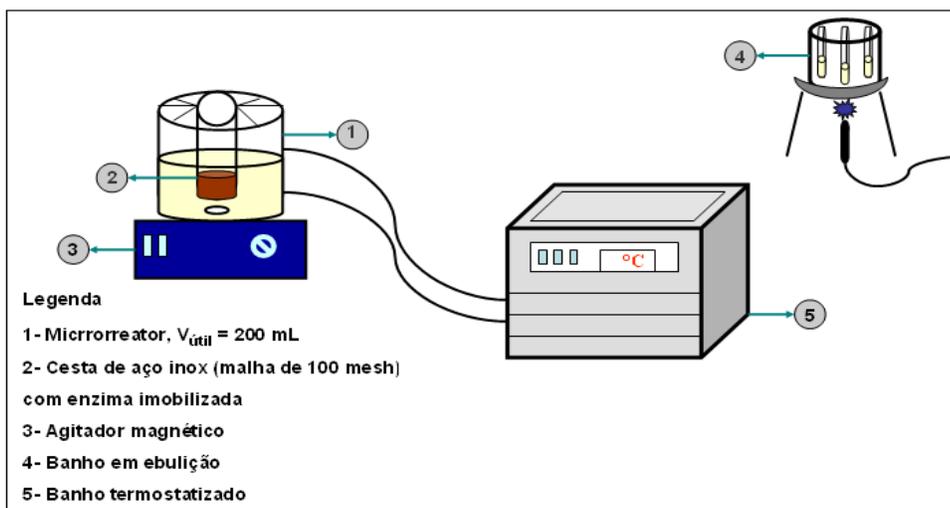


Figura 3.3 – Representação esquemática da unidade experimental com reator tipo cesta

3.1.4.2 – Reator de leito fixo (contínuo)

A unidade experimental, mostrada na Figura 3.4 e 3.5, consistia em um microrreator tipo leito fixo, de volume útil de 21,93 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado para controle da temperatura. O reator tipo leito fixo apresentava 14,55 cm de altura e 1,38 cm de diâmetro. A enzima imobilizada foi empacotada no reator, ocupando um volume de 16,93 mL, o substrato era bombeado com auxílio de uma bomba peristáltica, com escoamento ascendente.

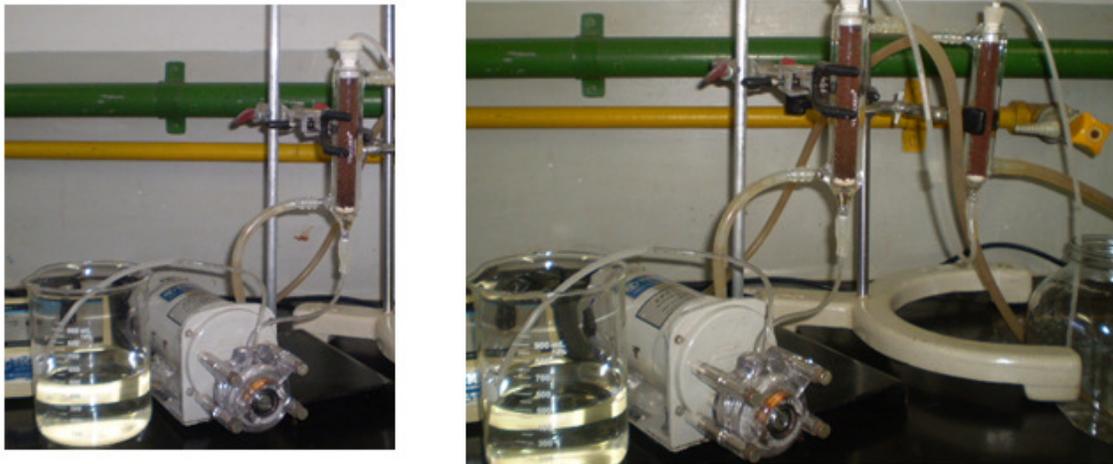


Figura 3.4 – Reator de leito fixo e dois reatores de leito fixo em série

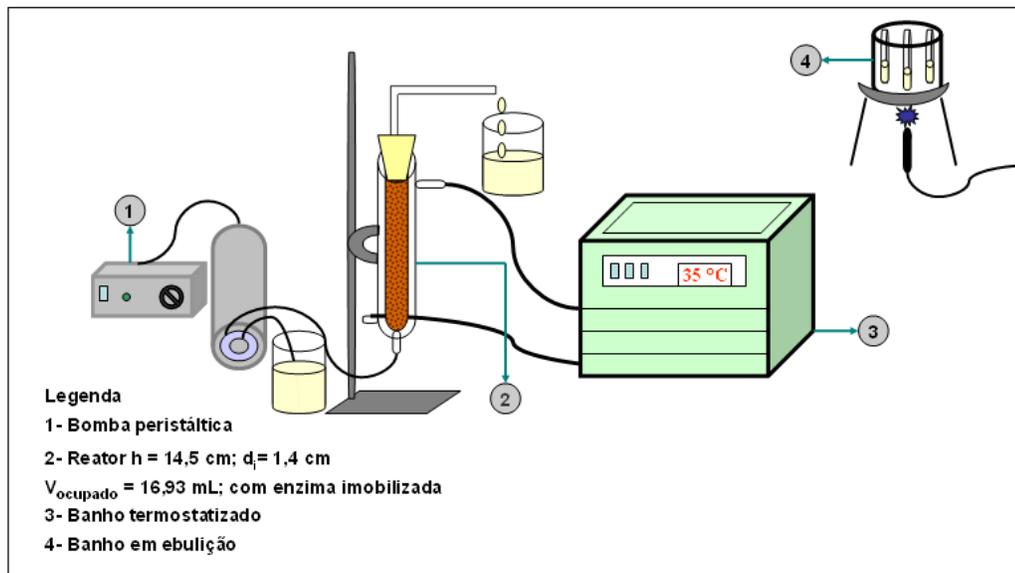


Figura 3.5 – Representao esquemática da unidade experimental com reator de leito fixo

3.2 – Métodos

3.2.1 – Preparação do biocatalisador

3.2.1.1 – Ativação do suporte

A resina Duolite A568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa sob agitação de 50 rpm. A seguir foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio 1M, nas mesmas condições do tratamento ácido. As resinas foram lavadas com água destilada entre os tratamentos e no final do processo, e secas a temperatura ambiente.

3.2.1.2 – Imobilização da β -galactosidase seguido do processo de ligação cruzada:

Foi utilizado o procedimento de imobilização seguido de ligação cruzada, desenvolvido por GUIDINI (2009):

- a) Para os testes em reator batelada, na imobilização incubou-se 10 mL de solução de β -galactosidase a 5 g/L (em tampão acetato pH 4,5) e 0,5 g de Duolite A568 ativada; com tempo de imobilização de 12 h, agitação de 50 rpm à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora rotativa. Na sequência a enzima imobilizada foi lavada com tampão acetato pH 4,5 e realizado o processo de ligação cruzada, para qual adicionou-se 2,5 mL de glutaraldeído na concentração de 3,5 g/L, utilizando um tempo de reticulação de 1,5 h.
- b) Para os testes em reator de leito fixo, na imobilização incubou-se 110 mL de solução de β -galactosidase a 10 g/L (em tampão acetato pH 4,5) e 5,5 g de Duolite A568 ativada; com tempo de imobilização de 12 h, agitação de 50 rpm à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora rotativa. Na sequência a enzima imobilizada foi lavada com tampão acetato pH 4,5 e realizado o processo de ligação cruzada, para qual adicionou-se 27,5 mL de glutaraldeído na concentração de 3,5 g/L, utilizando um tempo de reticulação de 1,5 h.

3.2.2 – Determinação da atividade de β -galactosidase imobilizada pelo método das taxas iniciais

Para os experimentos em reator batelada realizados com β -galactosidase imobilizada para hidrólise de lactose usou-se o método das velocidades iniciais da reação para determinar a atividade catalítica.

A reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase era realizada em um microrreator conforme item 3.1.4.1, com um volume de 100 mL de solução de lactose na concentração dos experimentos, nas condições de pH, temperatura desejada e agitação definidas. 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 enzima imobilizada.

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

Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de três em três minutos (3, 6, 9, 12 e 15 min). Cada amostra era colocada em um tubo de ensaio, o qual era tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada 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 de lactose, era obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. A atividade foi calculada com a curva de calibração, conforme Anexo A.

3.2.3 – Procedimentos analíticos

3.2.3.1 – Determinação de glicose

As análises de glicose foram realizadas por espectrofotometria, pelo método da glicose oxidase, conforme procedimento descrito por TOMAZ (1998). A metodologia experimental e as curvas padrões para determinação da concentração de glicose estão representadas no Anexo A.

3.2.3.2 – Determinação de lactose

A lactose presente no leite “*in natura*” e no soro de leite desnatado e desproteínizado foi quantificada por titulação com licor de Fehling, conforme procedimento do Instituto Adolfo Lutz, 1985, descrito no Anexo B.

3.2.4 – Preparação do soro de leite

O soro de leite foi preparado pela desproteínização do leite desnatado de marca CALU. Adotou-se o procedimento descrito PORTO (2001): o leite desnatado era aquecido a 92°C e seguir era adicionado ao mesmo 6 mL de solução de ácido acético (20% v/v) por litro de leite. Após a separação das proteínas, o meio foi filtrado e ajustado o pH a 4,5 com a mesma solução de ácido acético.

3.2.5 – Influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada

Este estudo teve por objetivo avaliar a influência da temperatura na atividade da enzima β -galactosidase imobilizada e determinar a energia de ativação da reação de hidrólise da lactose. Os experimentos foram realizados, utilizando concentração de lactose de 50 g/L em tampão acetato pH 4,5, e biocatalisadores preparados conforme item 3.2.1.2-a, variando-se a temperatura do meio reacional de 10 a 80°C. As atividades enzimáticas foram determinadas pelo método de velocidades iniciais de reação conforme item 3.2.2, e a glicose foi dosada conforme item 3.2.3.1. Baseado nos resultados de atividade enzimática em função da temperatura foi determinada a energia de ativação da reação de hidrólise utilizando o *software Origin 7.0* e a Equação 3.1:

$$\ln(A) = \ln(A^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.1)$$

Sendo:

A = Atividade enzimática; A* = fator de frequência para a reação

E_a = energia de ativação do processo; T = temperatura absoluta.

3.2.6 – Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada

Amostras da enzima imobilizada, conforme item 3.2.1.2-a, foram colocadas em 50 mL de tampão acetato pH 4,5, e incubadas em um banho termostatizado na faixa de temperatura de 55 à 65°C. Para cada temperatura de incubação, os conjuntos de partículas imobilizadas foram retirados do banho em intervalos adequados de tempo (2 em 2 minutos para 65°C, 4 em 4 minutos para 63°C, 7 em 7 minutos para 60°C, 13 em 13 minutos para 57°C, 20 em 20 minutos para 55°C). Estas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e determinada a atividade residual pelo método das velocidades iniciais de reação (item 3.2.2). Neste experimento foi utilizado uma concentração inicial de lactose de 50 g/L em tampão pH 4,5 a 35°C, a glicose foi dosada conforme item 3.2.3.1. Os resultados de atividade enzimática residuais em função do tempo de incubação, para cada temperatura, foram ajustados aos modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.2), e em série em uma única etapa (Equação 3.3). Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, utilizando o *software Statistica 7.0*, (Moré, 1977), para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes (HENLEY e SADANA, 1985):

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_{d1} \cdot t)} \quad (3.2)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \cdot e^{(-k_{d1} \cdot t)} + \alpha_1 \quad (3.3)$$

Sendo:

$$\frac{A}{A_0} = \text{atividade relativa}$$

$$\alpha_1 = \frac{E_1}{E} \quad - \text{razão entre a atividade específica do estado final (E}_1\text{) para uma modelagem de}$$

inativação com uma única etapa e a atividade inicial E.

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos resultados experimentais às Equações de desativação térmica (Equações 3.2

e 3.3) utilizando a Equação 3.4. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela Equação 3.5 por uma regressão linear.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.4)$$

$$\ln(k_d) = \ln a - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.5)$$

Sendo: k_d = constante cinética de desativação, a = fator de frequência para a reação, E_d = energia de ativação do processo de desativação térmica, T = temperatura absoluta

3.2.7 – Estudo da estabilidade de estocagem da enzima imobilizada

Neste estudo, o biocatalisador preparado conforme item 3.2.1.2-a foi estocado a 4°C em tampão pH 4,5 por um período de 90 dias. A atividade residual foi determinada a cada 5 dias, pelo método das velocidades iniciais (3.2.2), sob as seguintes condições de reação: temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 4,5, concentração inicial de lactose de 50 g/L. A glicose foi dosada conforme item 3.2.3.1, a cada cinco dias.

3.2.8 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na hidrólise de lactose pela enzima imobilizada em reator de leito fixo

Foi realizado um estudo do efeito conjunto das variáveis, concentração de lactose e vazão de alimentação, na taxa média de reação de hidrólise e na conversão da lactose em glicose e galactose, por β -galactosidase 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 21,3 (- α) a 78,7 g/L (α) para a concentração de lactose e de 0,6 (- α) a 11,4 mL/min (α) para a vazão de alimentação. Dados da literatura (CARRARA e RUBIOLO, 1997) foram utilizados para selecionar as faixas adotadas para as variáveis. O biocatalisador foi preparado conforme item 3.2.1.2-b, os experimentos foram realizados em reator de leite fixo, operando em regime contínuo, com escoamento ascendente, (item 3.1.4.2). Todos os experimentos foram realizados com temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras eram retiradas na saída do reator, a

cada 10, 20 e 30 minutos, após circulação de no mínimo uma hora para obtenção do estado estacionário. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = concentração de lactose e X_2 = vazão de alimentação) estão apresentados na Tabela 3.2.

As equações de codificação de concentração de lactose e vazão de alimentação são apresentadas nas Equações 3.6 e 3.7, respectivamente:

- Concentração de lactose (g/L):

$$X_1 = \frac{\text{Lactose} - 50}{25} \quad (3.6)$$

- Vazão de alimentação (mL/min):

$$X_2 = \frac{\text{Vazão} - 6}{4,7} \quad (3.7)$$

Tabela 3.2 –Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise e na conversão da lactose

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	Lactose (g/L)	Vazão de alimentação (mL/min)
1	25 (-1)	1,3 (-1)
2	25 (-1)	10,7 (1)
3	75 (1)	1,3 (-1)
4	75(1)	10,7 (1)
5	21,3 (- α)	6 (0)
6	78,7 (α)	6 (0)
7	50 (0)	0,6 (- α)
8	50 (0)	11,4 (α)
9	50 (0)	6 (0)
10	50 (0)	6 (0)
11	50 (0)	6 (0)

3.2.9 – Hidrólise da lactose em dois reatores de leite fixo em série

O biocatalisador foi preparado conforme item 3.2.1.2-b, os experimentos foram realizados em dois reatores de leite fixo em série, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas seguintes condições: solução de lactose 50 g/L em tampão acetato pH 4,5, vazão de alimentação de 6 mL/min, temperatura de reação de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras eram retiradas na saída do primeiro e segundo reator, a cada 10, 20 e 30 minutos, após circulação de no mínimo uma hora para obtenção do estado estacionário. Utilizou-se este mesmo procedimento para os testes preliminares de hidrólise da lactose do soro de leite (preparado conforme item 3.2.4) e do leite desnatado “*in natura*”.

3.2.10 – Estudo da estabilidade operacional da enzima imobilizada

A viabilidade de reutilização da enzima imobilizada foi analisada durante 30 dias. O biocatalisador foi preparado conforme item 3.2.1.2-b, colocado no reator de leite fixo, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas seguintes condições: temperatura ambiente, solução de lactose na concentração de 50 g/L em tampão acetato pH 4,5, vazão de alimentação de 0,3 mL/min. A atividade residual foi determinada diariamente, a glicose foi dosada pelo método de glicose-oxidase (item 3.2.3.1).

3.2.11 – Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR)

Para o caso do estudo da hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada estudou-se os modelos de dispersão axial e PFR. O modelo de dispersão axial representa de maneira mais apropriada o escoamento do afluente. Para rastrear o comportamento do fluido no reator foi usado um traçador, que neste caso foi uma solução de cloreto de sódio P.A. (0,05 M) e usando como solvente água destilada. A massa de reagente adicionada foi definida em função do volume do biofiltro e do tempo de residência proposto.

Para efetuar o cálculo das dispersões axiais cinco vazões diferentes foram estudadas 0,6; 1,3; 3,5; 6,0 e 12 mL/min.

A solução de cloreto de sódio 0,05 M foi bombeada de um reservatório externo para a entrada do biorreator por de uma mangueira de 3 mm de diâmetro. O reator iniciou o seu

regime de operação a partir deste procedimento, com a injeção de traçador caracterizada por um estímulo do tipo degrau positivo.

Um condutivímetro foi acoplado à saída da coluna para medir a condutividade elétrica do efluente em intervalos de tempo pré-estabelecidos. As medidas eram tomadas em intervalos de tempos diferentes de acordo com a vazão de alimentação utilizada.

3.2.11.1 – Cálculo do tempo de residência médio

O tempo de residência médio foi determinado por meio da função F , adimensionalizada pela determinação da área que a curva $F(t)$ delimita com o eixo das ordenadas (área acima da curva definida por $F(t)$ em função do tempo). A expressão da função F (distribuição cumulativa da concentração do traçador) foi escrita conforme Equação 3.8.

$$F(t) = \frac{\lambda_t - \lambda_0}{\lambda_\infty - \lambda_0} \quad (3.8)$$

Sendo:

λ_t a Condutividade elétrica na saída do reator em cada instante; λ_0 a Condutividade elétrica na saída do reator no tempo inicial e λ_∞ a Condutividade elétrica na saída do reator no tempo final.

A área acima da curva foi calculada pela diferença entre a área total e a área abaixo da curva, calculada pelo *software Origin 7.0*[®].

O tempo de residência (τ_{teo}) foi calculado por meio da Equação 3.9 (tempo de residência ideal).

$$\tau_{\text{teo}} = \frac{\varepsilon V_R}{v} \quad (3.9)$$

Sendo:

ε = porosidade do reator; V_R volume do reator (L^3) e v é a vazão de alimentação utilizada ($L^3.T^{-1}$).

3.2.11.2 – Cálculo da variância

A variância σ^2 , que representa o efeito de dispersão da distribuição, trata-se de um parâmetro estatístico que foi estimado pela Equação 3.10:

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau)^2 E(t) dt \quad (3.10)$$

As curvas de E(t) foram obtidas pela Equação (3.11):

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (3.11)$$

A derivada da função F(t) foi calculada pelo *software Origin*[®], após o ajuste aos dados de F(t) por uma função sigmóide com coeficiente de determinação superior 0,998 para evitar o aparecimento de erros. O tempo médio de residência foi calculado utilizando a função E(t) para checar a existência ou não de erros, devido à realização da derivação da função F(t).

3.2.11.3 – Cálculo do coeficiente de dispersão axial

O coeficiente de dispersão axial foi calculado utilizando a DTR e considerando a equação apresentada por LEVENSPIEL (1974), para tanques fechados com grande dispersão (caso utilizado neste trabalho) e dado pela Equação (3.12):

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = 2 \frac{1}{Pe} - 2 \left(\frac{1}{Pe} \right)^2 (1 - e^{-Pe}) \quad (3.12)$$

O número de Peclet é considerado a razão entre a taxa de transporte por convecção e a taxa de transporte por difusão ou dispersão e é dado pela Equação 3.13:

$$Pe = \frac{uL}{D_{ax}} \quad (3.13)$$

Desta forma, conhecendo o Peclet pela Equação 3.6 calcula-se posteriormente o coeficiente de dispersão axial.

3.2.12 – Estudo cinético

Para este estudo, o biocatalisador foi preparado conforme item 3.2.1.2-b, os experimentos foram realizados em reator de leito fixo, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas seguintes condições: solução de lactose na concentração de 50 g/L em tampão acetato pH 4,5, temperatura de reação de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, as faixas de vazão de alimentação estudadas foram 0,6; 1,3; 3,5; 6,0 e 12 mL/min. A taxa média de reação e a conversão foram determinadas pela dosagem de glicose conforme item 3.2.3.1.

3.2.12.1 – Modelagem matemática

OLAFADHAN (1989) desenvolveu a equação da continuidade para uma reação isotérmica ocorrendo sobre condições difusivas em um reator de leito fixo contendo enzima imobilizada como mostra a Equação 3.14.

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = -U_f \frac{\partial C_s}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 C_s}{\partial z^2} + D_r \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} - \frac{1}{r} \frac{\partial C_s}{\partial r} \right) - (-rs) \quad (3.14)$$

A equação de balanço proposta para a descrição do modelo matemático seguiu as considerações:

- As difusões longitudinal e radial são expressas pela lei de Fick;
- A atividade da enzima é uniforme na partícula, e homogênea ao longo do reator (isto e a desnaturação térmica da enzima é negligenciável);
- O reator em coluna tem partículas suficientes por unidade de volume para uma adequada representação contínua;
- Partículas pequenas foram usadas para eliminar difusão interna;
- Reator atingiu o estado estacionário, isto é, a variável analisada não foi dependente do tempo;
- Temperatura constante;
- Enchimento com partículas cilíndricas;
- Fluxo e concentração de substrato e afluentes constantes;

- O sistema era constituído apenas de duas fases (fase líquida e sólida);
- Usualmente a dispersão radial pode ser negligenciada em comparação com a dispersão axial em que a razão diâmetro por comprimento da coluna é pequeno (como considerado neste estudo);

Adotando-se estas hipóteses e considerando escoamento em fluxo pistonado com dispersão axial, modelo considerado pseudo-homogêneo, a Equação 3.14 se resume na Equação 3.15 com suas respectivas condições de contorno.

$$-U_f \frac{\partial C_s}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 C_s}{\partial z^2} - (-r_s) = 0 \quad (3.15)$$

$$z = 0, \quad C_s = C_{s_0} \quad (3.16)$$

$$z = L, \quad \frac{\partial C_s}{\partial z} = 0 \quad (3.17)$$

Sendo:

C_s = concentração de substrato (lactose) no reator; D_{ax} o coeficiente de dispersão axial e U_f a velocidade intersticial do escoamento.

3.2.12.2 – Modelo Cinético

Neste trabalho foi proposto empregar o modelo cinético de inibição competitiva pelo produto galactose (MAHONEY e WHITAKER, 1977) e com os parâmetros cinéticos obtidos por GUIDINI (2009). (Equação 3.18).

$$(-r_s) = \frac{V_m C_s}{K_m \left(1 + \frac{C_p}{K_I} \right) + C_s} \quad (3.18)$$

A concentração do produto, C_p , é estequiometricamente relacionada a concentração do substrato, C_s , e varia ao longo do comprimento do reator, i.e. $C_p = C_{s_0} - C_s$ e neste trabalho a

resistência a transferência de massa externa foi ignorado (não foi considerado os efeitos de partição).

Os valores dos parâmetros e constantes cinéticas usados nas simulações foram: $L = 12,5$ cm, $V_m = 0,77$ g_{glicose}/L.min.g_{suporte}, $C_{s0} = 50$ g/L; $K_m = 12,07$ g/L; $K_I = 4,94$ g/L e U_f ($6,49 \times 10^{-3}$; $1,41 \times 10^{-2}$; $3,79 \times 10^{-2}$; $6,44 \times 10^{-2}$ e $1,30 \times 10^{-1}$ cm/s).

As Equações 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18 foram adimensionalizadas considerando as variáveis:

$$C_s = \frac{C_s}{C_{s0}}; \quad Z = \frac{z}{L}; \quad \phi_1 = \frac{V_m L^2}{D_{ax} C_{s0}}; \quad Pe = \frac{L U_f}{D_{ax}}; \quad \phi_2 = K_m \left(\frac{1}{C_{s0}} + \frac{1}{K_I} \right); \quad \phi_3 = \left(1 - \frac{K_m}{K_I} \right)$$

Posterior à adimensionalização as equações 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18 foram descritas por 3.19, 3.20 e 3.21.

$$-Pe \frac{\partial C_s}{\partial Z} + \frac{\partial^2 C_s}{\partial Z^2} - \frac{\phi_1 C_s}{\phi_2 + \phi_3 C_s} = 0 \quad (3.19)$$

$$Z = 0, \quad C_s = 1 \quad (3.20)$$

$$Z = 1, \quad \frac{\partial C_s}{\partial Z} = 0 \quad (3.21)$$

As Equações 3.19, 3.20 e 3.21 foram resolvidas empregando um programa implementado em *Scilab 5.1* utilizando diferenças finitas como discretização na posição. Os coeficientes de dispersão axial utilizados foram calculados no item 3.2.11.3.

O modelo descrito pela Equação 3.15 para um reator de leito empacotado operando em estado estacionário e condições de escoamento de fluxo empistonado em que não é considerado os efeitos de dispersão axial e radial reduz a Equação 3.22:

$$U_f \frac{\partial C_s}{\partial z} + (-r_s) = 0 \quad (3.22)$$

Sujeita a condição inicial: $C_s = C_{s_0}$ a $z = 0$

Utilizando $C_s = \frac{C_s}{C_{s_0}}$; $Z = \frac{z}{L}$; $\phi_4 = \frac{V_m L}{U_f C_{s_0}}$ a Equação 3.22 juntamente com a Equação 3.18 na forma adimensional é apresentada na Equação 3.23:

$$\frac{dC_s}{dZ} + \frac{\phi_4 C_s}{\phi_2 + \phi_3 C_s} = 0 \quad (3.23)$$

Com $C_s = 1$ a $Z = 0$

O modelo descrito pela Equação 3.23 para as condições de escoamento empistonado é uma equação diferencial ordinária de primeira ordem e foi integrada numericamente sem maiores dificuldades pelo método de Runge-Kutta-Gill.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada

Os resultados obtidos para o estudo da influência da temperatura na atividade enzimática estão ilustrados na Figura 4.1. Observa-se que para a faixa de temperatura estudada de 10 a 80°C, a etapa de ativação térmica ocorreu até temperatura próxima a 60°C, onde ocorreu a maior atividade. A atividade enzimática teve uma queda de 85% a 70°C, ficando praticamente inativa a 80°C. TANRISEVAN e DOGAN (2002) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato e gelatina, encontrando atividade máxima em 50°C e verificaram uma queda de 73% em relação a atividade inicial a 70°C.

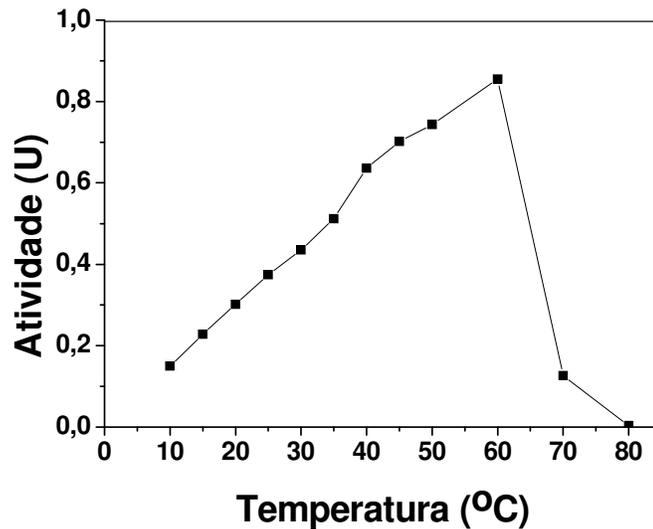


Figura 4.1 – Influência da temperatura na atividade

Para determinar a energia de ativação da reação de hidrólise, os resultados de atividade enzimática em função da temperatura (etapa de ativação térmica) foram ajustados ao modelo de Arrhenius (Equação 3.1), utilizando o *software Origin 7.0*. Obteve-se a Equação 4.1 e Figura 4.2.

$$\ln A = 7,994 - 2680,23 \frac{1}{T} \quad (4.1)$$

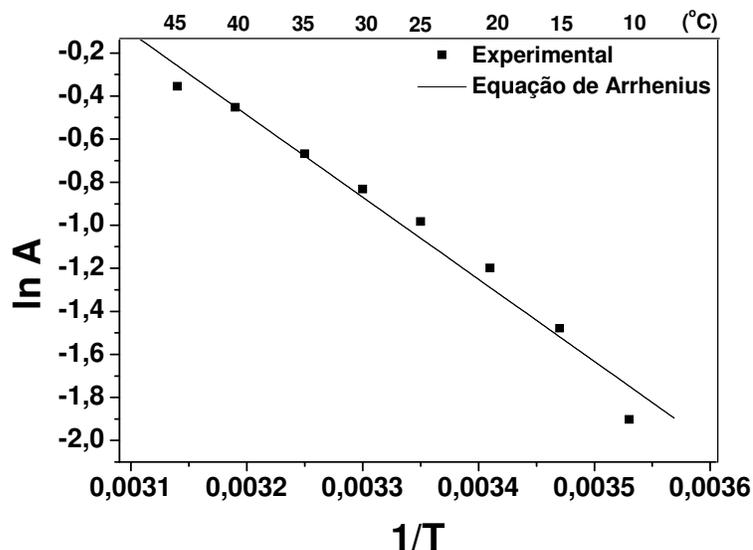


Figura 4.2 – Ajuste dos valores da etapa de ativação térmica à Equação de Arrhenius

Com o ajuste linear obteve-se coeficiente de determinação de 0,98 e o valor da energia de ativação da reação de 5,32 kcal/mol de lactose. Este baixo valor na energia de ativação da reação indica que um pequeno aumento na temperatura do meio reacional implica em grande aumento na velocidade da reação. No trabalho de EL-MASRY *et al.* (2001) a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em dois tipos de membranas de nylon, utilizando como substrato lactose. Os valores de energia de ativação encontrados foram 5,6 e 6 kcal/mol, menores do que aquele obtido para a enzima na forma livre que foi de 8,8 kcal/mol a pH 6,5 em tampão fosfato utilizando lactose a 68,4 g/L.

FREITAS (2007) imobilizou β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído. Os valores de energia de ativação encontrados para a forma livre e imobilizada da enzima foram 6,9 e 7,7 kcal/mol, respectivamente, sugerindo uma baixa resistência à transferência de substrato através das partículas de enzima imobilizada.

4.2 – Estabilidade térmica da enzima imobilizada

A influência da temperatura na estabilidade de β -galactosidase imobilizada foi estudada conforme 3.2.6. Os resultados das atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas, estão ilustrados na Figura 4.3.

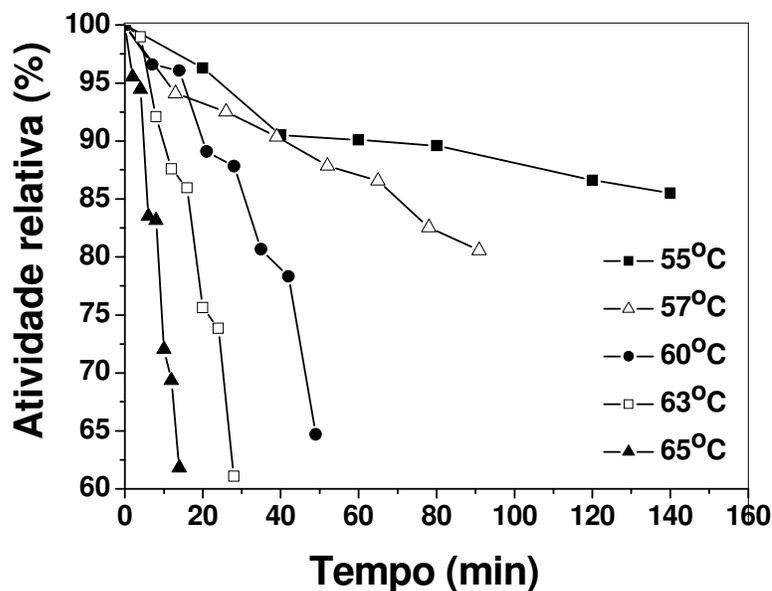


Figura 4.3 – Atividade relativa (A_i/A_0) em função do tempo de incubação para as temperaturas estudadas

A Figura 4.3 evidencia a forte dependência da estabilidade térmica da enzima imobilizada com a temperatura. Observa-se que para a temperatura de 65°C em 14 minutos houve uma queda de 38,2% da atividade em relação à inicial. Para temperatura de 55°C, após 140 minutos, ocorreu queda de apenas 14,5% na atividade, demonstrando que para temperaturas mais baixas o biocatalisador imobilizado é mais resistente quanto à perda de atividade. Estes resultados podem ser comparados com aqueles do trabalho de HAIDER e HUSSAIN (2007), que imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por oclusão em alginato de cálcio, reticulado com concanavalina A e obtiveram como resultados uma queda de 41% da atividade após 6 horas de incubação a 60°C.

No trabalho de FREITAS (2007), um estudo da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre e imobilizada em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído, mostrou uma queda de 78% e 70% da atividade, para a enzima livre e imobilizada,

respectivamente, após 6 minutos de incubação a 65°C. Para temperatura de 55°C, em 140 minutos, ocorreu uma queda de 25% e 65% para a enzima livre a imobilizada, respectivamente.

Os resultados experimentais de atividade enzimática residuais, em função do tempo de incubação, foram ajustados aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa, definidos pelas Equações 3.2 e 3.3 respectivamente, por uma regressão não-linear, pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, utilizando o *software Statistica 7.0* (MOREÉ, 1977).

Os resultados dos coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios, com respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste t-Student, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10%, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Ajustes dos parâmetros para a desativação térmica

T (°C)	Equação	k_1 / valor- p	α_1 / valor- p	R ²	$\Sigma (V-V_{\text{mod.}})^2$
65	3.2	0,0301 0	-	0,97	0,0074
65	3.3	0,221 e ⁻⁴ 0,9993	-1168,6 0,9993	0,98	0,0048
63	3.2	0,0119 0	-	0,97	0,0038
63	3.3	0,114 e ⁻⁴ 0,9996	-937,4 0,9996	0,98	0,0030
60	3.2	0,0055 0	-	0,97	0,0021
60	3.3	0,970 e ⁻⁵ 0,9995	-516,69 0,9995	0,98	0,0017
57	3.2	0,0024 0	-	0,98	0,0012
57	3.3	0,0093 0,0669	0,6723 0,0007	0,99	0,0008
55	3.2	0,0013 0	-	0,90	0,0032
55	3.3	0,0177 0,008	0,8468 0	0,98	0,0006

Como critério de escolha de ajuste, optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos dados experimentais, adotando inicialmente o modelo que apresentasse significado físico dos parâmetros coerentes com o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor de soma de quadrado dos desvios.

Analisando os resultados obtidos para a modelagem de desativação térmica nas temperaturas estudadas, tem-se que para as maiores temperaturas (65, 63 e 60°C), o melhor ajuste foi obtido aplicando a cinética de desativação de primeira ordem (Equação 3.2). A desativação em série em uma única etapa foi inviável para o ajuste nestas temperaturas, pois apresentaram valores do parâmetro (α_1) negativos e nível de significância maior que 10% ($p < 0,1$), tornando-os não significativos pelo teste *t-Student*. Para as temperaturas de 57 e 55°C, os dois modelos cinéticos ajustaram-se aos resultados experimentais, mas o modelo de desativação em série em uma única etapa (Equação 3.3) apresentou maiores valores de (R^2) e menores valores de soma dos quadrados de resíduos.

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 2 modelos estão representados na Figura 4.4 a 4.8. Os parâmetros ajustados para cada temperatura estão representados na Equação 4.2 a 4.6:

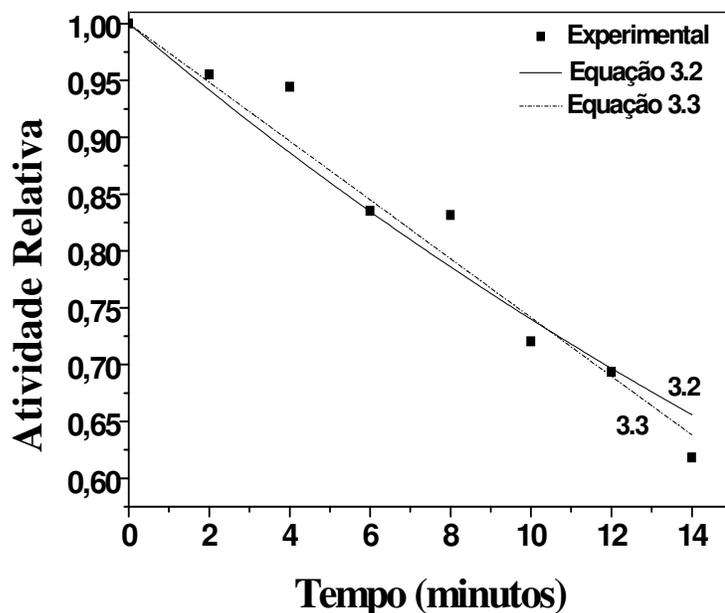


Figura 4.4 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 65°C

Analisando a Figura 4.4 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,97 e a soma dos quadrados dos desvios

igual a 0,0074. Os parâmetros ajustados ao modelo de desativação de primeira ordem estão representados na Equação 4.2:

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0301)t} \tag{4.2}$$

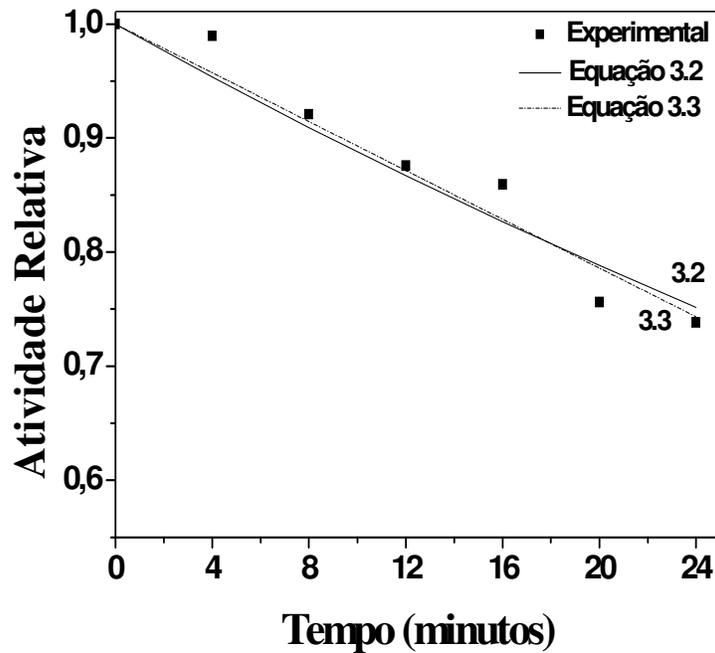


Figura 4.5 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C

Observando a Figura 4.5 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,97 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0038. Os parâmetros ajustados ao modelo de desativação de primeira ordem estão representados na Equação 4.3:

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0119)t} \tag{4.3}$$

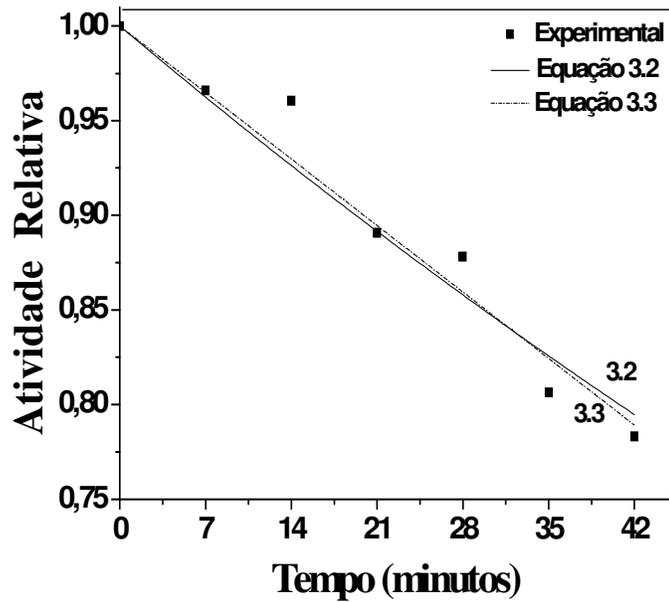


Figura 4.6 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C

Observando a Figura 4.6 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,97 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0021. Os parâmetros ajustados ao modelo de desativação de primeira ordem estão representados na Equação 4.4:

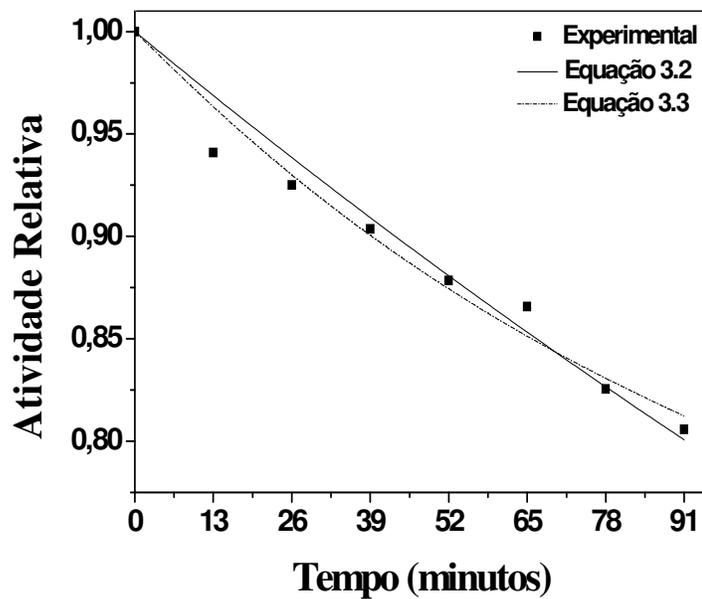


Figura 4.7 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0055)t} \tag{4.4}$$

Analisando a Figura 4.7 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,99 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0008. Os parâmetros ajustados ao modelo de desativação em série em uma única etapa estão representados na Equação 4.5:

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,6723) \cdot e^{(-0,0093)t} + 0,6723 \tag{4.5}$$

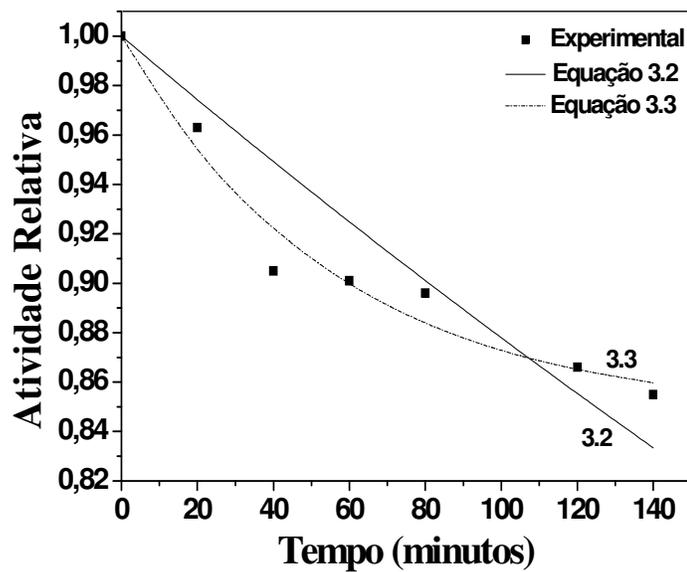


Figura 4.8 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 55°C

Observando a Figura 4.8 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,98 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0006. Os parâmetros ajustados ao modelo de desativação em série em uma única etapa estão representados na Equação 4.6:

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,8468) \cdot e^{(-0,0177)t} + 0,8468 \quad (4.6)$$

Utilizando as constantes de desativação térmica (k_d) dos modelos ajustados e a Equação 3.4, foram calculados os tempos de meia vida para cada temperatura. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Tempo de meia vida para as temperaturas estudadas

Temperatura (°C)	Modelo	k_d (min ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (min)
65	Equação 3.2	0,0301	0,97	23,03
63	Equação 3.2	0,0119	0,97	58,24
60	Equação 3.2	0,0055	0,97	126,02
57	Equação 3.3	0,0093	0,99	74,52
55	Equação 3.3	0,0177	0,98	39,15

Como pode ser observado na Tabela 4.2, para as temperaturas de 57 e 55°C, apesar do modelo de desativação em série em uma única etapa (Equação 3.3) ter se ajustado melhor aos resultados, quando realizado o tratamento para todas as temperaturas, os valores de (k_d), apresentaram significados físicos incoerentes, pois de acordo com a Equação de Arrhenius, quanto maior a temperatura, maior o parâmetro da constante da taxa de desativação térmica, o que não está acontecendo. Assim, foi utilizado as constantes de desativação térmica (k_d) do modelo de primeira ordem, para todas as temperaturas estudadas, para calcular os tempos de meia vida que estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Valores de k_d e tempos de meia calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica (Equação 3.2)

Temperatura (°C)	k_d (min ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (min)
65	0,0301	0,97	23,03
63	0,0119	0,97	58,24
60	0,0055	0,97	126,02
57	0,0024	0,98	288,79
55	0,0013	0,90	533,15

No trabalho de GAUR *et al.* (2006) a enzima β -galactosidade de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em adsorção em celite, ligação covalente em quitosana e ligação cruzada com glutaraldeído, obtendo tempo de meia vida a 55°C de 18, 14,17 e 17,37 horas para as imobilizações em quitosana, celite e ligação cruzada, respectivamente. Para 65°C estes valores foram 0,79 e 1,07 horas para as imobilizações em quitosana e ligação cruzada. Verifica-se uma forte dependência da estabilidade térmica da enzima com o método de imobilização utilizado.

Para determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica, os resultados de (k_d) em função da temperatura (Tabela 4.3) foram ajustados ao modelo de Arrhenius (Equação 3.5) utilizando o *software Origin 7.0*, obtendo a Equação 4.7 e Figura 4.9.

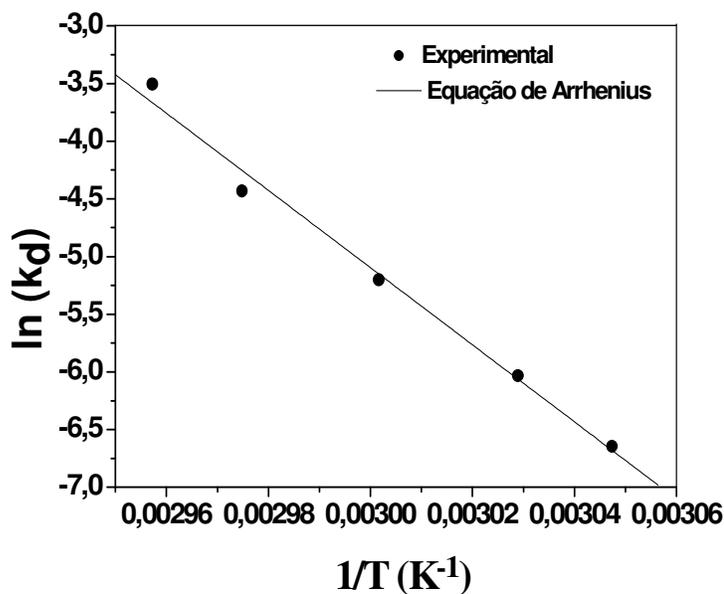


Figura 4.9 – Ajuste dos valores de k_d à Equação de Arrhenius

$$\ln(kd) = -33459 \frac{1}{T} + 95,28 \quad (4.7)$$

O ajuste linear obtido alcançou coeficiente de determinação de 0,99. Assim a energia de ativação do processo de desativação térmica obtido foi 66,48 kcal/mol. Este valor foi menor do que aquele relativo ao da enzima livre citado por Freitas (2007), de 88,14 kcal/mol para a energia de ativação do processo de desativação térmica da mesma enzima. Isto sugere

que a enzima imobilizada no presente trabalho é mais estável a um aumento de temperatura no processo de hidrólise de lactose em relação à mesma enzima na forma livre.

4.3 – Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada

Com relação à influência do tempo de estocagem sobre a atividade da β -galactosidase imobilizada em resina Duolite A568 (item 3.2.7), os resultados mostram que a enzima imobilizada manteve sua atividade após 90 dias de armazenamento, em tampão pH 4,5 a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, conforme pode ser observado na Figura 4.10, indicando a manutenção da estabilidade da enzima frente a estocagem, possibilitando utiliza - lá posteriormente.

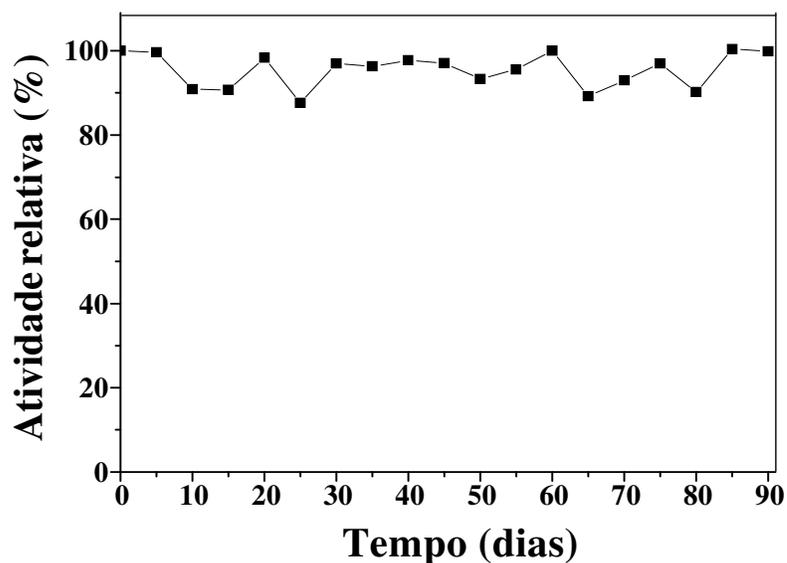


Figura 4.10 – Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ em tampão pH 4,5

Segundo ZANIN e MORAIS (2004), a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou secas, geralmente é superior àquela da enzima livre, porém, isto depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada. HAIDER e HUSSAIN (2007) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por oclusão em alginato de cálcio, reticulado com concanavalina A e obtiveram uma atividade de 93% em relação a inicial após 2 meses de estocagem a 4°C .

VIEIRA (2009) estudou a influência do tempo de estocagem na atividade hidrolítica da β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em quitosana, obtendo como

resultado a redução da atividade da enzima em 10% em 60 dias e 20% após 90 dias de estocagem a 10 °C e tampão de imobilização.

4.4 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na hidrólise da lactose pela enzima imobilizada em reator de leito fixo

Um Planejamento Composto Central (PCC) foi proposto para o estudo da influência conjunta da concentração de lactose (X_1) e vazão de alimentação (X_2) no meio reacional que resultaria em aumento na taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose. Os resultados de taxa média de reação e de conversão obtidos estão apresentados na Tabela 4.4 e Figura 4.11.

Tabela 4.4 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose obtida em cada experimento do planejamento composto central para o estudo da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	Lactose (g/L)	Vazão de alimentação (mL/min)	Taxa média de reação (U^*)	Conversão (%)
1	25 (-1)	1,3 (-1)	324,2	94,3
2	25 (-1)	10,7 (1)	2115,9	74
3	75 (1)	1,3 (-1)	708,5	68,6
4	75(1)	10,7 (1)	2793,6	32,4
5	21,3 ($-\alpha$)	6 (0)	1084,7	79,8
6	78,7 (α)	6 (0)	2258,9	45
7	50 (0)	0,6 ($-\alpha$)	277,1	88,2
8	50 (0)	11,4 (α)	3060,0	50,1
9	50 (0)	6 (0)	2111,7	66,1
10	50 (0)	6 (0)	2101,5	65,7
11	50 (0)	6 (0)	2098,3	66

$$U^* = (\text{mg}_{\text{lactose}} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{suporte}})$$

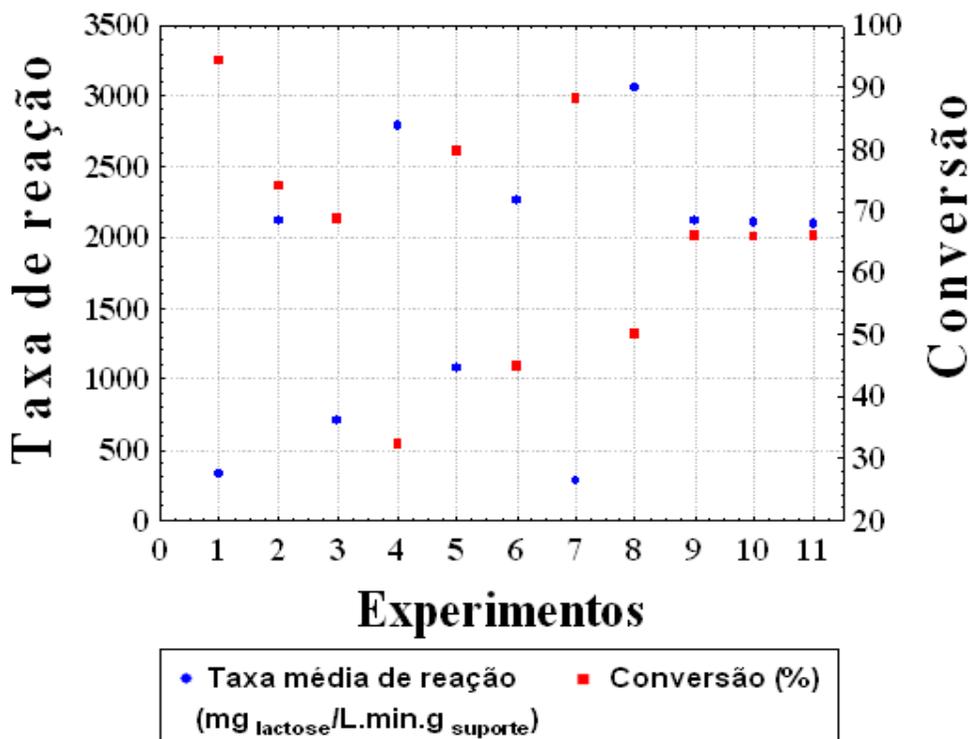


Figura 4.11 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose obtida em cada experimento do planejamento composto central para o estudo da influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação

4.4.1 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise da lactose

Observando a Tabela 4.4 e Figura 4.11, nota-se que a taxa média de reação obtida durante os experimentos variou de 277,1 a 3060,0 U. Verifica-se que os maiores valores obtidos foram nos experimentos 8, 4, 6, que correspondem a maiores concentrações de lactose e maiores vazões de alimentação: 50 g/L e 11,4 mL/min; 75 g/L e 10,7 mL/min; 78,7 g/L e 6 mL/min, respectivamente. O menor valor de taxa média de reação foi 277,1 U, no experimento 7, sendo a concentração de lactose de 50 g/L e baixa vazão de alimentação, 0,6 mL/min. Nos experimentos 9, 10 e 11 (ponto central), com uma vazão de alimentação igual a 6 mL/min e concentração de lactose de 50 g/L, obteve-se valores satisfatório de taxa média de reação.

Os resultados experimentais de taxa média de reação foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.5 estão representados os termos

lineares, quadráticos, as interações das duas variáveis estudadas, bem como, as respectivas análises no teste *t Student*.

Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	2096,197	107,5133	0,00001
X ₁ (L)	363,220	76,1285	0,00501
X ₁ (Q)	-309,606	105,3013	0,03225
X ₂ (L)	1065,845	76,1285	0,00003
X ₂ (Q)	-312,075	105,3013	0,03139
X ₁ X ₂	73,350	98,0349	0,48802

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

$$\begin{aligned} Taxamédia = & 2096,197 + 363,220X_1 - 309,606X_1^2 + 1065,845X_2 - 312,075X_2^2 \\ & + 73,350X_1X_2 \end{aligned} \quad (4.8)$$

Na Tabela 4.5 verifica-se que as variáveis significativas do modelo foram: a concentração de lactose e vazão de alimentação em seu termo linear (X₁ (L) e X₂ (L)), concentração de lactose e vazão de alimentação em sua forma quadrática (X₁ (Q) e X₂ (Q)). Com a eliminação do parâmetro não significativo, interação concentração de lactose/vazão de alimentação (X₁X₂), obteve-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.6.

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

$$Taxamédia = 2096,197 + 363,220X_1 - 309,606X_1^2 + 1065,845X_2 - 312,075X_2^2 \quad (4.9)$$

Tabela 4.6 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	2096,197	103,4943	0,00000
X ₁ (L)	363,220	73,2827	0,00256
X ₁ (Q)	-309,606	101,3650	0,02239
X ₂ (L)	1065,845	73,2827	0,00001
X ₂ (Q)	-312,075	101,3650	0,02170

O coeficiente da variável X₂ no modelo (Equação 4.9) mostra que o maior efeito na taxa média de reação foi proporcionado pela vazão de alimentação. Este fato pode ser confirmado comparando o experimento 5 e 6 com o 7 e 8.

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 taxa média de reação de hidrólise da lactose, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 4.12 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.13 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

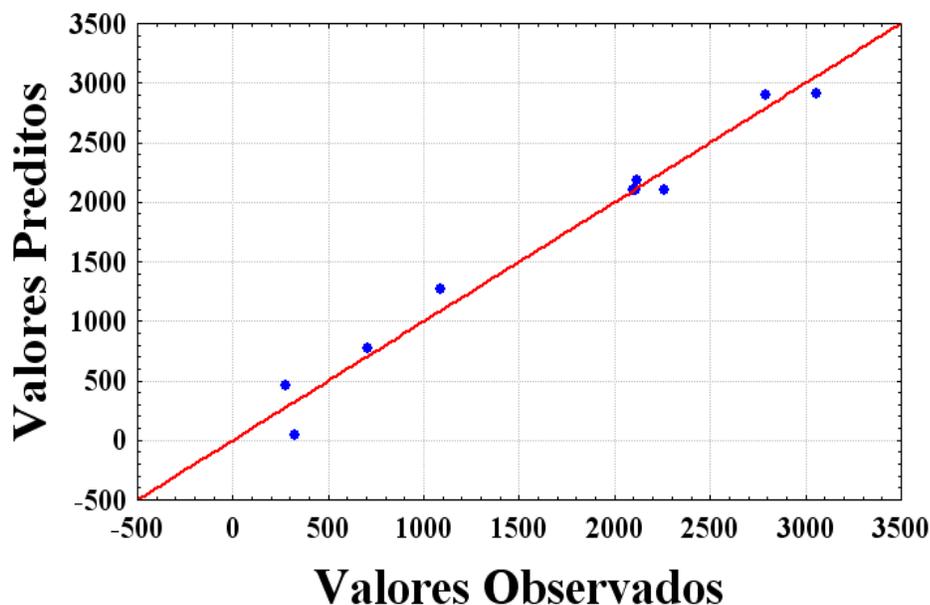


Figura 4.12 – Valores preditos em função dos valores observados

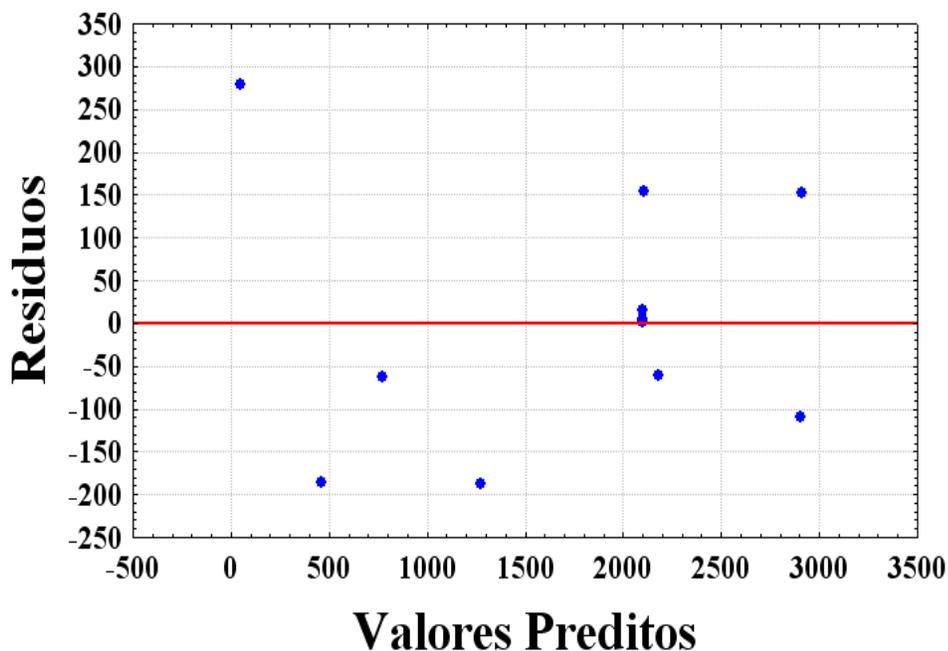


Figura 4.13 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Observando a Figura 4.12, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a taxa média de reação apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.13, 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 da concentração de lactose e da vazão de alimentação no meio reacional. A superfície de resposta e as curvas de contorno estão representados na Figura 4.14.

Com a Equação completa (4.8) e utilizando um algoritmo implementado no *software Maple 9.5*, foi calculado o ponto estacionário da influência da concentração de lactose e vazão de alimentação no meio reacional, visando maximizar a taxa média de reação de hidrólise da lactose. Utilizando as equações de codificação 3.5 e 3.6, obtiveram-se os valores reais das variáveis estudadas, com concentração de lactose igual a 70 g/L e vazão de alimentação igual a 14,5 mL/min, o que implicou na máxima taxa média de reação de 3201,6 U.

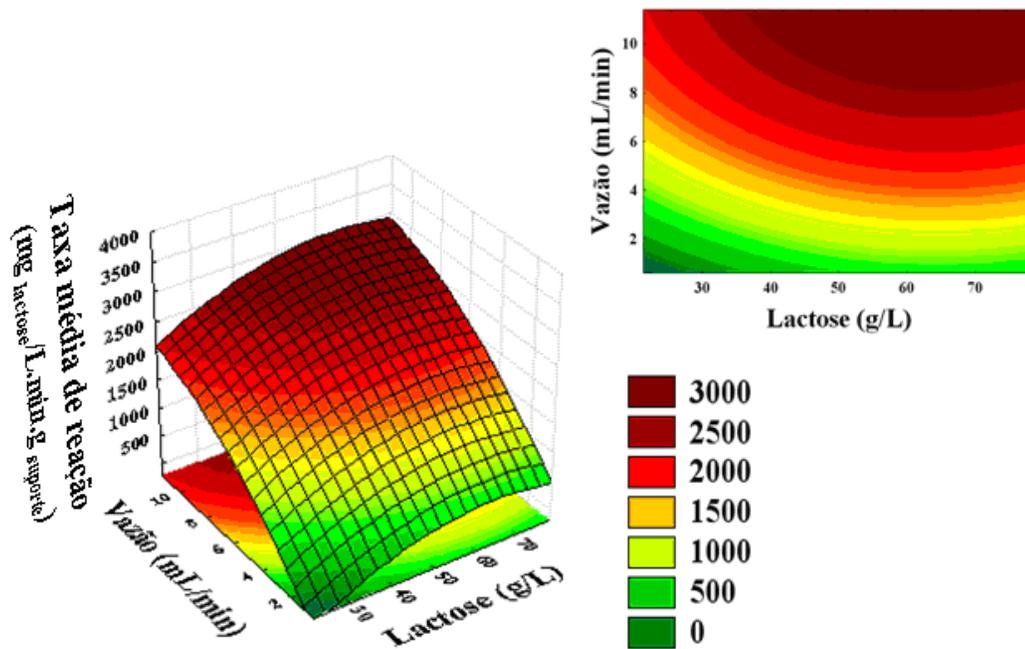


Figura 4.14 - Superfície de resposta e curvas de contorno da influência da concentração de lactose e vazão de alimentação na taxa média de reação de hidrólise

Para validar o modelo foram realizados dois experimentos, um na condição ótima dada pelo PCC e outro dentro da região de melhor condição, utilizando concentração de lactose de 50 g/L e vazão de alimentação igual a 6 mL/min, obtendo taxa média de reação de 3148 U (25,4% de conversão da lactose) e 2074 U (65% de conversão da lactose), respectivamente. Como pode ser observado, a condição dentro da região ótima (50 g/L de lactose e vazão de alimentação de 6 mL/min) resultou em uma menor taxa média de reação quando comparada com a condição ótima (concentração de lactose de 70 g/L e vazão de alimentação de 14,5 mL/min), mas converteu 65% da lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose, enquanto a primeira converteu apenas 25,4% da lactose, além de a concentração de 50 g/L ser mais próxima daquelas encontrada para leite/soro (aproximadamente 50 g/L de lactose). Então foi definido como melhor condição: concentração de lactose igual a 50 g/L e vazão de alimentação igual a 6 mL/min.

4.4.2 – Influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação na conversão da lactose

Para a conversão de lactose em glicose e galactose, conforme a Tabela 4.4 e Figura 4.11, pode-se observar que os resultados variaram de 32,4 a 94,3%. Os maiores valores obtidos foram nos experimentos 1, 7 e 5, que correspondem a baixas vazões de alimentação e menores concentrações de lactose: 1,3 mL/min e 25 g/L; 0,6 mL/min e 50 g/L; 6 mL/min e 21,3 g/L, respectivamente. A menor conversão obtida foi 32,4%, experimento 4, sendo concentração de lactose de 75 g/L e vazão de alimentação 10,7 mL/min, ou seja, alta concentração de lactose e alta vazão de alimentação.

Nos experimentos 9, 10 e 11 (ponto central), com uma vazão de alimentação igual a 6 mL/min e concentração de lactose de 50 g/L, obteve-se valores de conversão em torno de 66%, resultados um pouco abaixo dos valores de conversão dos experimentos 1, 7 e 5, que foram mais satisfatórios, levando-se em consideração que esta é a concentração de lactose presente no leite/soro e também que nesses experimentos obteve-se uma alta taxa média de reação, como pode ser visualizado na Figura 4.11.

Os resultados experimentais de conversão foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.7 estão representados os termos lineares, quadráticos, as interações das duas variáveis estudadas, bem como, as respectivas análises no teste *t Student*.

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.10 completa com todos os parâmetros:

Tabela 4.7 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	65,6253	1,01456	0,00000
X ₁ (L)	-16,1657	0,71839	0,00000
X ₁ (Q)	-1,9361	0,99368	0,10889
X ₂ (L)	-15,1084	0,71839	0,00001
X ₂ (Q)	3,1907	0,99368	0,02370
X ₁ X ₂	-3,9750	0,92511	0,00774

$$\text{Convers\~{a}o} = 65,6253 - 16,1657X_1 - 1,9361X_1^2 - 15,1084X_2 + 3,1907X_2^2 - 3,9750X_1X_2 \quad (4.10)$$

O modelo (Equação 4.10) mostra que nenhuma das variáveis estudadas influenciou mais significativamente na conversão.

Na Tabela 4.7 verifica-se que as variáveis significativas do modelo foram: a concentração de lactose e vazão de alimentação em seu termo linear (X_1 (L) e X_2 (L)), a vazão de alimentação em sua forma quadrática (X_2 (Q)) e a interação concentração de lactose/vazão de alimentação (X_1X_2). Com a eliminação do parâmetro não significativo, concentração de lactose em sua forma quadrática (X_1 (Q)), obtiveram-se os seguintes parâmetros apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	64,4578	0,99128	0,00000
X_1 (L)	-16,1657	0,86983	0,00000
X_2 (L)	-15,1084	0,86983	0,00000
X_2 (Q)	3,1907	1,20315	0,03793
X_1X_2	-3,9750	1,12013	0,01209

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.11:

$$\text{Convers\~{a}o} = 64,4578 - 16,1657X_1 - 15,1084X_2 + 3,1907X_2^2 - 3,9750X_1X_2 \quad (4.11)$$

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,99, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção conversão da lactose em glicose e galactose, mostrando que 99% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. A Figura 4.15 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.16 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

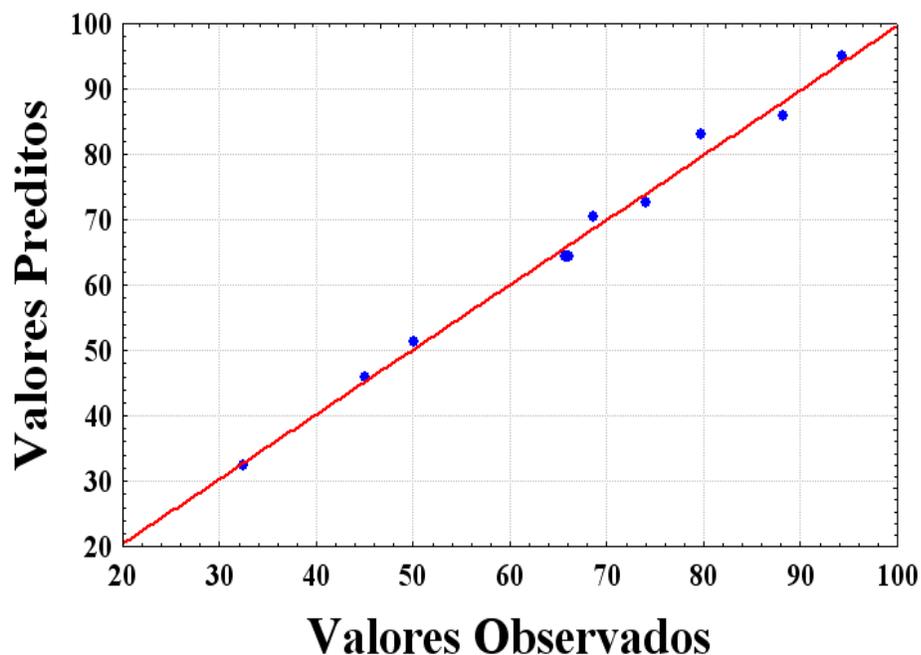


Figura 4.15 – Valores preditos em função dos valores observados

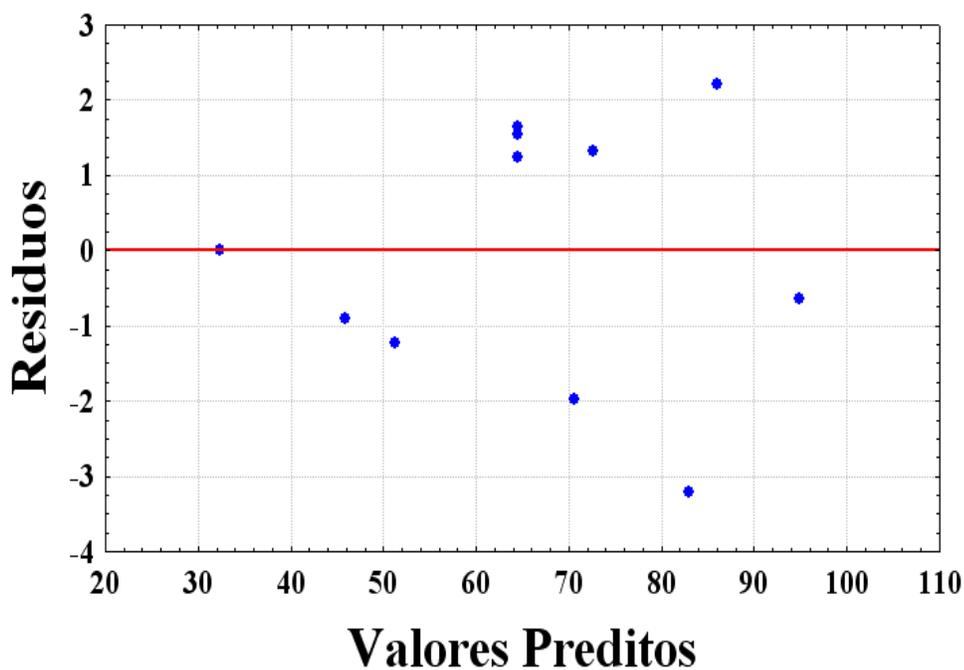


Figura 4.16 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Observando a Figura 4.15, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a conversão apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na

Figura 4.16, 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 da concentração de lactose e da vazão de alimentação no meio reacional. A superfície de resposta e as curvas de contorno estão representados na Figura 4.17.

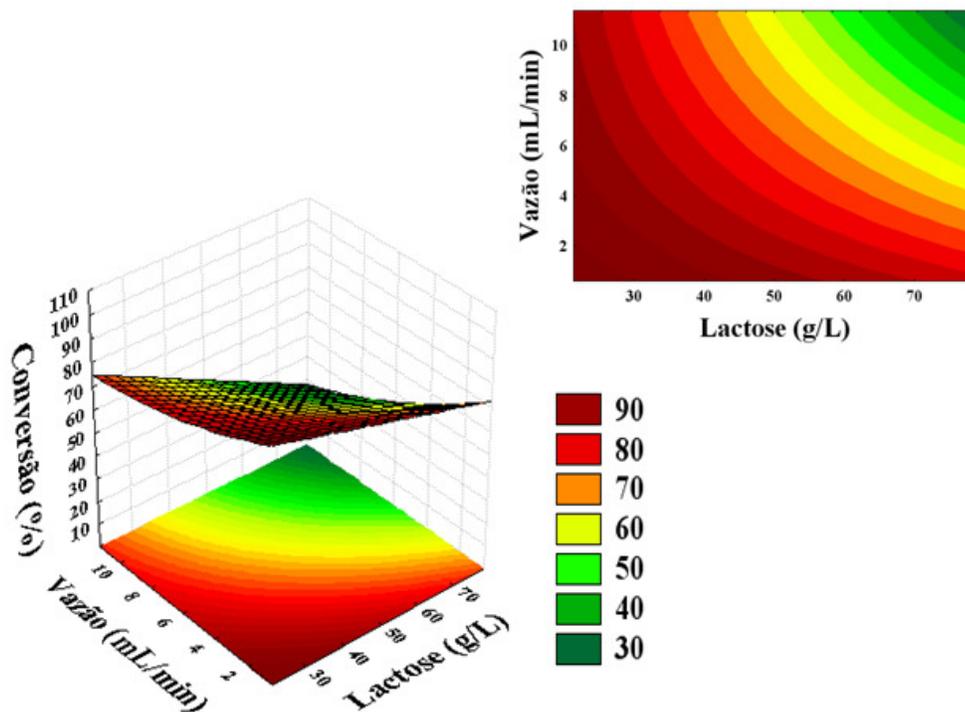


Figura 4.17 - Superfície de resposta e curvas de contorno da influência da concentração de lactose e vazão de alimentação na conversão da lactose

Com a equação completa (Equação 4.10) e utilizando um algoritmo implementado no *software Maple 9.5*, foi realizado o cálculo do ponto estacionário para a influência da concentração de lactose e vazão de alimentação no meio reacional, visando maximizar a conversão da lactose em glicose e galactose.

Valores de λ 's referentes à conversão de lactose em glicose e galactose indicaram ($\lambda_1 = -2,6163$ e $\lambda_2 = 3,8709$) que esta resposta possuía um ponto de sela, não sendo possível calcular o ponto estacionário por esta implementação. Mas, conforme visto no item 4.5.1, em que foi estudada a influência conjunta da concentração de lactose e vazão de alimentação em

termos de taxa média de reação de hidrólise da lactose, foi possível obter a melhor condição: 50 g/L de lactose e vazão de alimentação igual a 6 mL/min, com resultados 2074 U (65% de conversão da lactose). Isto pode ser confirmado na Figura 4.11, nos experimentos 9, 10 e 11 (Ponto central), em que obteve-se resultados intermediários de taxa média de reação e conversão para as duas variáveis.

A melhor condição (50 g/L de lactose e vazão de alimentação igual a 6 mL/min), foi utilizada para os próximos experimentos realizados neste trabalho.

4.5 – Hidrólise da lactose em dois reatores de leito fixo em série

Com objetivo de aumentar a taxa média de reação de hidrólise e a conversão da lactose, foram realizados experimentos com dois reatores em série, conforme item 3.2.9. A Tabela 4.9 mostra os resultados obtidos para uma solução de lactose de concentração 50 g/L em tampão acetato pH 4,5.

Tabela 4.9 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose

Experimento	Taxa média de reação (mg _{lactose} /L.min.g _{suporte})		Conversão (%)	
	1° Reator	2° Reator	1° Reator	Global
1 (após 30 min)	2065	496	65	80
2 (após 60 min)	2058	528	64	81
3 (após 120 min)	2099	608	66	85
Média	2074	544	65	82

Como se pode observar na Tabela 4.9, a taxa média de reação para o primeiro e segundo reator foi 2074 e 544 mg_{lactose}/L.min.g_{suporte}, respectivamente. A conversão para o primeiro reator foi 65% e a conversão global 82%, ou seja, a utilização do segundo reator aumentou a conversão em 17%. Verifica-se também que a taxa média de reação no segundo reator foi baixa em comparação com o primeiro, pois as concentrações de lactose e galactose na entrada do segundo reator são menor e maior, respectivamente. Sabendo que a galactose atua como inibidor da reação de hidrólise, este resultado já era esperado.

4.5.1 – Resultados dos testes preliminares de hidrólise da lactose presente no soro de leite

Os resultados da hidrólise da lactose presente no soro de leite (item 3.2.9) estão apresentados na Tabela 4.10. A lactose do soro foi quantificada em 49 g/L, conforme item 3.2.3.2, a Figura 4.18 ilustra o soro de leite desnatado e desproteínizado.



Figura 4.18 – Soro de leite desnatado e desproteínizado

Tabela 4.10 – Taxa média de reação de hidrólise e conversão de lactose utilizando soro de leite como substrato

Experimento	Taxa média de reação (mg lactose/L.min.g suporte)		Conversão (%)	
	1° Reator	2° Reator	1° Reator	Global
1 (após 30 min)	1636	326	52	63
2 (após 60 min)	1674	308	53	63
3 (após 120 min)	1687	395	54	66
Média	1666	343	53	64

Como pode ser observado na Tabela 4.10, a taxa média de reação para o primeiro e segundo reator foi 1666 e 343 mg lactose/L.min.g suporte, respectivamente. A conversão para o primeiro reator foi 53% e a conversão global foi 64%. Este valores estão um pouco abaixo daqueles para a hidrólise de lactose 50 g/L em solução a pH 4,5 (Tabela 4.9). Esta redução pode ser explicada pela interferência de diversos componentes presentes no soro, pois o mesmo foi apenas desproteínizado. Segundo MARIOTTI *et al.* (2008) tratamentos prévios

devem ser aplicados ao soro de leite para se obter um soro clarificado, isento de gordura e de proteínas insolúveis que podem causar o entupimento do reator.

4.5.2 – Resultados dos testes preliminares de hidrólise da lactose presente no leite desnatado “*in natura*”

Os resultados da hidrólise da lactose presente no leite desnatado “*in natura*” (item 3.2.9) estão apresentados na Tabela 4.11. A lactose do leite foi quantificada em 50,10 g/L, conforme item 3.2.3.2. O pH do leite, determinado por potenciômetro foi 6,5.

Tabela 4.11 - Taxa média de reação de hidrólise e conversão de lactose utilizando leite como substrato

Experimento	Taxa média de reação (mg lactose/L.min.g suporte)		Conversão (%)	
	1° Reator	2° Reator	1° Reator	Global
1 (após 30 min)	608	205	19	25
2 (após 60 min)	625	194	20	26
3 (após 120 min)	691	222	22	29
Média	641	207	20	27

Como pode ser observado na Tabela 4.11, a taxa média de reação para o primeiro e segundo reator foi 641 e 207 mg lactose/L.min.g suporte, respectivamente e a conversão 20 e 27%. Estes valores estão bem abaixo daqueles obtidos quando utilizando lactose 50 g/L em solução a pH 4,5 (Tabela 4.9) e soro de leite (Tabela 4.10), isto pode ser explicado devido ao fato do leite ter sido utilizado “*in natura*” e também pelo fato do pH ótimo da enzima ser em torno de pH 5 e o do leite de 6,5.

Os resultados de hidrólise de lactose em soro e leite “*in natura*” do presente trabalho são preliminares e sugere-se para trabalhos futuros o estudo da estabilidade da enzima imobilizada utilizando tais substratos, uma vez que existe a presença de vários componentes, tanto sais como proteínas que poderão interferir no processo.

Segundo FILHO *et al.* (2008).A imobilização em resinas de troca iônica é muito simples quando comparado com outros métodos de imobilização. Ela envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas entre íons de proteínas e íons de carga oposta da resina. A principal

desvantagem deste protocolo é que as enzimas podem ser liberadas do suporte durante a reação se o pH for alterado ou a força iônica for aumentada.

4.6 – Estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da lactose em reator de leito fixo

No desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas podem ser mais econômicos que os processos com a enzima livre, se for possível que a enzima imobilizada seja capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os processos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

A estabilidade operacional da β -galactosidase imobilizada foi analisada durante 30 dias, com solução de lactose 50 g/L, pH 4,5, a temperatura ambiente, numa vazão de alimentação igual a 0,3 mL/min, conforme item 3.2.10. Os resultados são mostrados na Figura 4.19.

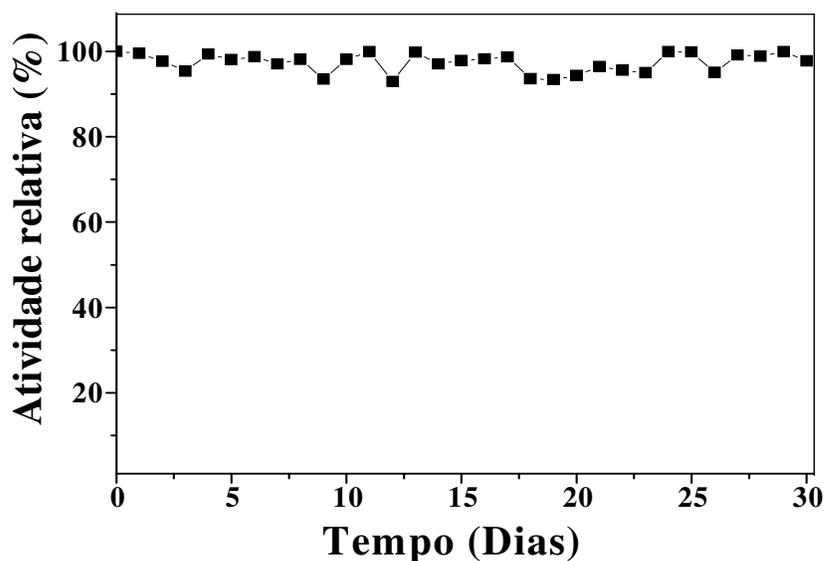


Figura 4.19 – Estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da lactose em reator de leito fixo em regime contínuo

A enzima imobilizada manteve sua atividade hidrolítica durante 30 dias, nas condições citadas acima. Esse resultado evidencia que o processo de imobilização foi eficaz na manutenção da estabilidade operacional da enzima imobilizada.

MARIOTTI *et al.* (2008) estudaram a estabilidade operacional da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em sílica, em reator de leito fixo, utilizando lactose 45 g/L em solução a pH 4,5, na temperatura de 40°C. Obtiveram como resultado, para vazão de alimentação de 0,5 mL/min uma redução de 24% após 130 dias de operação. Para a vazão de alimentação de 5 mL/min o reator operou 130 dias como uma redução de 32% na atividade.

4.7 – Determinação da Distribuição de Tempos de Residência (DTR)

As curvas de distribuição cumulativa para as vazões estudadas na forma adimensional podem ser visualizadas na Figura 4.20. Estas distribuições cumulativas forneceram as curvas $E(\Theta)$ (derivada primeira da função $F(\Theta)$) necessárias ao cálculo da variância e conseqüentemente do coeficiente de dispersão axial. As curvas $E(\Theta)$ para as cinco condições estudadas estão representadas na Figura 4.21.

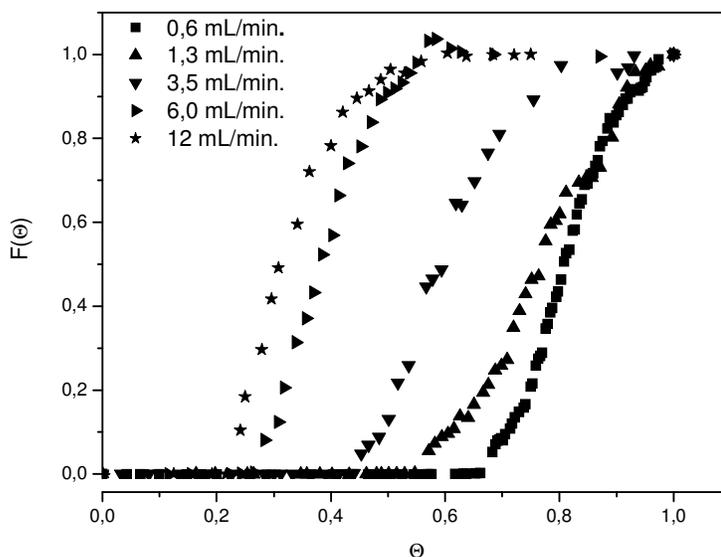


Figura 4.20 – Distribuições cumulativas adimensionais

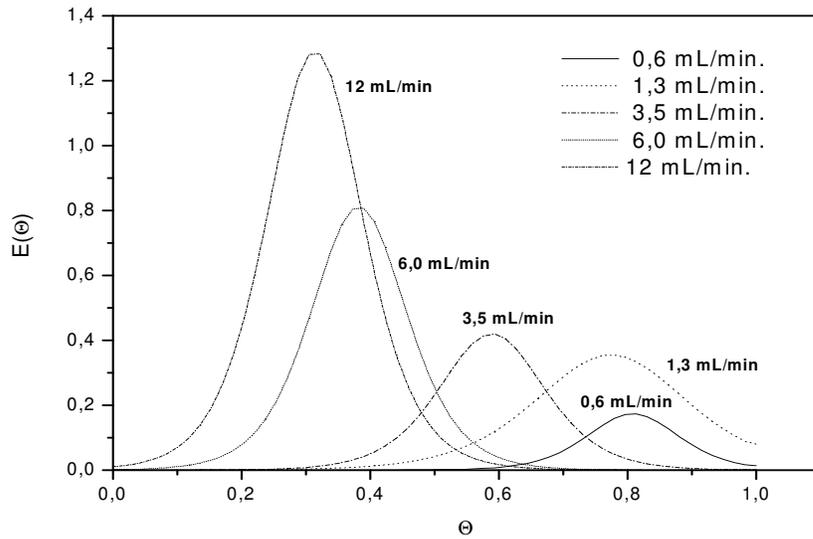


Figura 4.21 – Distribuição E(Θ) para os cinco diferentes tempos de residência estudados

A partir das curvas de distribuições cumulativas, calculou-se o tempo médio de residência considerando a área acima da curva definida por F(Θ) em função de Θ. Os valores obtidos para estes parâmetros foram comparados com os tempos de residência teóricos definidos pela razão entre o volume e vazão, conforme Equação 3.7 (FOGLER, 1999).

As variâncias para cada experimento foram calculadas utilizando a Equação 3.8 e o coeficiente de dispersão axial pela Equação 3.10. Na Tabela 4.12 encontram-se os valores estimados para os tempos de residência (τ), velocidade intersticial (U_f), variância (σ_θ^2), e coeficiente de dispersão axial (D_{ax}).

Tabela 4.12 – Valores estimados para os parâmetros tempos de residência, velocidade intersticial, variância e coeficiente de dispersão axial

Vazão (mL/min)	τ_{teo} (min)	τ (min)	Desvio (%)	U_f (cm/s)	σ_θ^2	D_{ax} (cm ² /s)
0,6	29,19	24,36	16,55	$6,49 \times 10^{-3}$	0,006844	0,0067
1,3	14,17	13,28	6,28	$1,41 \times 10^{-2}$	0,018886	0,0087
3,5	4,77	4,32	9,43	$3,79 \times 10^{-2}$	0,087461	0,01986
6,0	2,82	2,50	11,35	$6,44 \times 10^{-2}$	0,059605	0,0385
12	1,49	1,33	10,74	$1,30 \times 10^{-1}$	0,086933	0,0994

De acordo com a Tabela 4.12, observa-se que os desvios entre os tempos de residência ideal e o calculado pela DTR indicam um comportamento não ideal para a coluna utilizada, são característicos de formação de curtos-circuitos “by-pass” no reator. Este escoamento não ideal com formação de curtos-circuitos também pode ser visualizado no comportamento das distribuições cumulativas (Figura 4.21).

4.8 – Modelagem

A modelagem foi realizada conforme item 3.2.12.1. A Figura 4.22 apresenta o comportamento típico para a hidrólise da lactose por β -galactosidase para diferentes velocidades superficiais utilizadas para o modelo sem dispersão axial e radial de escoamento empistonado (PFR) definido pela Equação 3.23. Nota-se que a concentração da lactose diminui ao longo do comprimento do reator

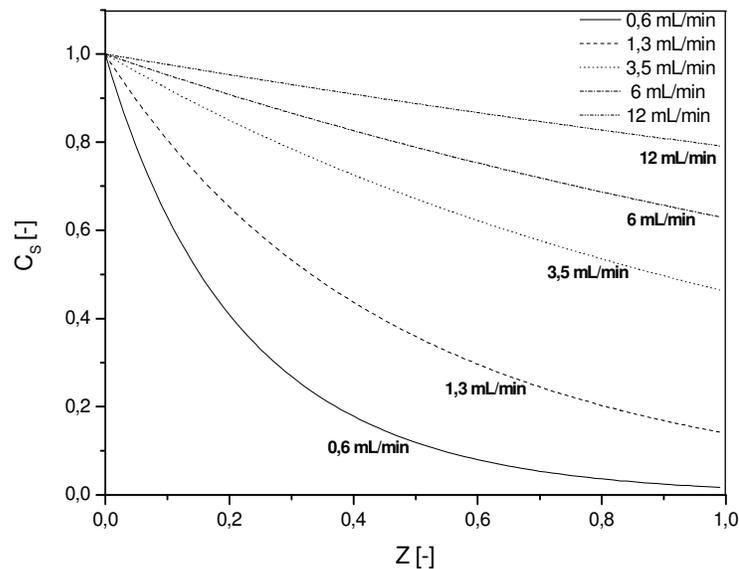


Figura 4.22 – Concentração de lactose adimensional em função do comprimento do reator adimensional a diferentes velocidades superficiais para $C_{s0} = 50$ g/L

Na Figura 4.22 pode se visualizar que para as maiores vazões pode se observar as maiores concentrações de substrato e conseqüentemente os menores valores para o produto (Figura 4.23). Também para as baixas vazões, pode ser observado que o perfil de concentração do substrato em um comportamento exponencial que não é observado nas altas vazões.

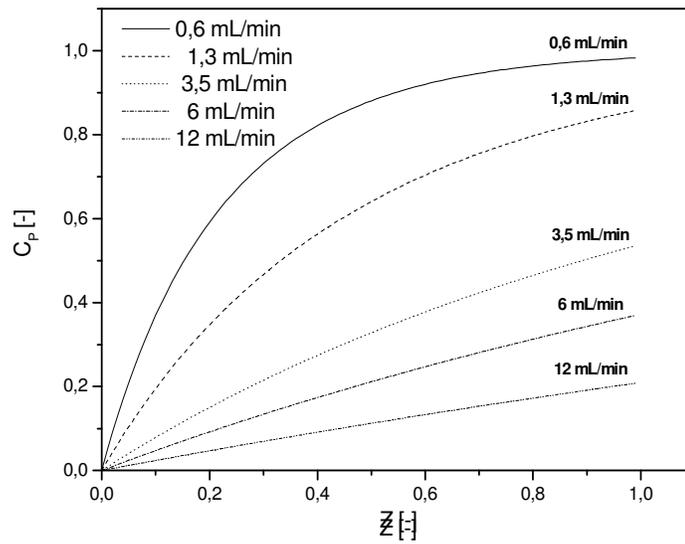


Figura 4.23 – Concentração do produto (galactose) em função do comprimento do reator adimensional para diferentes velocidades superficiais

A Figura 4.24 e 4.25 mostram os gráficos típicos obtidos para o processo da hidrólise da lactose pela β -galactosidase imobilizada à várias velocidades superficiais.

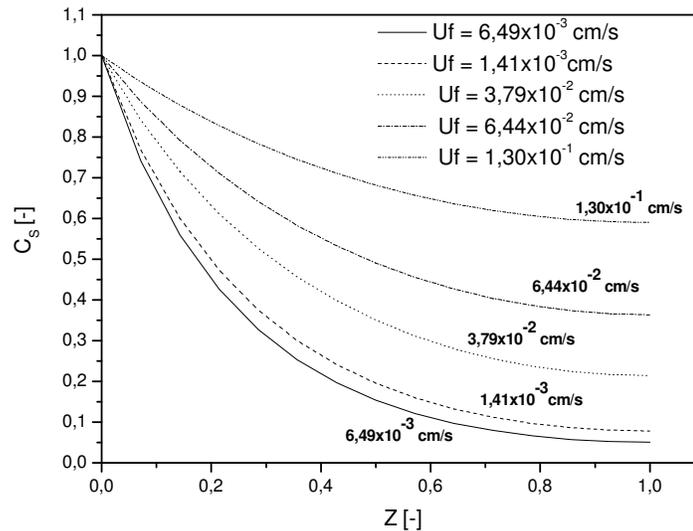


Figura 4.24 – Concentração de lactose adimensional em função do comprimento do reator adimensional a diferentes velocidades superficiais para $C_{s0} = 50$ g/L e modelo com dispersão axial

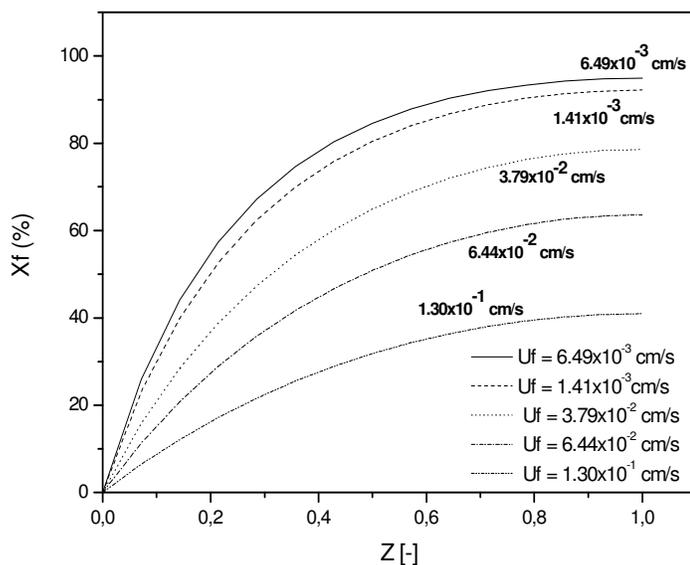


Figura 4.25 – Conversão ao longo do comprimento do reator para diferentes velocidades e modelo com dispersão axial

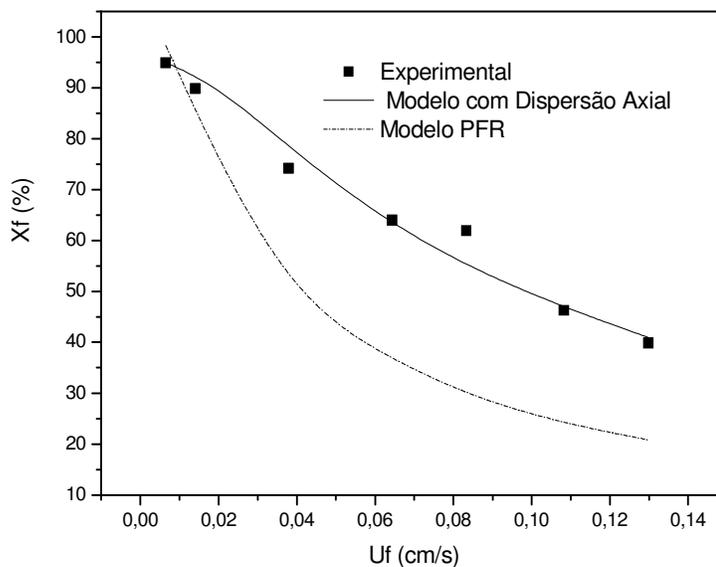


Figura 4.26 – Comparação entre os resultados experimentais e simulados para a conversão na saída do reator em função das velocidades superficiais

A Figura 4.26 mostra a comparação entre as conversões de saída experimentais e previstas pelos modelos PFR (Plug Flow Reactor) e com dispersão axial. Os resultados obtidos para o modelo PFR não descreveram o comportamento experimental das conversões de saída

nas várias velocidades superficiais. Entretanto um bom comportamento entre os resultados experimentais e previstos pelo modelo de dispersão axial pode ser observado. OLAFADEHAN *et al.* (2009) encontraram bons resultados para o modelo PFR considerando, ou não, transferência de massa na superfície da partícula e com a cinética Michaelis- Menten com inibição competitiva pelo produto.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A temperatura em que a enzima imobilizada apresentou maior atividade na faixa estudada foi 60°C.
- O valor da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada foi 5,32 kcal/mol de lactose consumida, utilizando uma concentração inicial de lactose de 50 g/L em solução a pH 4,5.
- Foi verificada uma forte dependência da estabilidade térmica da enzima imobilizada em relação à temperatura. A 65°C, em 14 minutos houve uma queda de 38,2% da atividade em relação à inicial. Para temperatura de 55°C, após 140 minutos, ocorreu queda de apenas 14,5% na atividade.
- O modelo de desativação térmica de primeira ordem se ajustou melhor do que o modelo de desativação em série em uma única etapa para descrever a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada.
- A energia de ativação do processo de desativação térmica de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada foi 66,48 kcal/mol com tempos de meia vida de 8,9 horas a 55°C.
- A enzima imobilizada manteve sua atividade após 90 dias de armazenamento, em tampão acetato pH 4,5 a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, indicando a manutenção da estabilidade da enzima na estocagem.
- A melhor condição reacional obtida pelo PCC para a taxa média de reação de hidrólise e conversão da lactose em reator de leite fixo foi: concentração de lactose igual a 50 g/L e vazão de alimentação igual a 6 mL/min, atingindo taxa média de reação de 2074 mg lactose/L.min.g suporte e conversão de 65%.
- A utilização do segundo reator de leite fixo em série aumentou a conversão de lactose em 17%.

- A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 30 dias de operação em reator de leito fixo, com vazão de alimentação de solução de lactose 50 g/L igual a 0,3 mL/min.
- As determinações de distribuição de tempos de residência para as vazões de alimentação estudadas indicaram um escoamento não ideal para a coluna utilizada, com formação de curtos-circuitos tipo “by-pass” no reator de leito fixo.
- Para a modelagem cinética, considerando inibição competitiva pela galactose utilizando o modelo PFR ideal, os resultados obtidos não descreveram o comportamento experimental do reator em termos de conversões de saída nas várias velocidades superficiais estudadas.
- Para a modelagem cinética, considerando inibição competitiva pela galactose utilizando o modelo de dispersão axial, os resultados obtidos descreveram satisfatoriamente o comportamento experimental do reator em termos de conversões de saída nas várias velocidades superficiais estudadas.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada na resina Duolite A568 em reator de leito fixo utilizando soro de leite e leite como substrato.
- Utilizar reator de leito fixo com reciclo na hidrólise da lactose por β -galactosidase imobilizada.

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. 133-145, 1986.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. **Galactooligossacarídeos: Produção e Efeitos Benéficos**, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas: SBCTA, 2001. v. 35, n. 1/2, p. 12-19.

AMERINE, M. A.; PANGBOM, R. M.; ROESSLER, E. B. **Principles of Sensory Evaluation of Food**. New York: Academic Press, 1965. 602 p.

ARICA, M. Y. Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization. **Polymer Int**. v. 49, p. 775-781, 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986, 2^a Ed.

BAKKEN, A. P.; HILL Jr. C. G.; AMUDSON, C. H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized β -Galactosidase in a Spiral Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 33, n. 10, p. 1249-1257, 1989.

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.

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, p. 117-126, 2003.

BELITZ, H. D.; GROSH, W.; SCHIEBERLE, G. **Food Chemistry**. Germany: Springer, 2009. 1114 p.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press., 1997. cap. 1, p. 1-11.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: **Biochemical Engineering**. New York: Editora Marcel Dekker, 1997, 716 p.

BLOWEY, R. W. Factors Affeting Milk Quality. In: **Bovine Medicine**. Diseases and husbandry of cattle. Oxford: Blackwell, 1992, p. 329 – 334.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Secretaria de Vigilância Sanitária. **Nova legislação comentada de produtos lácteos.** Brasília: DF, 2002. 327 p.

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, p. 597-606, 2001.

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.** v. 21, p. 25-29, 2003.

BULHÕES, A. C.; GOLDANI, H. A. S; OLIVEIRA, F. S.; MATTE, U. S.; MAZZUCA, R. B.; SILVEIRA, T. R. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 40, n. 11, p. 1441-1446, 2007.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3ª ed, 751p.

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

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*.** 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A. C. Immobilization of β -galactosidase on Chitosan. **Biotechnol. Prog.** v.10, p. 220-224, 1996.

CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes – Research and Development.** New York: John Wiley & Sons, 1978. p. 71.

COLAÇO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M.; PINDER, S.; ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnology.** v. 10, p. 1007-1011, 1992.

COVILLE, D.; COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Applied Biochemistry.** v. 11, p. 55-64, 1995.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova.** v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DIXON M.; WEBB E. C. **Enzymes.** London: Longman Group Limited, 1979. 3ª ed.

EL-MASRY, M.M.; MAIO, A.D.; MARTELLI, P.L.; CASADIO, R.; MOUSTAFA, A.B.; ROSSI, S.; MITA, D.G. Influence of the immobilization process on the activity of β -galactosidase bound to Nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate: Part 1. Isothermal behavior. **J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.16, p. 175-189, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlim: Springer, 2004. 5ª ed., 454 p.

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. Desing and Characterisation of a Enzyme System for Inulin Hidrolysis. **Food Chemistry**. v. 95, p.77-82, 2006.

FOGLER, H .S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 2ª ed., 838p.

FREITAS, F. F. **Otimização do Processo de Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de Sódio com Gelatina e Glutaraldeído**. 2007. 220f. Tese - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

FREYER, J. **Elaboration de dulce de leche**. Primer curso de Capacitacion em Industria Lechera. FAO, Uruguai, 1972. p. 27.

FURIGO, A. JR.; PEREIRA, E. B. **Cinética enzimática**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. Apostila.

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 synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chem**. v. 97, p. 426-430, 2006.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**. v. 20, p. 2-12, 1985.

GHALY, A. 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.

GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of Chitosan-modified Invertase on Alginate-coated Chitin Support via Polyelectrolylite Complex Formation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 22-27, 2005.

GONZALEZ, L. V. Troca Iônica. Rio Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.dema.puc-rio.br/cursos/OUTecAmb/Troca_Ionica.ppt>. Acesso em março/2010.

GUIDINI, Z. C. **Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GUY, E. J.; EDMONSDON, L. F. Preparation and properties of syrups made by hydrolysis of lactose. **J. Dairy Sci.** v. 61, p. 542-549, 1978.

HAGE, D. S. J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. **Life Sci.** v. 3, p. 768, 2002.

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. **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.

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.

HEMME, D.; VASSAL, L.; FOYEN H.; AUCLAIR J. Effect de l'addition de lactase au lait sur le développement des *Lactobacilles* et des *Streptocoques thermophiles*. **Lait**. v. 59, p. 597. 1979.

HENG, M. H.; 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.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme Microb. Technology**. v. 7, p. 50-60, 1985.

HOBMAN, P. G. Review of Process and Products for Utilization of Lactose in Deproteinated 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. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v.3, p.1-38, 1997.

<http://www.fcf.usp.br>. Acessado em 21/03/2010

<http://www.rohmhaas.com/ionexchange>. Acessado em 10/02/2010

<http://www.embrapa.br>. Acessado em 15/06/2010

INSUMOS. Intolerância à lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose. São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: <www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/143.pdf>. Acesso em abril/2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 206.

JACOBSON, R. H. **Three Dimensional Structure of β -Galactosidase**. 1993. Ph.D._Thesis - Oregon State University, Corvallis, OR, USA.

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

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis os Lactose by β -galactosidase from *Kluyromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 300-309, 2002.

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, p. 33-40, 2004.

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. 1321-1354, 1985.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. In: **Biotechnology**. Germany: Ed. VCH Publ.-Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, 1987.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization. In **Biotechnology**. Enzyme Technology, ed. J. F. Kennedy, 1987, v. 7a, p. 347-404.

KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A.; SURAZYNSKI, A. Utilizacion de la β -D-galactosidase en la Elaboration de la Lecha Condensada Azucarada. **Le Lait**. v 527, p. 10-15, 1973.

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

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

KREMER, T.O. **Resinas de Troca Iônica**. São Paulo: Kurita do Brasil, 2007. Apostila.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinectic Modeling of Lactose Hydrolysis with an Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**. v. 27, p. 583-592, 2000.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, J.L.; GARCÍA-OCHOA, F. 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, p. 181-193, 2001.

LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. **Biotech. Bioeng.** v. 81, p. 241-252, 2002.

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.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas.** Blücher E. (ed), v. 2, p. 207-481. 1974.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnología Industrial: Procesos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2001. vol. 3, 593p.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics.** London, v. 27, p. 93-103, 2008.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes.** 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LÓPEZ-GALLEGO, L.; MATEO, C.; PALOMO, M. J.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; PESSELA, C. C. B.; HIDALGO, A. ; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, M. J. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 39, p. 274-280, 2005.

MAHONEY, R. R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, Water, Salts and Vitamins. **Advanced Dairy Chemistry.** London, v.3, p.77-125, 1997.

MAHONEY, R. R.; WHITAKER, J. R. Stability and enzymatic properties of beta-galactosidase the *Kluyveromyces fragilis*. **J. Food Sci.** Chicago, v. 42, p.327-350, 1977.

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.

MARIOTTI, M. P. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada.** 2000. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

MARIOTTO, J. R. Enzimas. Relatório Técnico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

MARIOTTI, M.P.; YAMANAKA, H.; Araujo, A.R.; and TREVISAN, H.C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal.** v.51 n.6, p.1233-1240, 2008.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I. W. **Bioanalytical Separations**. New York: Elsevier Science, 2003. cap. 7.

MARQUEZ, L. D. S.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 51, p. 86-92, 2008.

MATEO, C.; MONTI, R.; PESSELA, C. C. B.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUI SAN, M. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnology Prog.** v. 20, p. 1259-1262, 2004.

MATEO, C.; PALOMO, M. J.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, L.; PESSELA, C. C. B.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, M. J. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.** v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 3, p. 655-659. 2001.

MINAS AMBIENTE/CETEC. Pesquisa tecnológica para controle ambiental em pequenos e médios laticínios Minas Gerais: Alternativas Tecnológicas. Belo Horizonte: Minas Ambiente/CETEC, 1999. v. 2.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. In: Semana Ciências Agrárias, 1994. v. 15, n. 1.

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.

MOREIRA, K. M. M.; COELHO, L. H.; PERINI, C. C.; RAPACCI, M.; KARAM, L. B. Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por β -Galactosidade. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v. 7, n. 4, p. 375-382, 2009.

MORE, J.J.; WATSON, G.A. **The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory**. **Lecture Notes in Mathematics**. Springer Verlag, Berlin, v. 630, p. 105-116, 1977.

MORR, C. V.; HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MUKHOPADHYAY, R.; TALUKDAR, D.; CHATTERJEE, B. P. and GUHA, A. K. Whey processing with chitosan and isolation of lactose. **Process. Biochem.** V. 39, p. 381-385, 2003.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II Sul- Leite.** Maringá: UEM, 2002. p. 206 – 217.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology.** Boston: Elsevier, 2007. 421p.

NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; TORII, K.; YAMAMOTO, K.; KAMIKUBO, T. Properties of Immobilized β -deuterium-galactosidase from *Bacillus circulans*. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 5, n. 2, p. 115-120, 1983.

NERI D.F.M.; BALCÃO V.M.; CUNHA M.G.C.; CARVALHO L.B.Jr.; TEIXEIRA J.A. Immobilization of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications.** v. 9, p.2334-2339, 2008

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of Invertase. **Journal Americal Chemical.** v. 38, p. 1109-1114, 1916.

NICKERSON, T. A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry.** Connecticut: The AVI Publishing Co., 1974. 2nd ed., p. 224-260, 273-324.

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.

OLAFADEHAN, O. A. **The Transient Characteristics of a Packed Bed Tubular Reactor for Lactose-Lactase Hydrolysis.** B. Sc. Research Project, University of Lagos, Lagos, Nigeria. 1989

OLAFADEHAN, O.A.; ARIBIKE D. S., and ADEYEMO, A. M. Mathematical Modeling and Simulation of Steady State Plug Flow for Lactose-Lactase Hydrolysis in a Fixed Bed. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering.** v. 43, n. 1, p. 58-69. (2009).

OOSTEROM M. W.; BELLE H. J. A.; RANTWIJL F.; SHELDON R.A. Immobilised β -galactosidases and their Use in Galatoside Synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.** v. 134, p. 267-274, 1998.

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, p. 27-36, 2003.

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.

PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of Microbial Cells. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 303-319, 2000.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**. Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PETERSON, R. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase in capillary bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 34, p. 438-446, 1989.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 18, p. 237-255, 1998.

POMERANZ, Y.; JOHNSON, J. A.; SHELLENBERGER, J. A. Effect of various sugars on browning. **J. Food Sci.** v. 27, p. 350-354, 1962.

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.

PORTO, L.M. **Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção da Ricota**. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG, 2001.

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.

PRETTO, F. M.; SILVEIRA, T. R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**. PortoAlegre, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.

RENNER, E. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Germany: W. G. Mott, University of Glessen, Munich, 1983. p.1-450.

RIBEIRO E. J. **Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada**. 1989. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

RIBEIRO, H. S. **Obtenção e aplicação de concentrados protéicos de soro de leite bovino em produtos cárneos**. 2000. 194f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

RODRIGUES, F. Aproveitamento de soro de queijos. Juiz de Fora: Queijos no Brasil/Casa do Queijeiro. Disponível em: <http://www.queijosnobrasil.com.br/portal/index.php?cod_tipo=2&cod_dados=172>. Acesso em abril/2010.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized enzymes and cells**. Philadelphia: IOP Publishing Ltda., 1987.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, n.7, p. 558-567, 1998.

SCOUTEN, W. H. **Methods in Enzymology**. Mosbach: K. ed., 1987. vol. 135, p.30-65.

SEGEL, I.H. **Enzyme Kinetics**: Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: John Wiley and Sons, 1993.

SEVERINSEN, G. S. Analytical methods for rennet characterization. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**. v. 30, n. 2, p. 109-116, 1979.

SHAH, N. O.; NICKERSON, T. A. Functional properties of hydrolyzed lactose: solubility, viscosity and humectant properties. **J. Food Sci**. v. 43, p. 1081, 1978.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Adv. Synth. Catal**. v. 349, p. 1289-1307, 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.

SPARVOLI, A. C. **Má absorção de lactose do adulto em uma população nordestina**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1989.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**. 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.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. 2007. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.11.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 192 p.

TOMOTANI, E. J.; VITOLLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process. Biochem.**, v. 41, p. 1325-1331, 2006.

UGGIONI, P. L.; FAGUNDES, R. L. M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Higiene de Alimentos**. São Paulo, v. 21, n. 140, p. 24-29, 2006.

UHLIG, H. Enzyme Arbeiten für uns, **Technische Enzyme und ihre Anwendung**, München, Carl Hanser Ed, p.198-211, 1991.

USDEC, 2009. U. S. Dairy Export Council. Reference Manual for U. S. Whey and Lactose products. Whey and Lactose: natural milk products. Disponível em <www.fas.usda.gov>. Acesso em junho/2009.

VEREDAS, V. **Purificação da α -Lactalbumina a partir do Soro de Leite em Leite Fixo e Expandido de Resinas**. 2000. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

VICENTE A. A. **Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. p. 4, 8, 25.

VIETH, W.R.; VENKATASUBBRAMANIAN, K.; CONSTANTINI-DES, A. & DAVIDSON, B. Design and Analysis of Immobilized-Enzyme Flow Reactors. – in **Applied Biochemistry and Bioengineering**. v. 1 ed. WINGARD, L.B.; KATCHALSKI, E. & GOLDS-TEIN, L.; Academic Press, New York, p.221-327, 1976

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1978.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

WEETALL H. H. Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry. **Process Biochemistry**. p. 3-30, 1975.

WOODWARD, J. **Immobilised Cells and Enzymes: a practical approach**. Washington: Ed. by IRL Press Oxford. 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.

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**. 1989. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-85.

ZIMMER, T. R. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbico em batelada seqüencial com biomassa granulada tratando soro de queijo**. 2006. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

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](#)