

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS**  
**Curso de Graduação em Engenharia Química**

**Fabiana Dinelli Salvático de Paula Kraft**

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE DESNATADO POR  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis***

Belo Horizonte

2017

**Fabiana Dinelli Salvático de Paula Kraft**

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE DESNATADO POR  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Engenharia Química da Pontifícia  
Universidade Católica de Minas Gerais, como  
requisito para obtenção do Diploma de  
Graduação em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Raquel Sampaio Jacob

Belo Horizonte

2017

**Fabiana Dinelli Salvático de Paula Kraft**

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE LACTOSE EM LEITE DESNATADO POR  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Engenharia Química da Pontifícia  
Universidade Católica de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do Diploma de  
Graduação em Engenharia Química.

---

Prof<sup>a</sup> Raquel Sampaio Jacob – PUC Minas (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup> Neuza de Mesquita Antonino – PUC Minas (Banca examinadora)

Belo Horizonte, 07 de Junho de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e que participaram dessa jornada. Em especial aos meus pais e à minha avó por me ajudarem e me apoiarem durante toda a execução do projeto; à professora Neuza, por repassar o conhecimento que serviu como base para a elaboração deste estudo; à professora Raquel, pela orientação e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho; às técnicas de laboratório Thais e Talita, pelo auxílio na execução dos experimentos; ao professor Leonardo, pela colaboração e solidariedade. Agradeço também a todos os professores responsáveis pela minha formação e que transmitiram os conhecimentos indispensáveis para a execução deste trabalho.

## RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose no leite possibilita a ingestão desse alimento por indivíduos com intolerância à lactose, sem que ocorram os sintomas fisiológicos adversos, causadas pela presença desse açúcar. Neste trabalho foi estudada a cinética enzimática da hidrólise da lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em leite desnatado UHT. Com esse objetivo, foi realizado o planejamento fatorial contendo os fatores temperatura, pH e concentração da enzima nos respectivos níveis: 30 e 40°C; 6,9 e 7,3; 3,0 e 9,0 U/mL. Utilizou-se o método de GOD-POD para analisar a concentração de glicose nas amostras e foi aplicada a metodologia das velocidades iniciais com a finalidade de calcular a variável de resposta do planejamento, definida como atividade específica  $U_L$  ( $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{dL} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}_{\text{(solução enzimática)}}$ ). Após calculada, a  $U_L$  foi modelada em função dos fatores apresentados, resultando em uma equação com  $R^2$  igual a 1. Posteriormente, foi realizada a análise de efeitos, a partir da qual observou-se a maior influência da variação da temperatura e do pH na variável de resposta, comparadas ao efeito principal da enzima. Além disso, o efeito da interação entre pH e temperatura mostrou-se significativo. Foi verificado também que as condições em que foi obtido maior valor da  $U_L$  foram 40°C, pH 6,9 e 9,0 U/mL. Esses parâmetros foram aplicados em seguida aos experimentos com a finalidade de definir os parâmetros de Michaelis-Menten. Nesse caso, utilizou-se o leite desnatado UHT com os fatores de diluição 2, 4, 6 e 8. Logo, a partir dos resultados de velocidades iniciais e das concentrações dos substratos em função do fator de diluição, foi gerado o modelo cinético, que apresentou  $V_{\text{máx}}$  igual a 3,962 mM/min e  $\alpha K_m$  igual a 284,546 % $[S]$ . O valor de  $\alpha K_m$  foi predito, com base em dados da literatura, para a faixa de 384 a 435 mM.

Palavras-chave:  $\beta$ -galactosidase. Cinética enzimática. Leite. Lactose. *Kluyveromyces lactis*. Planejamento fatorial. Michaelis-Menten.

## ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of lactose in milk enables the ingestion of this aliment by lactose intolerant individuals, without experiencing the adverse physiologic symptoms caused by the presence of this sugar. In this paper was studied the enzyme kinetics of the lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in skim UHT milk. With this purpose, a factorial design was performed containing the factors temperature, pH and enzyme concentration, with the respective levels being: 30 and 40°C; 6,9 and 7,3; 3,0 and 9,0 U/mL. The GOD-POD method was used to analyze the glucose concentration in the samples and the methodology of initial velocities was applied in order to calculate the design's response variable, defined as specific activity  $U_L$  ( $\text{mg}_{\text{glucose}}/\text{dL} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}_{(\text{enzymatic solution})}$ ). After being calculated, the  $U_L$  was modelled in terms of the presented factors, resulting in an equation with  $R^2$  equal to 1. Afterwards an analysis of effects was conducted, from which has been observed major influence of the variation of temperature and pH in the response variable, compared to the enzyme's main effect. Furthermore, the interaction effect between pH and temperature showed to be significant. It has also been verified that the conditions in which the highest value of  $U_L$  has been obtained were 40°C, pH 6,9 and 9,0 U/mL. These parameters were then applied to the experiments for the purpose of defining the Michaelis-Menten parameters. In this case the UHT skim milk was utilized with the dilution factors of 2, 4, 6 and 8. Therefore, based on the results of initial velocities and substrate concentrations in terms of the dilution factors, the kinetic model was generated. It presented  $V_{\text{máx}}$  equal to 3,962 mM/min and  $\alpha K_m$  equal to 284,546 % $[S]$ . Based on literature data, the  $\alpha K_m$  value was predicted to be within the range of 384 to 435 mM.

Keywords:  $\beta$ -galactosidase. Enzyme kinetics. Milk. Lactose. *Kluyveromyces lactis*. Factorial Design. Michaelis-Menten.

## LISTA DE SÍMBOLOS

E	- Enzima
S	- Substrato
ES	- Complexo enzima-substrato
EP	- Complexo enzima-produto
k	- Constante de velocidade
<b>k</b>	- Constante de Boltzmann
T	- Temperatura
h	- Constante de Planck
e	- Número de Euler
$\Delta G^\ddagger$	- Energia de ativação
R	- Constante dos gases ideais
[ ]	- Concentração
V <sub>0</sub>	- Velocidade Inicial
V <sub>máx</sub>	- Velocidade Máxima
K <sub>m</sub>	- Constante de Michaelis
EI	- Complexo enzima-inibidor
$\alpha$	- Fator aparente que modifica K <sub>m</sub>
K <sub>I</sub>	- Constante de inibição competitiva
ESI	- Complexo enzima-substrato-inibidor
$\alpha'$	- Fator aparente que modifica V <sub>max</sub> e K <sub>m</sub>
k <sub>cat</sub>	- número de renovação ou de turnover
K <sub>I'</sub>	- Constante de inibição incompetitiva

## LISTA DE ABREVIATURAS

- UHT - Ultra Alta Temperatura
- HTST - Pasteurização de alta temperatura e curto tempo
- NMP - número mais provável
- n - número de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente
- c - número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores "m" e "M".
- m - limite inferior (mínimo) aceitável. É o valor que separa uma qualidade satisfatória de uma qualidade marginal. Valores abaixo do limite "m" são desejáveis.
- M - limite superior (máximo) aceitável. Valores acima de "M" não são aceitos.
- ONPG - orto-nitrofenol-beta-galacto-piranosídeo



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada.....	24
FIGURA 2 – Gráfico da equação de Michaelis-Menten.....	29
FIGURA 3- Tipos de inibição reversível .....	32
FIGURA 4 – Gráficos duplo-recíprocos para inibição competitiva, incompetitiva e mista.....	35
FIGURA 5 – Diagrama esquemático da metodologia.....	39
FIGURA 6 – Banho termostático contendo as amostras.....	45
FIGURA 7 – Desnaturação das amostras .....	46
FIGURA 8 – Amostras com reagente de cor após serem retiradas do banho ultratermostático .....	47
FIGURA 9 – Amostras no banho ultratermostático .....	48
FIGURA 10 – Preparo das amostras para execução dos testes de Michaelis Menten .....	49
FIGURA 11–Glicose gerada (mg/dL) pelo tempo de reação para os testes de 1 a 8 .....	50
FIGURA 12 – Gráfico dos efeitos principais para a atividade específica UL .....	54
FIGURA 13 – Gráfico de interação para a atividade específica UL.....	55
FIGURA 14 – Curva de Michaelis-Menten para pH 6,9, temperatura 40°C e concentração de enzima 9,0 U/mL contendo todos os pontos avaliados .....	57
FIGURA 15 – Gráfico de resíduos para o modelo apresentado na figura 14 .....	57
FIGURA 16 – Curva de Michaelis-Menten para as amostras diluídas .....	59
FIGURA 17 – Gráfico de resíduos para o modelo apresentado na figura 16 .....	59
FIGURA 18 – Interferência do tampão fosfato utilizado no ajuste de pH do leite.....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição média do leite em g/100g.....	16
TABELA 2 – teor de lactose presente no leite de diferentes mamíferos .....	17
TABELA 3 – Características microbiológicas dos leites .....	20
TABELA 4 – Características de enzimas $\beta$ -galactosidase provenientes de diferentes origens .....	26
TABELA 5 – Planejamento fatorial .....	43
TABELA 6 – Velocidades iniciais e atividades específicas para os testes do planejamento fatorial .....	52
TABELA 7 – Efeitos principais e combinados para os fatores temperatura (T), pH e concentração de enzima (E).....	53

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Leite.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.1 Lactose.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2 Processamento do leite .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3 Tipos de leite .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Intolerância à lactose .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Hidrólise da lactose.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Enzimas.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1 <math>\beta</math>-Galactosidase.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Cinética enzimática .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 Influência do pH sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.2 Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.3 Influência da concentração da enzima e do substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.4 Cinética de Michaelis-Menten .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.5 Influência de inibidores sobre a cinética de Michaelis-Menten .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.6 Cinética da <math>\beta</math>-Galactosidase.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Determinação da atividade da <math>\beta</math>-Galactosidase .....</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.1 Programa utilizado para realização e análise do planejamento experimental e regressão do modelo de Michaelis-Menten .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2 Substrato e enzima .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.3 Reagentes e equipamentos utilizados para controle de pH.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.4 Equipamentos utilizados para controle de temperatura.....</b>	<b>40</b>

3.1.5 Equipamentos e reagentes utilizados para preparo e adição da enzima às amostras .....	40
3.1.6 Vidrarias utilizadas para retirada e contenção das alíquotas .....	40
3.1.7 Equipamentos utilizados para desnaturação das alíquotas contidas nos tubos de ensaio .....	41
3.1.8 Equipamentos utilizados para armazenamento das amostras desnaturadas.....	41
3.1.9 Equipamentos utilizados para diluição dos padrões de glicose e das amostras desnaturadas .....	41
3.1.10 Reagentes e equipamentos utilizados para realização da curva de calibração e quantificação da glicose nas amostras desnaturadas.....	41
3.1.11 Reagentes e equipamentos utilizados para diluição do leite .....	42
3.2 Métodos.....	42
3.2.1 Planejamento experimental.....	42
3.2.2 Ajuste do pH das amostras de leite desnatado UHT.....	43
3.2.3 Realização dos testes enzimáticos e desnaturação das amostras .....	44
3.2.4 Preparo dos padrões e realização da curva de calibração.....	46
3.2.5 Quantificação da glicose nas amostras desnaturadas .....	47
3.2.6 Tratamento de dados .....	48
3.2.7 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.1 Análise Fatorial.....	51
4.1.1 Modelo da atividade específica UL em função dos fatores temperatura, pH e concentração de enzima.....	52
4.1.2 Efeitos principais e de interações dos fatores do planejamento fatorial ..	53
4.2 Modelo de Michaelis-Menten .....	56
5. CONCLUSÃO .....	62
5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE.....	70

## 1 INTRODUÇÃO

O leite, apesar de ser necessário somente nos primeiros meses de vida, é um alimento que está inserido em grandes proporções na dieta humana, seja pela ingestão direta do leite e seus derivados, como queijos, iogurtes, manteiga e doces, ou pelo consumo de receitas que são feitas à base de laticínios. No entanto, muitos indivíduos sofrem efeitos colaterais indesejados após ingerir esses alimentos, como diarreia e náusea, que são sintomas característicos da intolerância à lactose. Essa doença ocorre quando o organismo não apresenta níveis suficientes de atividade da lactase, também chamada de  $\beta$ -galactosidase, que é enzima responsável por degradar a lactose, o principal açúcar do leite. (FREITAS, 2007; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013; OLIVEIRA, 2013).

Com o objetivo de atender ao consumo dessa parcela da população, muitas indústrias alimentícias começaram a inserir produtos lácteos isentos da presença da lactose no mercado. Atualmente, não apenas os intolerantes consomem esses produtos, como também indivíduos que não apresentam essa condição, mas que buscam uma dieta mais saudável e perda de peso. (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2015).

Um dos métodos mais utilizados para remover a lactose no leite é a hidrólise enzimática, que ocorre a partir da inserção da enzima lactase no meio, provocando a quebra da lactose em glicose e galactose. Esses monossacarídeos podem ser absorvidos pelas pessoas com intolerância à lactose sem causar os efeitos adversos provocados pelo consumo de laticínios comuns. (CARMINATTI, 2001; OLIVEIRA, 2013).

Embora a lactase possa ser obtida a partir de diversas fontes, como plantas, animais e bactérias, apenas as produzidas por fungos e leveduras são consideradas adequadas e seguras à aplicação industrial em alimentos. Isso decorre do fato de que as propriedades da lactase variam de acordo com a espécie da qual ela provém, devendo ser propícias para que a enzima seja utilizada industrialmente. A lactase da *E. coli*, por exemplo, apresenta problemas de toxicidade, o que inviabiliza sua aplicação no processamento de alimentos. (FREITAS, 2007)

O estudo das propriedades enzimáticas, além de garantir a segurança da aplicação das enzimas industrialmente, também objetiva a melhora da qualidade dos produtos finais. A obtenção de dados de pH e temperatura ótimos, assim como o modelo cinético da reação, possibilita dimensionar e projetar reatores em escala industrial. Esse estudo aplicado à lactase, fornece informações fundamentais para favorecer e otimizar o processo produtivo de leite sem lactose. (BORZANI et. al., 2012; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014; FREITAS, 2007; FREITAS, 2013).

No presente trabalho utilizou-se o recurso de planejamento fatorial para avaliar os efeitos dos fatores temperatura, pH e concentração de enzima na hidrólise da lactose em leite desnatado UHT. A variável de resposta do planejamento, definida como atividade específica, foi modelada em função dos fatores e, em seguida, foi gerado o modelo de Michaelis-Menten para as condições ótimas de temperatura, pH e concentração de enzima. (FREITAS, 2007; FREITAS, 2013).

## **1.2 Objetivo Geral**

Estudar a cinética da hidrólise da lactose em leite desnatado UHT, utilizando como catalisador biológico a  $\beta$ -galactosidase proveniente da *Kluyveromyces lactis*.

## **1.3 Objetivos específicos**

- Modelar a cinética da reação estudada com base nos fatores pH, temperatura e concentração da enzima;
- Estudar os efeitos e significâncias dos fatores pH, temperatura e concentração de enzima;
- Identificar as condições de maximização da atividade enzimática, com base no planejamento fatorial estudado;
- Determinar o modelo de Michaelis-Menten e as constantes relacionadas a ele ( $\alpha K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ );

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leite

O leite é produzido pelas fêmeas de mamíferos nas glândulas mamárias e é utilizado para alimentar os recém-nascidos durante as primeiras etapas de vida, sendo também uma das fontes principais de energia, proteínas e lipídeos para dieta de seres humanos. (FREITAS, 2007; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013). A estimativa da capacidade de produção brasileira em 2015, de acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Leite (2015), em mil litros por ano foi de 15.884.062 e, de acordo com a mesma fonte, a recepção nesse ano foi de 9.857.409 mil litros.

Em termos do aspecto físico-químico, o leite possui cor branca opaca, proveniente da dispersão da luz refletida pelos colóides, proteínas e pelos lípidos emulsificados, podendo apresentar coloração levemente amarelada, em decorrência da presença de caroteno e riboflavina. O sabor do leite é ligeiramente adocicado e seu aroma relaciona-se com a concentração de citratos. (BEZERRA, 2010; SILVA, 1997; VENETURINI, SARCINELLI e SILVA, 2007).

Outra característica físico-química é a acidez natural do leite, que provém da presença de ácido láctico, que varia de 0,14 a 0,18 g/100mL, e de outras substâncias, como caseína, albumina e citratos. O leite pode desenvolver maior teor de acidez devido a reações entre a lactose e enzimas provenientes da microbiota do leite, causando aumento da quantidade de ácido láctico presente. (FISCHER, 2010; SILVA, 1997; VALSECHI, 2001).

Além disso, a 15°C a densidade do leite apresenta-se na faixa de 1,023 g/mL a 1,040 g/mL, exibindo menores valores com a redução do teor de gordura. Para a mesma temperatura, os calores específicos em  $\text{KJ K}^{-1} \text{Kg}^{-1}$ , equivalem a 3,93 e 3,95, respectivamente para o leite integral e o desnatado. Esses leites apresentam respectivos valores de tensão superficial de 55,3 mN/m e 57,4 mN/m, que são reduzidos pelo aumento do teor de proteínas e de ácidos graxos livres. (SILVA, 1997)

Com relação à água, o leite é duas vezes mais viscoso, sua temperatura de congelamento é cerca de 0,5°C menor e a de ebulição aproximadamente 1°C maior.

Além disso, o pH do leite varia de 6,6 a 6,8 e a condutividade elétrica entre 4,61 e 4,92 mS/cm. (FISCHER, 2010; SILVA, 1997; VALSECHI, 2001).

Outro aspecto que caracteriza o leite é a sua composição, que varia de acordo com fatores como espécie produtora, raça, indivíduo, período de lactação, alimentação, idade, entre outros. Em média, o leite é formado por 7/8 em massa de água e o restante de substâncias sólidas, que incluem proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas. Na tabela 1, verifica-se a composição média de substâncias do leite. Para uma base de 100 gramas de leite de vaca, a energia obtida ao consumi-lo encontra-se na faixa entre 59 a 66 Kcal. (FREITAS, 2007; VALSECHI, 2001 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

**Tabela 1 – Composição média do leite em g/100g**

Componente	Teor (g/100g)	Variação (g/100g)
Água	87,3	85,5 – 88,7
Lactose	4,6	3,8 – 5,3
Gordura	3,9	2,4 – 5,5
Proteínas	3,25	2,3 – 4,4
Minerais	0,65	0,53 – 0,80
Ácidos orgânicos	0,18	0,13 – 0,22
Outros	0,14	–

Fonte: adaptado de SILVA, 1997

Um dos principais constituintes do leite é a lactose, cujas propriedades estão descritas no item 2.1.1.

### **2.1.1 Lactose**

A lactose ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-  $\beta$ -D-glicopirranose) é um dissacarídeo redutor formado pela ligação  $\beta$ -1,4 entre a D-glicose e D-galactose. Ela está presente no leite de mamíferos e sua concentração varia entre as espécies, como mostrado na tabela 2. (NELSON e COX, 2014; FREITAS, 2013; FISCHER, 2010; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).



**Tabela 2 – teor de lactose presente no leite de diferentes mamíferos**

Origem	Concentração de lactose no leite (g/100g)
Vaca	4,5 – 5,1
Ser humano	6,9
Búfalo	3,2 – 4,9
Cabra	4,2 – 4,5
Ovelha	4,5 – 5,4

Fonte: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013

Segundo Freitas (2007), a lactose pode apresentar-se nas formas anôméricas  $\alpha$  e  $\beta$ , que diferem entre si pela configuração do grupo hidroxila livre do carbono anomérico. Ambas as formas estão sujeitas a um equilíbrio de mutarrotação, ou seja, convertem-se uma na outra de maneira contínua. Esse equilíbrio é afetado por fatores como temperatura, concentração das espécies e pH da solução. Na temperatura ambiente, o equilíbrio resulta na proporção de 2 partes de  $\alpha$ -lactose para três partes de  $\beta$ -lactose. (FREITAS, 2007).

Os anômeros da lactose apresentam diferentes propriedades físicas, como por exemplo, o ponto de fusão ( $\alpha$ -lactose se funde próximo a 202°C e a  $\beta$ -lactose a 175°C) e solubilidade. A  $\beta$ -lactose é mais solúvel em água do que a  $\alpha$ -lactose e dissolve-se até que a solução se torne saturada. Nesse instante, o equilíbrio é deslocado para a formação de  $\alpha$ -lactose que, após saturar a solução, forma cristais pouco solúveis de  $\alpha$ -lactose monoidratada. A presença desses cristais no leite reduz sua qualidade, conferindo a ele uma textura arenosa. Uma das alternativas para evitar que isso ocorra é a aplicação de enzimas lactase, que hidrolisam esse açúcar e o transformam em monossacádeos mais solúveis, glicose e galactose. (FREITAS, 2007).

### **2.1.2 Processamento do leite**

A obtenção do leite cru deve ser realizada com higienização dos equipamentos envolvidos, local, mãos e vestuário do operador. Antes da ordenha, as tetas do animal devem ser lavadas com água corrente e secas com papel toalha,

com descarte dos jatos iniciais. As tetas são desinfetadas com produtos apropriados após o término da ordenha, podendo também ser realizada antes dela em caso de mamite. A matéria-prima passa por um controle de qualidade, que envolve análises mensais de contagem padrão em placas, contagem de células somáticas e pesquisa de resíduos de antibióticos e a determinação diária de densidade, teor de sólidos gordurosos e não-gordurosos, entre outros. (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

O leite obtido é filtrado em recipiente adequado e refrigerado na temperatura de no máximo 4°C ou 7°C, de acordo com o tipo de tanque de refrigeração utilizado. A temperatura correspondente deverá ser atingida em até 3 horas após o término da ordenha. Quando o leite é transportado para um estabelecimento responsável pelo processamento, sua entrega deve ser feita em até 2 horas após a ordenha e na temperatura máxima de 7°C. Tanto a filtragem quanto a refrigeração são medidas que promovem redução do crescimento microbiano, causando o aumento do tempo de conservação deste alimento. (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011; VENETURINI, SARCINELLI e SILVA, 2007).

O beneficiamento do leite é caracterizado por uma série de operações unitárias que visam sua adequação à legislação e a torná-lo apropriado para o consumo humano. Os tratamentos térmicos do leite são a pasteurização e a ultrapasteurização, que dá origem ao leite UAT (Ultra Alta Temperatura), também chamado de UHT. Na pasteurização lenta, o leite é aquecido a uma temperatura de 63°C por 30 minutos, porém atualmente a maioria dos processos empregam a pasteurização de alta temperatura e curto tempo (HTST), que ocorre a 72°C por 15 segundos. A homogeneização é realizada em seguida para impedir a formação de nata no leite pasteurizado e consiste na redução do tamanho de glóbulos de gordura em suspensão, tornando-os dispersos na solução. (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005; GRAVE, 2011 ZANCAN, 2012; VENETURINI, SARCINELLI).

O processo de ultrapasteurização promove a esterilização do leite, possibilitando seu armazenamento sem necessidade de refrigeração. Ele é executado com a inserção de uma camada fina de leite a 74°C em uma câmara de vapor superaquecido, provocando um aumento de temperatura até 140°C em menos de um segundo. Após permanecer por três segundos em um tubo de armazenamento, o leite é resfriado em uma câmara de vácuo a 74°C. O leite UHT também pode passar previamente por bactofugação (sistema Ultra Fresh), que

remove bactérias e esporos pela centrifugação a alta velocidade. A centrifugação também é utilizada com objetivo de produzir leites desnatado, semidesnatado e padronizado, pela separação e ajuste do teor da gordura do leite, e promover a clarificação pela remoção de impurezas. (TORTORA, FUNKE e CASE, 2006; GRAVE, 2011 ZANCAN, 2012; VENETURINI, SARCINELLI e SILVA, 2007; MÜLLER, 2012).

### **2.1.3 Tipos de leite**

Para que o leite se adeque aos padrões de qualidade e seja comercializado, é necessário que seja executada uma série de operações unitárias desde a sua coleta até o armazenamento e expedição. A instrução normativa n. 51 estabelece os critérios de produção e propriedades físico-químicas e microbiológicas finais para leites tipo A, B e C: O leite A é produzido, beneficiado e envasado na granja leiteira; O leite tipo B é produzido na propriedade rural, resfriado a 4°C e transportado para ser beneficiado em estabelecimento industrial; o prazo de vigência do tipo C foi expirado em 2007 e esse leite era caracterizado pela produção na propriedade sem haver nenhum tratamento térmico, com posterior transporte para beneficiamento industrial. Atualmente, o leite cru refrigerado substitui o tipo C e é obtido pela produção rural, resfriamento em posto de refrigeração ou indústria e consequente beneficiamento industrial. Quando o cru refrigerado é pasteurizado, recebe o nome de leite pasteurizado. (BRASIL, 2002; PORTZ, 2011; VENETURINI, SARCINELLI e SILVA, 2007).

A Instrução Normativa n.51 também apresenta o regulamento de teor de gordura para os leites produzidos, com a seguinte classificação: o leite integral apresenta a concentração original, de no mínimo 3,0% em massa; o leite padronizado possui teor de gorduras de 3,0 % m/m; o leite semidesnatado está na faixa de 0,6 a 2,9% m/m; e o leite desnatado possui concentração menor que 0,5% m/m. O número de microrganismos permitidos varia com o tipo de leite e o tratamento realizado, como mostrado na tabela 3. (BRASIL, 2002).

**Tabela 3 – Características microbiológicas dos leites**

Requisito	Tipo A	Tipo B	Pasteurizado	UHT
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	n = 5; c= 2; m =5,0x10 <sup>2</sup> ; M = 1,0x10 <sup>3</sup>	n = 5; c = 2; m = 4,0x10 <sup>4</sup> ; M = 8,0x10 <sup>4</sup>	n = 5; c = 2; m = 4,0x10 <sup>4</sup> ; M = 8,0x10 <sup>4</sup>	N=5; c=0; m=100
Contagem padrão em placas para cru refrigerado integral (UFC/mL)	Máximo 1x10 <sup>4</sup>	Máximo 5x10 <sup>5</sup>	Máximo 1,0x10 <sup>5</sup> (regiões S/SE/CO) Máximo 3,0x10 <sup>5</sup> (regiões N/NE)	-
Coliformes a 30 – 35 °C (NMP/mL)	N = 5; c = 0; m < 1	n = 5; c = 2; m=2; M=5	n = 5 ; c = 2 ; m = 2; M =4	-
Coliformes a 40°C (NMP/mL)	N = 5; c = 0; m= ausência	n = 5; c = 1; m=1; M=2	n = 5; c = 1; m = 1; M = 2	-
Salmonella spp. em 25 mL	N = 5; c = 0; m= ausência	n = 5; c = 0; m= ausência	n = 5; c = 0; m= ausência	-

Fonte: adaptado de BRASIL, 2002; BRASIL, 2011; PORTZ, 2011

## 2.2 Intolerância à lactose

A hipersensibilidade ao leite caracteriza-se por reações adversas na mucosa do intestino e pode decorrer de reações imunológicas, no caso da alergia à proteína do leite, ou reações não imunológicas, que é o caso da intolerância à lactose. (OLIVEIRA, 2013; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

Indivíduos intolerantes à lactose possuem comprometimento da atividade ou da produção da enzima lactase e, por esse motivo, não conseguem digerir a lactose de maneira apropriada, gerando sintomas como diarreia e gases. A enzima encontra-se na borda em escova do intestino e quebra a lactose em monossacarídeos, que são absorvidos pelas células entéricas e levados pela a

corrente sanguínea até o fígado, onde são metabolizados. Quando a lactose não é digerida, sua presença na luz intestinal causa aumento da pressão osmótica, que faz com que haja elevação da quantidade de água e eletrólitos na mucosa, ocasionando a diarreia. A lactose chega ao cólon e é fermentada pela microbiota bacteriana, gerando gás carbônico, metano e gás hidrogênio, responsáveis pela distensão abdominal, e ácidos graxos de cadeia curta, que acidificam as fezes. (OLIVEIRA, 2013; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

A intolerância à lactose é classificada em três tipos: primária, secundária e congênita. A deficiência primária da lactase é de causas genéticas e ocorre a partir do término do período de amamentação, de forma lenta e gradativa. Ela é comum em adultos, sendo denominada hipolactasia ou não persistência da lactose. Essa condição aumenta com a idade dos indivíduos e varia entre os grupos étnicos, de acordo com a sua dieta típica. Populações que incluem laticínios em sua alimentação apresentam maior número de pessoas com persistência à lactose, devido à seleção genética de indivíduos com capacidade superior de digestão da lactose. A deficiência secundária é resultado de lesão da mucosa intestinal por medicamentos e tratamentos como quimioterapia, e doenças como gastroenterite, doença celíaca<sup>1</sup> e de Crohn<sup>2</sup>. Ela é mais comum na infância e pode ser revertida pelo tratamento da doença que causou a lesão. A deficiência congênita é rara, proveniente de herança genética e é autossômica recessiva. Essa doença caracteriza-se pela alteração do gene que codifica a produção da lactase, resultando na ausência da enzima funcional no organismo. (OLIVEIRA, 2013; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

### **2.3 Hidrólise da lactose**

A hidrólise da lactose é aplicada industrialmente com o objetivo de produzir leites e derivados apropriados para o consumo em dietas com restrição à lactose. Este processo também auxilia na qualidade dos produtos gerados, pois contribui para a redução da cristalização da lactose nos laticínios e gera produtos da reação,

---

<sup>1</sup> Reação do sistema imunológico à ingestão de glúten, causando inflamação intestinal.

<sup>2</sup> Doença inflamatória crônica do intestino que afeta o revestimento do trato digestivo.

glicose e galactose, que são mais solúveis e de duas a três vezes mais doces que a lactose. (FISCHER, 2010).

Os métodos empregados para hidrolisar a lactose são a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. A utilização de ácido forte como catalisador ocorre a temperaturas elevadas, entre 100 e 150 °C, e em pH na faixa de 1,0 a 2,0. A conversão é rápida e o custo é baixo, mas são gerados efeitos indesejados no leite, como alteração no sabor, escurecimento, reações paralelas complexas que geram subprodutos e desnaturação proteica. Outra forma de realizar a hidrólise ácida é o uso de resinas de troca catiônica, que podem ser regeneradas e, portanto, são mais utilizadas do que os ácidos. (FREITAS, 2007; FISCHER, 2010; FREITAS, 2011; CARMINATTI, 2001).

A hidrólise enzimática apresenta vantagem sobre o método ácido por ser realizada em condições mais brandas de pH e temperatura. Essa propriedade a torna mais adequada para utilização no processamento de alimentos, pois não permite a desnaturação proteica. A formação dos monossacarídeos auxilia processos fermentativos empregados na fabricação de iogurtes e leites fermentados, confere mais cremosidade aos sorvetes e contribui para aumentar o poder adoçante do leite e do soro, gerando economia na quantidade de sacarose utilizada no preparo de produtos açucarados. A hidrólise da lactose também confere ao leite maior viscosidade, permitindo concentrar os sólidos sem problemas de cristalização, e solubilidade a 25°C passa de apenas 17% m/v de lactose pura para 55% m/v de lactose 90% hidrolisada. (FREITAS, 2007; FISCHER, 2010; FREITAS, 2011; CARMINATTI, 2001).

A utilização da enzima para hidrolisar a lactose no leite é feita de três maneiras. No uso em batelada, a enzima é utilizada na forma livre e é perdida durante a pasteurização do leite hidrolisado. Já nos casos de recuperação por membrana e imobilização, existe a possibilidade de reutilizar a enzima, o que reduz custos de compra. Os reatores de ultrafiltração com membrana retêm a enzima livre e reduzem as reações inibitórias devido à constante retirada de produtos do meio. A imobilização promove a fixação da enzima em um suporte, impedindo seu movimento na solução e pode ser aplicada em processos contínuos. A vantagem da imobilização é a redução do volume do reator devido à alta concentração de

enzimas por área de suporte, porém, após imobilizadas, as enzimas perdem parte de sua atividade. (CARMINATTI, 2001).

## 2.4 Enzimas

Enzimas são moléculas orgânicas produzidas pelos seres vivos e atuam como catalisadores das reações biológicas. Com exceção das RNAses, todas as enzimas são proteínas e, portanto, sua atividade catalítica está diretamente relacionada à integridade de sua estrutura, podendo ser perdida em caso de desnaturação ou dissociação de suas unidades. (NELSON e COX, 2014).

Além da estrutura proteica, as enzimas podem estar associadas a outros componentes cuja presença é indispensável para que elas apresentem funcionamento adequado. São eles os cofatores, íons inorgânicos como  $Mg^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , e as coenzimas, moléculas orgânicas como as vitaminas e derivados delas. Esses grupos podem estar ligados fortemente às enzimas, tornando-se grupos prostéticos, ou fracamente, sendo então possível regular a atividade enzimática. (NELSON e COX, 2014).

A reação enzimática é caracterizada pelo mecanismo de ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e pode ser escrita de uma maneira geral como mostrado na equação 1, em que E é a enzima, S o substrato, ES o complexo enzima-substrato, EP é o complexo enzima-produto e P o produto da reação. (NELSON e COX, 2014).



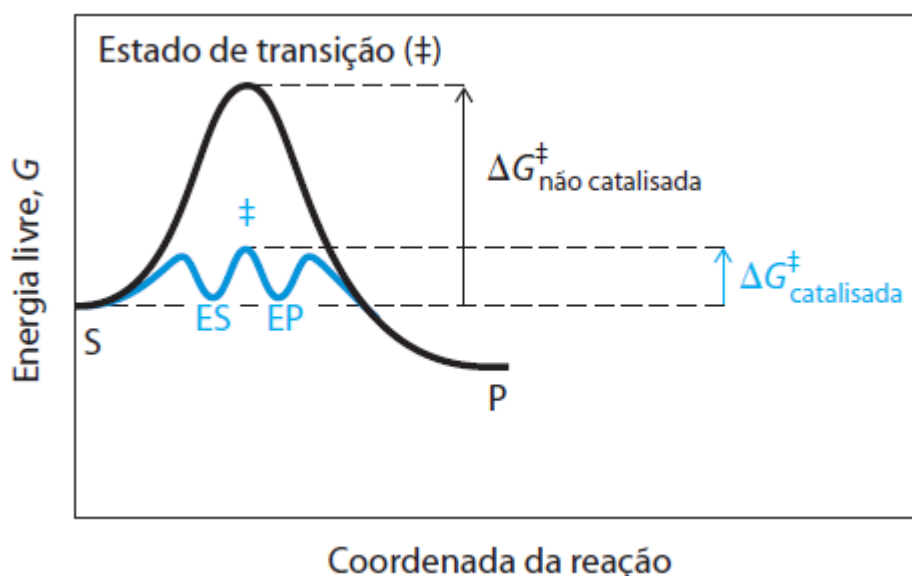
O sítio ativo é uma porção da enzima cuja superfície apresenta as cadeias laterais de aminoácidos e que engloba o substrato, formando um complexo enzima-substrato. Após a formação deste complexo, forma-se um estado de transição, caracterizado pela momentânea quebra e formação de ligações químicas. Isso dá origem ao complexo enzima-produto, gerando, por fim, a separação entre ambos. As energias de ativação envolvidas nesse processo, se comparadas à conversão de substrato em produto na ausência da enzima, são efetivamente menores, causando assim, um aumento da velocidade da reação. Isso é ratificado pela lei de Arrhenius, mostrada na equação 2, que demonstra a dependência da constante de velocidade

em relação à energia de ativação<sup>3</sup>, na forma inversa e exponencial: (NELSON e COX, 2014; BORZANI *et al.*, 2012).

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2)$$

Deve-se ressaltar que a enzima não afeta o equilíbrio da reação, porém faz com que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente. A figura 1 mostra o diagrama comparativo entre a reação com e sem a presença de enzima e pode-se observar que ambos os complexos ES e EP ocupam os menores valores de energia na progressão da reação. (NELSON e COX, 2014).

**Figura 1 – Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada**



Fonte: NELSON e COX, 2014

Essa redução da energia de ativação proporcionada pela ação enzimática provém principalmente da energia de ligação resultante da interação ES. A formação de ligações covalentes transitórias no sítio ativo fornece uma parte da energia necessária para diminuir a energia de ativação, mas o principal contribuinte para ocasionar esse abaixamento é o grande número de ligações fracas e interações

<sup>3</sup> Energia necessária para que os reagentes atinjam o estado de transição de uma reação.



formadas entre enzima e substrato, como as ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas, iônicas e de van der Waals. A energia de ligação também é responsável por conferir às enzimas a propriedade de especificidade, definida como a capacidade de diferenciar o substrato de outras moléculas competidoras. Além disso, a necessidade de muitas ligações fracas para promover a catálise é um dos motivos que confere às enzimas seu tamanho, muito superior ao de seu substrato. (NELSON e COX, 2014; FOGLER, 2012). Segundo Borzani *et al* (2012) uma uréase apresenta um peso molecular de 500.000 daltons e catalisa a hidrólise da ureia, que apresenta, em contrapartida, uma massa molar de apenas 60 daltons.

O modelo atual de mecanismo de reação enzimática considera que a enzima apresenta seu sítio ativo na forma complementar ao estado de transição da reação, e não ao substrato, como havia sido sugerido na hipótese “Chave e fechadura” de Fischer, em 1894. Essa atual proposta possibilita explicar o abaixamento da energia de ativação, pois ocorre a otimização das interações no estado de transição. Essas ligações fazem com que haja maior estabilização do conjunto, reduzindo sua energia total. (NELSON e COX, 2014).

#### **2.4.1 $\beta$ -Galactosidase**

Lactase é o nome popular de uma enzima  $\beta$ -galactosidase que catalisa a reação de hidrólise da lactose em glicose e galactose. Ela encontra-se presente em plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras, sendo essas duas últimas fontes permitidas para uso em indústrias alimentícias, segundo a legislação brasileira. De acordo com a resolução RCD nº 53/2014, espécies permitidas são: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.* Cada uma das espécies e gênero citados produz  $\beta$ -galactosidases com diferentes características entre si, tanto químicas, como por exemplo peso molecular e cofatores necessários, quanto cinéticas, tais como pH e temperatura ótimos. A tabela 4 correlaciona algumas dessas propriedades de  $\beta$ -galactosidases de diferentes fontes microbianas. As  $\beta$ -galactosidases possuem aplicações industriais na fabricação de biosensores, laticínios sem lactose, etanol e galacto-oligossacarídeos, além de desempenharem

um papel importante nas pesquisas médicas. (FREITAS, 2007; FREITAS, 2013; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014; LEISTER, 2014).

**Tabela 4 – Características de enzimas  $\beta$ -galactosidase provenientes de diferentes origens**

Fonte	pH ótimo	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Peso molecular (Da)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	Nenhum	55-60	124000
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	Nenhum	50-55	90000
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	Mn <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>	37	201000
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	Mn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	35	135000

Fonte: Adaptado de FISCHER, 2010; VALSECHI, 2001

O mecanismo de atuação da  $\beta$ -galactosidase ocorre, de maneira geral, primeiramente pela formação de um complexo com a lactose, seguido da geração de glicose e formação concomitante do complexo da enzima com o grupo galactosil. Depois disso, um grupo aceitor nucleofílico que carrega um grupo hidroxil recebe a porção galactosil, liberando a enzima para a catálise posterior. O grupo aceitor principal é a água, devido à presença elevada no meio, resultando na formação de galactose. Embora em menor proporção, açúcares também podem atuar para receber o grupo galactosil, o que ocasiona a geração de galacto-oligossacarídeos. Essa etapa predomina no início da reação e é influenciada pela alta concentração de lactose e outras condições, como pH e temperatura. Dessa forma, a reação da lactase não é restrita ao substrato lactose, podendo atuar como uma galactotransferase em açúcares que contenham a ligação  $\beta$ -D-galactosídica. (FREITAS, 2007; LEISTER, 2014).

## 2.5 Cinética enzimática

A cinética enzimática é o estudo que objetiva medir a velocidade da reação enzimática e como ela se modifica ao alterar parâmetros experimentais, como concentrações de enzima e substrato, pH, temperatura, entre outros. A partir desse estudo, é possível criar modelos matemáticos que correlacionam as variáveis estudadas e otimizá-los. As variáveis otimizadas poderão ser utilizadas em projetos de reatores e os modelos podem ser usados em estudos bioquímicos para a compreensão de mecanismos enzimáticos. (FISCHER, 2010; NELSON e COX, 2014).

A medida da velocidade é realizada por meio da análise da concentração do substrato ou do produto da reação enzimática pelo tempo, mantendo constantes as condições experimentais como pH, temperatura e concentração da enzima. O método mais utilizado para essa finalidade é o cálculo das velocidades iniciais, que consiste em determinar a velocidade no tempo igual a zero ( $V_0$ ). Graficamente, isso equivale a traçar uma tangente à curva no tempo zero. A vantagem dessa técnica é que nesse instante são conhecidas as condições experimentais, sendo que a partir deste momento elas podem variar. Algumas causas de mudanças são atribuídas à labilidade da enzima, que reduz a atividade enzimática total, e a atuação dos produtos formados como inibidores. Quando o método das velocidades iniciais não pode ser empregado, ou por obstáculos experimentais ou por dificuldade de representação da reação por equação química, utiliza-se o recurso da velocidade média, representada graficamente por uma secante à curva em um intervalo de tempo definido. (NELSON e COX, 2014; BORZANI *et al.*, 2012).

### **2.5.1 Influência do pH sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima**

A atividade enzimática varia de acordo com o pH do meio, no sentido de aumentar ao aproximar-se de certo valor ou faixa de pH, denominado pH ótimo, e reduzir ao distanciar-se dele. Essa característica provém do fato de que muitos dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo podem funcionar como ácidos ou bases fracas e, dessa forma, para que a enzima funcione adequadamente, os

grupos deverão apresentar-se no estado de ionização adequado. Além disso, existem substratos que apresentam grupos ionizáveis, sendo assim influenciados pelas variações de pH. Se o meio apresentar um pH diferente do ótimo, as interações da enzima com o substrato serão menos eficientes, podendo chegar à completa inviabilização devido à desnaturação. (NELSON e COX, 2014; FREITAS, 2007; FISCHER, 2010).

### **2.5.2 Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima**

O aumento de temperatura apresenta o efeito de aumentar a velocidade de reação, devido ao aumento da energia cinética do sistema e, conseqüentemente, o número de colisões efetivas. Entretanto, isso é verificado até certo valor, a partir do qual ocorre a desnaturação térmica da enzima. Ambas as reações enzimática e de desnaturação apresentam constantes de velocidade, que são afetadas pelo aumento de temperatura segundo a lei de Arrhenius<sup>4</sup>. A diferença está nos valores de energia de ativação de cada uma delas: a energia de ativação da formação dos produtos chega a ser dez vezes menor do que a de desnaturação. Devido a esse fator, o aumento de temperatura favorece a velocidade de desnaturação mais do que a de formação de produtos, chegando a um valor máximo, chamado de temperatura ótima. A partir desse valor, a taxa de formação de produtos, em vez de aumentar, passa a decrescer devido ao crescimento do número de enzimas inativadas. (FOGLER, 2012; FREITAS, 2007; BORZANI *et al.*, 2012).

### **2.5.3 Influência da concentração da enzima e do substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima**

Segundo Borzani *et al.* (2012), experimentos realizados nas mesmas condições, diferindo apenas com relação à concentração inicial da enzima, mostram que a velocidade de reação varia proporcionalmente à concentração da enzima, para uma determinada faixa. Dessa forma, ao traçar um gráfico da velocidade de

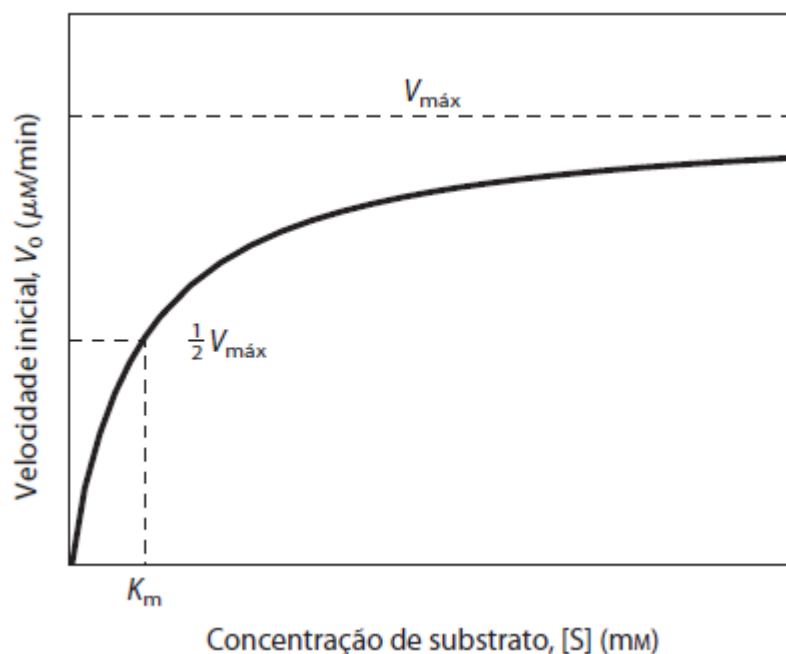
---

<sup>4</sup> Equação que relaciona a constante de velocidade de uma reação com a temperatura.

reação pela concentração da enzima, seria obtida uma reta. A faixa linear, de acordo com Bianconi (2006), é observada para casos de alta concentração de substrato com relação à concentração da enzima.

O efeito da concentração do substrato é mostrado na figura 2, em que  $V_0$  é uma função crescente da  $[S]$ . Para concentrações de substrato mais baixas, observa-se uma relação praticamente linear entre as duas variáveis, sendo que pequenos aumentos de  $[S]$  provocam grandes aumentos de  $V_0$ . Isso não ocorre, porém, quando a concentração atinge valores maiores, havendo redução do aumento de  $V_0$  em resposta ao aumento da  $[S]$ . Esse comportamento decorre da saturação da enzima com o substrato a altas concentrações deste, o que causa a interrupção do aumento da velocidade. Dessa forma, o limite de  $V_0$  quando  $[S]$  tende a infinito é uma assíntota que demarca  $V_{m\acute{a}x}$ , a velocidade máxima da reação. (BORZANI *et al.*, 2012; NELSON e COX, 2014).

**Figura 2 – Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima**



Fonte: NELSON e COX, 2014

Na figura 2 pode-se observar ainda a presença da variável  $K_m$ , chamada de constante de Michaelis. Ela corresponde à concentração de substrato quando a

velocidade inicial é a metade da velocidade máxima e está presente nas equações cinéticas de Michaelis-Menten. (NELSON e COX, 2014).

#### **2.5.4 Cinética de Michaelis-Menten**

Leonor Michaelis e Maud Menten foram dois pesquisadores que propuseram um modelo matemático para a cinética enzimática, tomando como base duas etapas de reação, como mostrado na equação (3). São elas a transformação reversível de enzima (E) e substrato (S) em um intermediário (ES) e, a partir dele, a transformação em enzima e produto (P). Devido à baixa concentração de produtos no início da reação, despreza-se a reversibilidade da segunda etapa, o que simplifica a dedução. (NELSON e COX, 2014).



O principal fator levado em consideração para o desenvolvimento do modelo é a hipótese do estado estacionário, elaborada por Briggs e Haldane, que permite considerar que a concentração de ES permanece invariável com o tempo. Com base nisso, são igualadas as velocidades de formação e de quebra de ES e, após manipulações algébricas, chega-se à equação 4: (NELSON e COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Em que  $V_0$  é a velocidade inicial,  $V_{\text{máx}}$  a velocidade máxima,  $[S]$  a concentração de substrato e  $K_m$  a constante de Michaelis.

A equação de Michaelis-Menten pode ser representada em um gráfico, como mostrado na figura 2, no qual a curva de  $V_0$  por  $[S]$  possui formato de hipérbole retangular. Para determinar os valores de  $V_{\text{máx}}$  e de  $K_m$ , utiliza-se o método de Lineweaver-Burk, que consiste em inverter ambos os lados da equação. Fazendo isso, obtém-se um gráfico do inverso de  $V_0$  pelo inverso de  $[S]$ , no qual os pontos que cortam os dois eixos respectivamente são o inverso de  $V_{\text{máx}}$  e o inverso negativo de  $K_m$ . (NELSON e COX, 2014 ; BORZANI *et al.*, 2012).

Outro parâmetro utilizado juntamente à cinética de Michaelis-Menten é o  $k_{cat}$ , também chamado de número de renovação ou de *turnover*. Ele equivale à constante de velocidade da etapa limitante da reação. Quando a enzima está saturada com substrato,  $k_{cat}$  equivale ao número de moléculas de substrato convertidas em produtos por uma única molécula de enzima por unidade de tempo. O parâmetro  $K_{cat}/K_m$  é chamado de constante de especificidade e é utilizado para comparar a eficiência catalítica de enzimas diferentes. (FOGLER, 2012; NELSON e COX, 2014).

Embora a dedução da equação de Michaelis-Menten seja baseada em um mecanismo simples de apenas duas etapas, observa-se que muitas enzimas que possuem mecanismos com muitas etapas podem seguir o modelo proposto de maneira eficiente. A limitação do modelo diz respeito à verdadeira interpretação do significado de  $V_{máx}$  e de  $K_m$  para diferentes enzimas, pois não fornecem informação sobre o número de etapas da reação e nem sobre as velocidades e a natureza química delas. Por exemplo, no caso de duas etapas, em que a última seja a limitante,  $K_m$  pode ser definida como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato (constante de dissociação), mas isso não é válido para a maioria dos casos, em que existe alta conversão de ES em produtos ou quando  $K_m$  é uma função complexa de muitas constantes de velocidade. (NELSON e COX, 2014).

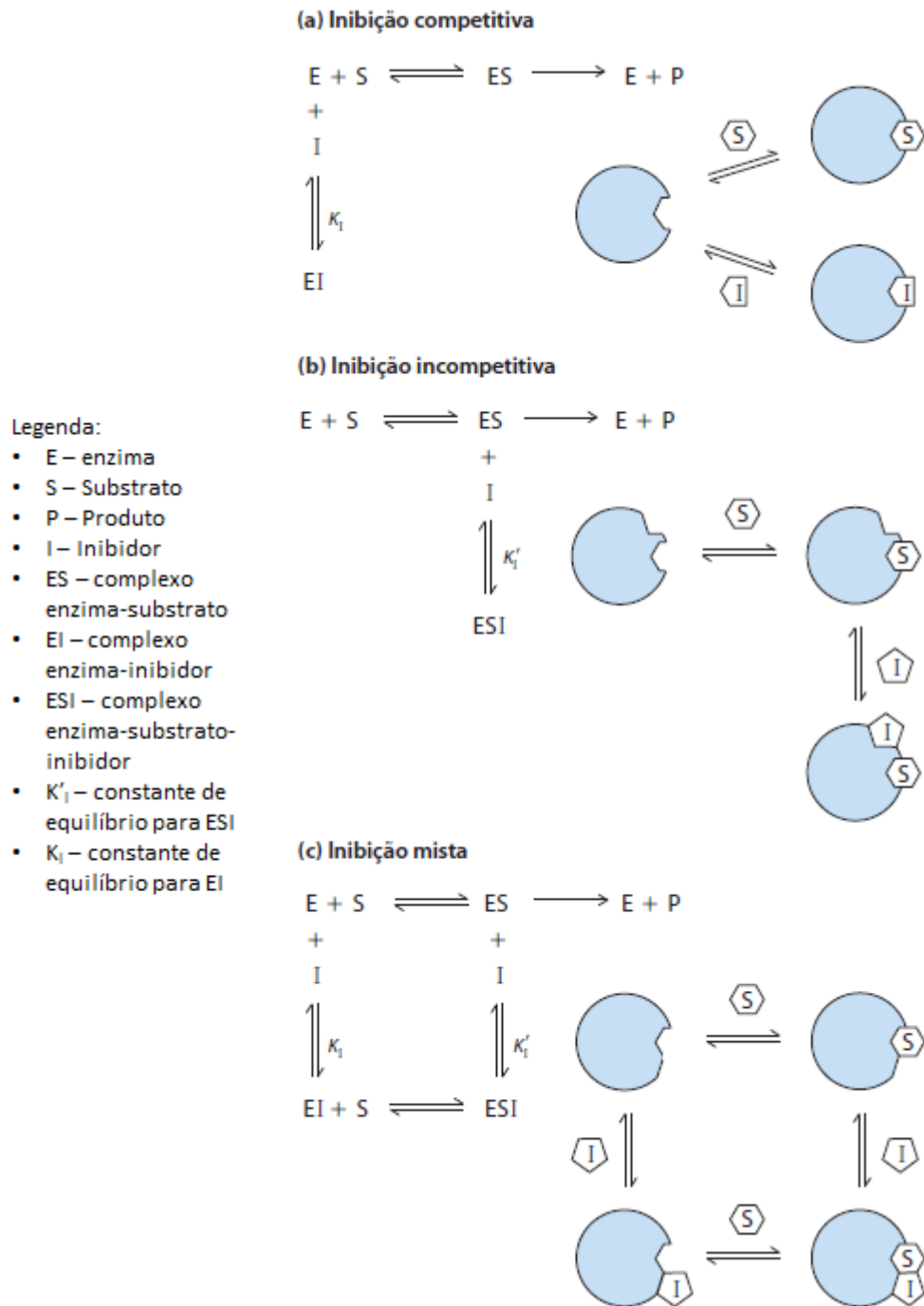
### **2.5.5 Influência de inibidores sobre a cinética de Michaelis-Menten**

Um inibidor é definido como uma substância que interage com a enzima, causando redução da velocidade da reação catalisada ou até mesmo sua interrupção. Não apenas substâncias externas à reação principal podem atuar como inibidores, como também substratos e produtos gerados. O efeito da presença de um inibidor pode ser negativo ou positivo dependendo da reação afetada: no caso de envenenamento por cianeto, a enzima citocromo oxidase é inibida, o que faz com que a respiração aeróbia seja interrompida, levando à morte; em contrapartida, a aspirina, ao inibir a síntese de prostaglandina, causa a atenuação da propagação da dor. (BORZANI et al, 2012; NELSON e COX, 2014; FOGLER, 2012).

Os mecanismos de inibição enzimática podem ser divididos em irreversível e reversível, sendo o último dividido em inibição competitiva, incompetitiva e mista,

como mostrado na figura 3. Quando uma enzima é inibida irreversivelmente, significa que o inibidor liga-se a ela de forma que a dissociação entre ambos é rara ou impossível. Já no caso de uma inibição reversível, a ligação pode ser desfeita e a reação de inibição fica sujeita a um equilíbrio químico. (FOGLER, 2012; BORZANI *et al.*, 2012)

**Figura 3- Tipos de inibição reversível**



Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2014



A inibição competitiva ocorre quando o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, formando um complexo enzima-inibidor EI. Esse mecanismo provém frequentemente da similaridade estrutural do inibidor com o substrato. Os efeitos causados na cinética da reação podem ser evidenciados na equação 5, na qual Km multiplicado por um fator alfa é denominado Km aparente. Não há alteração da velocidade máxima, mas sim o aumento de valor do Km aparente, ou seja, para que se atinja metade da velocidade máxima, a concentração de substrato deverá ser superior, se comparada à da reação sem inibidor. Para reduzir a taxa de formação de EI e favorecer a formação de ES, adiciona-se mais S, minimizando, assim, a probabilidade de ligação da enzima com o inibidor. (NELSON e COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (5)$$

$$\text{Onde: } \alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) ; K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

A inibição incompetitiva, também chamada de incompetitiva, ocorre quando o inibidor combina-se a um sítio diferente do sítio ativo da enzima, porém apenas quando esta se apresenta na forma ES. Isso leva à formação reversível de um complexo inativo ESI. A cinética da reação, mostrada na equação 6, revela que, a altas concentrações de substrato, a velocidade V0 equivale a aproximadamente Vmax/α'. Logo, a inibição incompetitiva reduz a Vmáx medida e, conseqüentemente, o Km medido também será diminuído pelo mesmo fator 1/α'. (NELSON e COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (6)$$

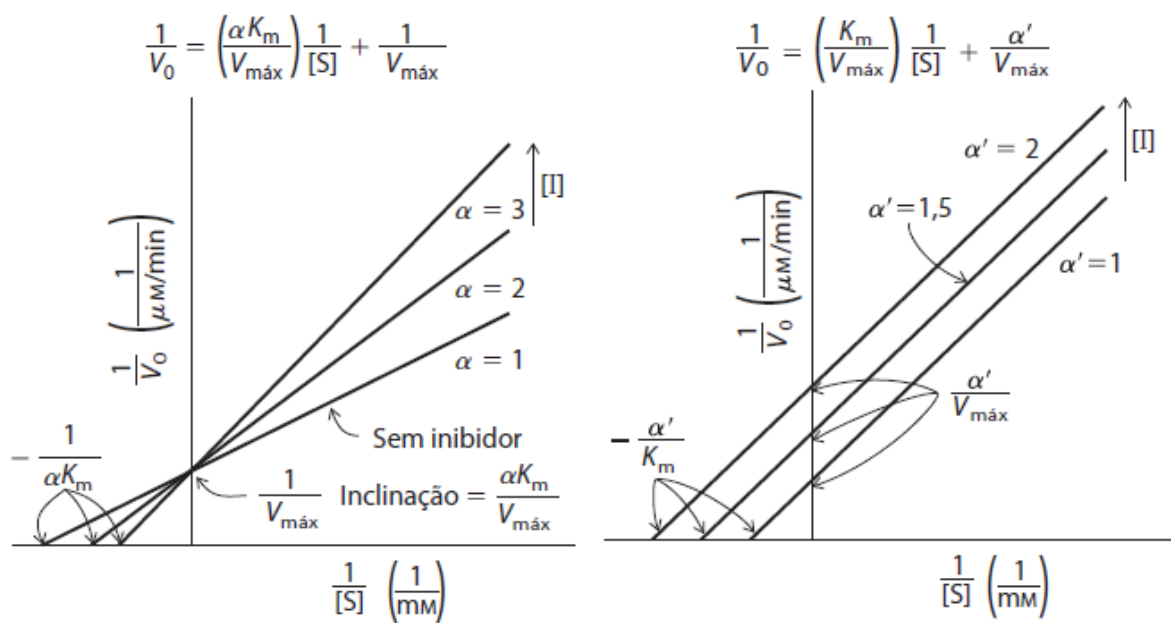
$$\text{Onde: } \alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K'_I}\right) ; K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

O último tipo de inibição reversível, chamada de inibição mista, ocorre quando o inibidor se liga tanto à enzima quanto ao complexo ES, em um sítio diferente do sítio ativo. A equação 7 descreve a lei de velocidade dessa inibição, sendo  $\alpha$  e  $\alpha'$  os mesmos parâmetros definidos nas inibições anteriores. Um inibidor misto afeta tanto  $V_{m\acute{a}x}$  quanto  $K_m$ , com exceção de um caso raro particular, chamado de inibição não competitiva, em que  $\alpha$  e  $\alpha'$  são iguais, causando influência apenas em  $V_{m\acute{a}x}$ . O  $K_m$  aparente é multiplicado por  $\alpha/\alpha'$  e a  $V_{m\acute{a}x}$  aparente por  $1/\alpha'$ . (NELSON e COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (7)$$

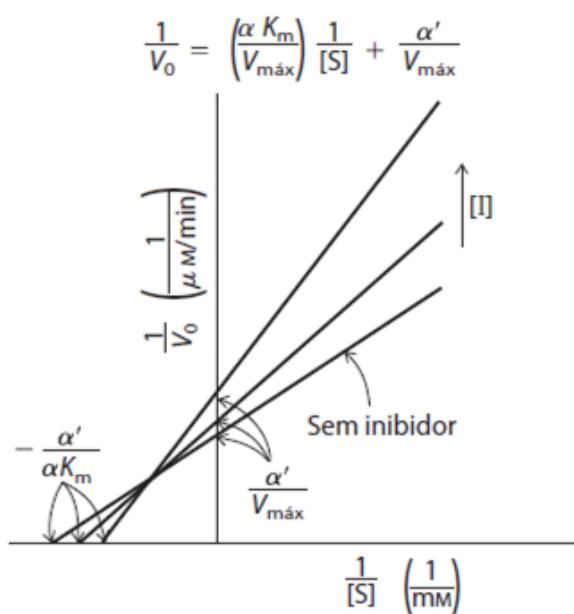
A equação 7 pode ser utilizada como modelo geral para descrever a velocidade de inibidores reversíveis: na inibição competitiva e na incompetitiva,  $\alpha'$  e  $\alpha$  equivalem a 1, respectivamente. Os gráficos de Lineweaver-Burk para cada inibição reversível podem ser visualizados na figura 4. (NELSON e COX, 2014).

**Figura 4 – Gráficos duplo-recíprocos para inibição competitiva, incompetitiva e mista**



Inibição competitiva.

Inibição incompetitiva.



Inibição mista.

Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2014

### 2.5.6 Cinética da $\beta$ -Galactosidase

Freitas (2007) realizou testes para determinar o melhor modelo de Michaelis-Menten para ser aplicado à cinética da  $\beta$ -Galactosidase proveniente de *Aspergillus oryzae*. A autora testou a lactose, a glicose e a galactose como possíveis inibidores da reação e obteve resultados de atividade decrescentes em função do aumento do teor de galactose. Esse perfil não foi observado para as outras substâncias estudadas, mostrando que apenas a galactose seria responsável pelo efeito inibitório. (FREITAS, 2007).

Após determinar a galactose como o inibidor da reação, Freitas (2007) executou experimentos variando a concentração de lactose e de galactose. Após obter os resultados de velocidade de reação, foram realizadas regressões não lineares para cada tipo de modelo de inibição. A partir da análise dos valores dos parâmetros cinéticos e estatísticos, foi definido que o modelo de melhor ajuste foi o de inibição competitiva. A 35°C e pH 4,5, os valores de  $K_m$ ,  $K_i$  e  $V_{m\acute{a}x}$  encontrados foram respectivamente 17,61 g/L (51,49 mM) , 1,015 g/L (5,63 mM) e 2,40 g<sub>glicose</sub>/L.minuto.mg<sub>proteína</sub>. (FREITAS, 2007).

Hatzinikolaou *et al.* (2005) realizaram testes para definir a cinética da  $\beta$ -Galactosidase de origem *Aspergillus niger* em soro de leite para diferentes temperaturas. Com base método de velocidades iniciais, os autores realizaram um número de experimentos variando a concentração do soro por diluição e a concentração de galactose. Após a confecção do gráfico de Lineweaver-Burk, os valores encontrados em pH 3,5 e para as respectivas temperaturas 35, 45, 55, 65, e 75 °C foram:  $K_m$  igual a 31,8, 39,2, 61,4, 89,2 e 106,4 mM e  $K_i$  igual a 6,56, 6,98, 8,92, 12,7 e 13,8 mM. Esses valores foram posteriormente modelados em equações relacionando-os à temperatura de operação. (HATZINIKOLAOU, 2005).

Matioli *et al.* (2003) estudaram a cinética da  $\beta$ -Galactosidase da *Kluymeromyces fragilis*, utilizando como substrato a lactose presente no leite em pó desnatado. Foram testados matematicamente os modelos de inibição por substrato e por produto, sendo o último o que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais.

Jurado *et al.* (2002) reuniram modelos cinéticos propostos para a  $\beta$ -Galactosidase por diferentes autores e foi verificado que a maioria consistia em Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto (galactose). No estudo de

Jurado *et al.* (2002) foram também reunidos valores de  $K_m$  e  $K_i$  da literatura, obtidos em condições variadas de temperatura, pH, origem da enzima e suporte de imobilização, quando utilizado. Esses valores apresentaram grande divergência de um trabalho para outro, até mesmo nos que empregaram condições experimentais similares. Nelson e Cox (2014) afirmaram que o valor de  $K_m$  pode variar bastante em virtude não apenas do tipo de enzima utilizado, como também para diferentes substratos de uma mesma enzima.

## 2.6 Determinação da atividade da $\beta$ -Galactosidase

A atividade de uma enzima é definida como a quantidade de produto gerado pelo tempo de reação. Uma unidade de atividade (U), também chamada de unidade internacional (UI), é definida como uma unidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de produto por minuto, dadas as específicas condições de temperatura e pH. Quando não especificadas, significa que essas condições são as padrões de pH 7,5 e 30°C. A definição de unidade de atividade é flexível pode variar dependendo do ensaio enzimático realizado. (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004; FARRELL e TAYLOR, 2005).

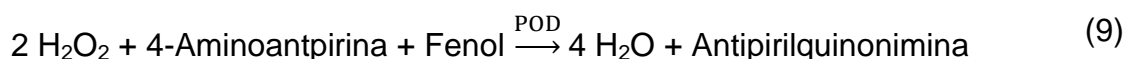
Outras definições de atividade muito utilizadas são a atividade específica e a atividade volumétrica, que são informadas em preparações enzimáticas comerciais sólidas e líquidas, respectivamente. Uma unidade de atividade específica é dada como 1U/mg<sub>proteína</sub>, o que equivale a 1  $\mu$ mol/min. mg<sub>proteína</sub> e uma unidade de atividade volumétrica é o equivalente a 1U/mL, ou seja, 1  $\mu$ mol/min.mL. A primeira fornece informações sobre a pureza da enzima e a segunda sobre a concentração dela. (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004; FARRELL e TAYLOR, 2005).

Os ensaios enzimáticos medem o desaparecimento de substrato ou o aparecimento de produtos pelo tempo. Eles se classificam nos ensaios de tempo fixo (descontínuos) e nos ensaios contínuos. Nos ensaios descontínuos, são retiradas amostras em intervalos pré-fixados de tempo e feitas as leituras das concentrações. Nos contínuos a leitura ocorre em tempo real. (LIBRETEXTS, 2015)

O ensaio espectrofotométrico é um dos mais utilizados, por ser simples e apresentar seletividade e sensibilidade. Para uma reação enzimática cujo substrato e produtos não absorvem luz, existe a possibilidade de realizar o método

espectrofotométrico com a aplicação de reações acopladas. Para isso, são inseridas outras enzimas que utilizam o produto da reação principal como substrato, gerando novos produtos que podem ser detectados pelo espectrofotômetro. (LIBRETEXTS, 2015; GENSCRIPT, 2016)

Um dos métodos para medir a atividade da  $\beta$ -galactosidase é o uso da glicose-oxidase (GOD) e da glicose-peroxidase (POD). Essas enzimas transformam a glicose, que é produto da reação da  $\beta$ -galactosidase com a lactose, em Antipirilquinonimina, um composto que apresenta coloração avermelhada, que pode ser lida em um espectrofotômetro ajustado para 505 nm. As reações estão descritas nas equações 8 e 9: (CARMINATTI, 2001; FREITAS, 2007)

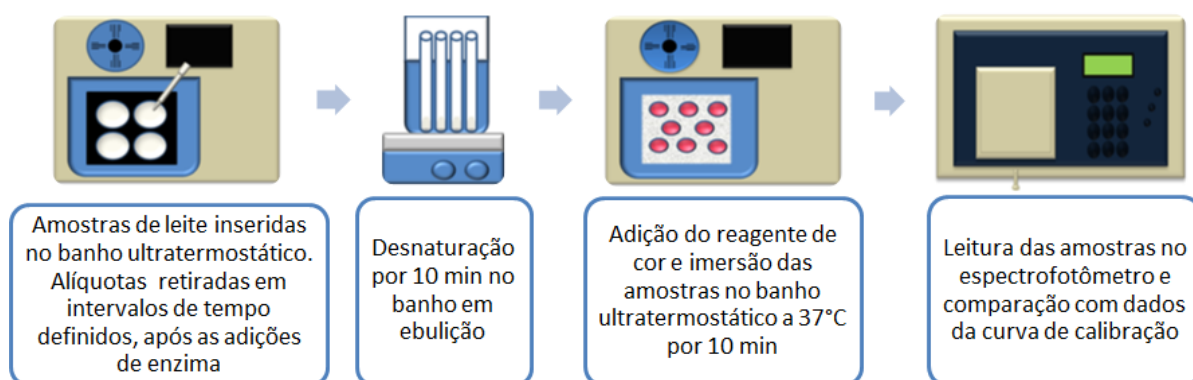


Outra forma para detectar a atividade da  $\beta$ -galactosidase é o uso de ONPG (orto-nitrofenol-beta-galacto-piranosídeo), que apresenta estrutura semelhante à lactose e é hidrolisado pela enzima em galactose e em orto-nitrofenol, que possui coloração amarela, lida no espectrofotômetro a 420 nm. Esse teste é muito utilizado para detectar a presença de bactérias fermentadoras de lactose. (HELD, 2007; ACHARYA, 2015).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo estão descritos a seguir. A figura 5 ilustra esquematicamente a metodologia utilizada.

**Figura 5 – Diagrama esquemático da metodologia**



Fonte: própria autora

#### 3.1 Materiais

##### ***3.1.1 Programa utilizado para realização e análise do planejamento experimental e regressão do modelo de Michaelis-Menten***

O software usado no planejamento de experimento, tratamento de dados e geração do modelo e Michaelis-Menten foi o Minitab 17.

##### ***3.1.2 Substrato e enzima***

O substrato utilizado foi o leite desnatado UHT da marca Itambé. A enzima aplicada nos experimentos foi a lactase ( $\beta$ -D-Galactosidase) proveniente da

*Kluyveromyces lactis*. Ela foi fornecida pela empresa Prozyn, com o nome comercial de Prozyn Lactase e atividade declarada de 50000 ONPGU/g.

### **3.1.3 Reagentes e equipamentos utilizados para controle de pH**

Utilizou-se tampão fosfato preparado de acordo com Gomori (2004) e NaOH(aq) para definição do método a ser utilizado. O pH do leite foi ajustado com uso de solução de NaOH 1 M e 0,1 M, com auxílio de um pHmetro, pipetas de Pasteur de plástico e agitador magnético da marca IKA® modelo C-MAG HS 7. Nesta etapa, utilizou-se béquer de 0,5 mL, proveta de 50 mL e béqueres de 100 mL.

### **3.1.4 Equipamentos utilizados para controle de temperatura**

Foi utilizado o banho ultratermostático da marca Quimis para controle de temperatura e um suporte de espuma de poliestireno para flutuação de quatro béqueres contendo as amostras, cada béquer com capacidade de 100 mL.

### **3.1.5 Equipamentos e reagentes utilizados para preparo e adição da enzima às amostras**

Utilizou-se a micropipeta de capacidade volumétricas de 2 – 20 µL da marca Gilson modelo P20, micropipeta de 100 – 1000 µL da marca Eppendorf modelo Research, balão volumétrico de 25 mL e solução de tampão fosfato com pH 7,0, preparada de acordo com GOMORI (2004).

### **3.1.6 Vidrarias utilizadas para retirada e contenção das alíquotas**

Para cada amostra dentro do banho ultratermostático utilizou-se uma pipeta de Pasteur de plástico. Utilizaram-se tubos de ensaio para conter as alíquotas retiradas.



### ***3.1.7 Equipamentos utilizados para desnaturação das alíquotas contidas nos tubos de ensaio***

Foi utilizada a chapa aquecedora IKA® modelo C-MAG HS 7 contendo bquer de 500 mL com água destilada.

### ***3.1.8 Equipamentos utilizados para armazenamento das amostras desnaturadas***

Utilizou-se plástico filme para tampar os tubos de ensaio contendo as amostras desnaturadas e um freezer para armazenamento.

### ***3.1.9 Equipamentos utilizados para diluição dos padrões de glicose e das amostras desnaturadas***

Foram utilizados tubos para centrífuga com tampa, de capacidade de 15 mL, micropipetas de capacidades volumétricas 10 – 100 µL da marca Paguepet, 10 -100 µL da marca Eppendorf modelo Research e 0,5 – 5,0 mL da marca Eppendorf.

### ***3.1.10 Reagentes e equipamentos utilizados para realização da curva de calibração e quantificação da glicose nas amostras desnaturadas***

Os reagentes empregados para quantificação de glicose provieram do kit Glicose PP, comercializado pela empresa Gold Analisa Diagnóstica e também utilizou-se o leite desnatado UHT da marca Itambé. Os equipamentos utilizados foram o banho ultratermostático da marca Quimis e os espectrofotômetros SHIMADZU modelo UV-3600 e Femto modelo 700 plus, com cubetas de quartzo e vidro para os respectivos espectrofotômetros. A micropipeta manuseada foi de capacidade 0,5 – 5,0 mL da marca Eppendorf.

### **3.1.11 Reagentes e equipamentos utilizados para diluição do leite**

Utilizou-se balões de 100 e 50 mL, pipetas volumétricas de 50, 25 e 10 mL e micropipeta da marca Eppendorf de capacidade volumétrica de 0,5 – 5,0 mL.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Planejamento experimental**

Foi realizado um planejamento fatorial no Minitab 17, constituído de três fatores (pH, temperatura e concentração da enzima), cada um em dois níveis. (FREITAS, 2007)

Os valores de pH utilizados foram provenientes da faixa de pH ótimo fornecidas por Valsechi (2001). Os valores de temperatura foram definidos como cinco graus acima e abaixo do valor de temperatura ótima. (VALSECHI, 2001). A concentração de enzima foi definida com base nos estudos realizados por Valsechi (2001) e Rosolen *et al.* (2015). A variável de resposta foi definida como atividade específica da enzima livre,  $U_L$ , equivalente a  $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{dL} \cdot \text{minuto} \cdot \text{mg}_{\text{(solução enzimática)}}$ . (FREITAS, 2007)

Dessa forma, os valores de pH foram 6,9 e 7,3, os valores de temperatura 30 e 40°C e os valores da concentração de enzima foram de 3,0 e 9,0 U/mL. O planejamento experimental está mostrado na tabela 5.

**Tabela 5 – Planejamento fatorial**

Experimento	T (°C)	pH	Concentração da enzima (U/mL)
T1	30,0	6,9	3,0
T2	30,0	7,3	3,0
T3	30,0	6,9	9,0
T4	30,0	7,3	9,0
T5	40,0	6,9	3,0
T6	40,0	7,3	3,0
T7	40,0	6,9	9,0
T8	40,0	7,3	9,0

Fonte: própria autora

### **3.2.2 Ajuste do pH das amostras de leite desnatado UHT**

Foram avaliados o uso do tampão fosfato proposto por Gomori (2004), o uso combinado de NaOH(aq) com o tampão e a utilização de apenas NaOH(aq) para correção do pH das amostras de leite, sendo o último método escolhido.

O ajuste de pH para cada quatro amostras foi realizado em um béquer de 500 mL contendo cerca de 250 mL de leite, agitado por um agitador magnético. O pHmetro foi colocado em contato com a solução, exibindo um valor inicial de pH igual a 6,72 para o leite utilizado nos testes do planejamento fatorial e 6,66 para o leite usado nos experimentos de cinética de Michaelis-Menten. Com auxílio de pipetas de Pasteur de plástico, foi adicionada solução de NaOH 1 M até atingir um valor de pH cerca de 0,05 abaixo do desejado. A partir dessa etapa, utilizou-se a solução de NaOH 0,1 M, que foi adicionada gota a gota até obter-se o pH esperado.

A agitação da amostra ao longo do ajuste de pH foi realizada intermitentemente: agitando a amostra após cada adição de base, de forma a homogeneizar a solução e interrompendo o movimento para que o pH pudesse ser medido sem que houvesse o erro causado pela interferência da agitação no mecanismo de aferição do pHmetro.

Após ajustado o pH da solução, utilizou-se uma proveta de 50 mL para transferir 50 mL da solução para cada um dos quatro béqueres de 100 mL, que foram tampados com plástico filme, identificados e armazenados na geladeira à temperatura de 0 a 4 °C. Esse procedimento foi realizado duas vezes, para o pH de 6,9 e o de 7,3.

### **3.2.3 Realização dos testes enzimáticos e desnaturação das amostras**

Primeiramente, para definir a densidade volumétrica da solução enzimática, pesou-se 1 mL da enzima em triplicata em uma balança analítica. Foi realizada a média dos valores das massas obtidas divididas pelo volume adicionado. Isso possibilitou quantificar o volume de enzima a ser adicionado para cada amostra, de acordo com os valores definidos no planejamento fatorial.

O teste enzimático foi realizado duas vezes com o primeiro bloco de testes contendo quatro amostras (T1 a T4) para a temperatura de 30°C e o segundo a 40°C, com as amostras T5 a T8. Para cada bloco, foram colocadas as amostras no banho termostático, como mostra a figura 6, e após atingido o equilíbrio térmico, foi adicionada à primeira delas o volume de solução enzimática correspondente ao planejamento fatorial. Essa etapa foi acompanhada do início da contagem do tempo, sendo aplicados intervalos de 2 minutos entre cada adição de enzima.

**Figura 6 – Banho termostático contendo as amostras**



Fonte: Própria autora

Para as amostras de T1 a T4, T7 e T8, foi utilizada a micropipeta Gilson de 2 – 20  $\mu\text{L}$  para transferir o volume adequado de enzima. Para os testes T5 e T6, o conteúdo enzimático foi diluído em tampão fosfato com pH 7,0 e, com auxílio da micropipeta citada, foram adicionados os volumes correspondentes de solução enzimática.

Cada amostra, após adição da enzima, foi homogeneizada com movimentos circulares, aplicados com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A homogeneização foi feita durante um minuto, sendo cessada para a retirada de uma alíquota de cerca de 2,5 mL, que foi transferida com a pipeta de Pasteur para um tubo de ensaio, identificado como Tn-t (sendo Tn a denominação da amostra, de acordo com o planejamento fatorial, e t o tempo em que a alíquota foi retirada). O tubo foi coberto com plástico filme e imediatamente colocado em banho em ebulição a 90°C por 10 minutos, como apresentado pela figura 7, para que a enzima presente fosse desnaturada. Nos intervalos de 15 minutos subsequentes foi aplicado o mesmo procedimento para as amostras. Após finalizado o experimento, as alíquotas desnaturadas foram congeladas em um freezer. (FREITAS, 2007; VALSECHI, 2001)

**Figura 7 – Desnaturação das amostras**



Fonte: Própria autora

### **3.2.4 Preparo dos padrões e realização da curva de calibração**

Para o preparo do branco e dos padrões, foi adicionado um volume de 50  $\mu\text{L}$  de leite desnatado UHT em seis tubos para centrífuga. Depois disso, a um deles foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  da solução de glicose 100 mg/dL contida no kit Glicose PP. Em outros 4 tubos vazios foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de glicose e a quantidade de água correspondente para diluição com fatores 2, 4, 8 e 16. Após homogeneizados, retirou-se de cada um 50  $\mu\text{L}$ , que foram transferidos para os tubos contendo 50  $\mu\text{L}$  de leite. Com isso, obteve-se o branco (contendo apenas o leite) e os padrões com concentrações 100, 25, 50, 12,5 e 6,25 mg/dL. Foi inserido em cada um 5 mL do reagente de cor presente no kit e, após tampar os tubos, foram colocados no banho ultratermostático a 37°C durante 10 minutos. Na figura 8 pode-se observar a coloração rosada das amostras após a retirada do banho. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro SHIMADZU a 505 nm.

**Figura 8 – Amostras com reagente de cor após serem retiradas do banho ultratermostático**



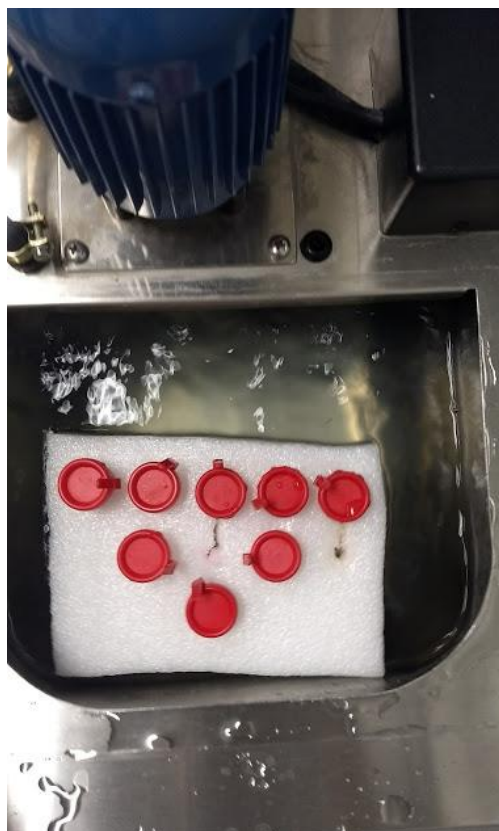
Fonte: Própria autora

### **3.2.5 Quantificação da glicose nas amostras desnaturadas**

O procedimento para quantificar a glicose nas amostras desnaturadas foi realizado com a transferência de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra (algumas diluídas previamente) para um tubo de centrifuga e posterior adição de 5 mL de reagente de cor e incubação a 37°C por 10 minutos no banho ultratermostático, como mostrado na figura 9. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância das amostras a 505 nm no espectrofotômetro Femto. (FREITAS, 2007; CARMINATTI, 2001; FISCHER, 2010).



**Figura 9 – Amostras no banho ultratermostático**



Fonte: Própria autora

### **3.2.6 Tratamento de dados**

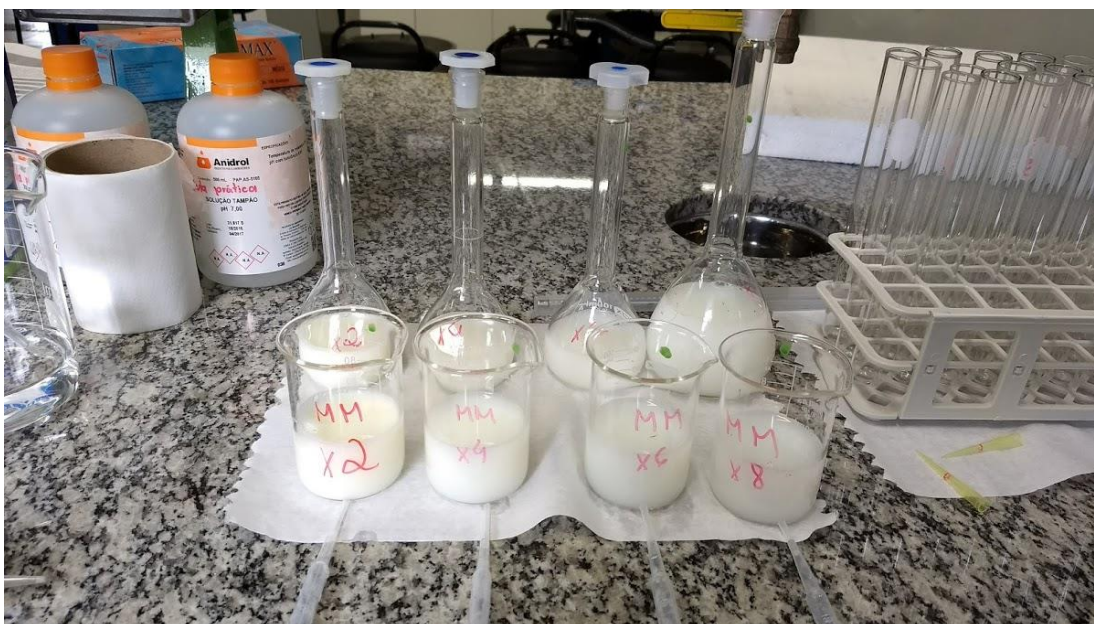
Para calcular as variáveis de resposta definidas no item 3.2.1, empregou-se o método das velocidades iniciais, apresentado no item 2.5. Para cada teste, o  $V_0$  calculado foi dividido pela massa de solução enzimática empregada, obtendo-se a variável de resposta  $U_L$ . Com base nessa variável e nos valores dos fatores, foi realizada a análise fatorial, composta pelo cálculo dos efeitos, pela análise das interações entre os fatores e pela geração do modelo por regressão. (FREITAS, 2007; FISCHER, 2010; SANTOS, 2014; OLIVEIRA, 2015).



### 3.2.7 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten

Os experimentos foram realizados aplicando os valores ótimos obtidos no item 3.2.6 para o leite desnatado UHT com fatores de diluição iguais a 2, 4, 6 e 8. A diluição foi feita em balões volumétricos conforme mostrado na figura 10.

**Figura 10 – Preparo das amostras para execução dos testes de Michaelis-Menten**



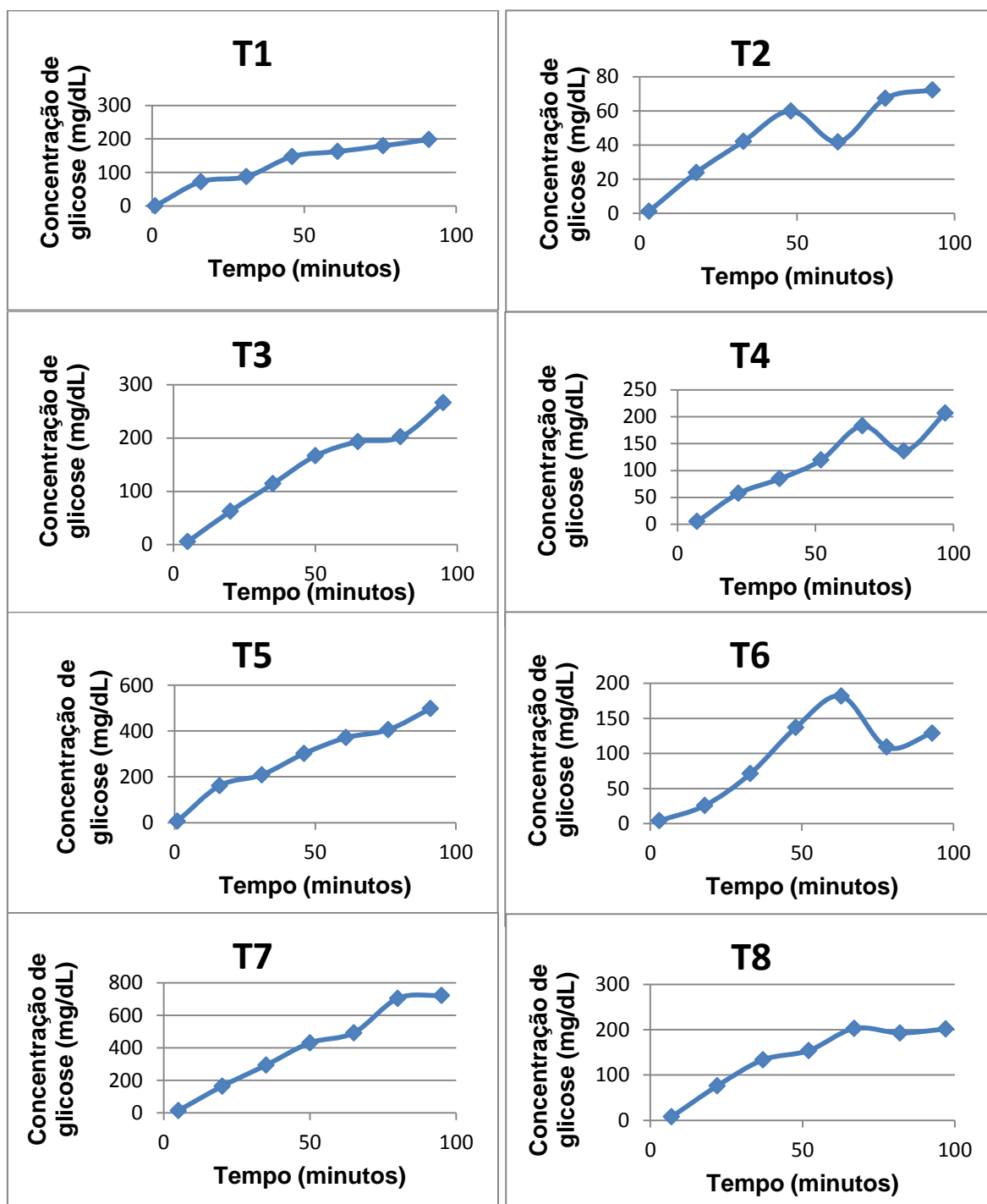
Fonte: Própria autora

O procedimento utilizado para essas amostras foi equivalente ao descrito nos itens 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.5. A diferença refere-se ao método de adição da enzima, no qual, em um balão de 25 mL, foi diluído 1 mL de solução enzimática em tampão fosfato com pH 7,0, sendo posteriormente retirados os volumes com a micropipeta Eppendorf Reserach de 10 – 100  $\mu$ L. Foi realizada uma curva de calibração para cada diluição, de acordo o item 3.2.4, aplicando-se aos padrões o leite diluído com fator de diluição correspondente para cada experimento. Após aplicar o método das velocidades iniciais e construir a curva de velocidade inicial por concentração de substrato, obteve-se os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $\alpha K_m$  por regressão não-linear do tipo Michaelis-Menten no software Minitab 17. (NELSON e COX, 2014; VALSECHI, 2001)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada experimento de T1 a T8, presentes no planejamento fatorial, os gráficos de concentração da glicose gerada na reação enzimática em função do tempo estão mostrados na figura 11.

**Figura 11–Glicose gerada (mg/dL) pelo tempo de reação para os testes de 1 a 8**



Fonte: Própria autora

Observa-se que as curvas de T1 a T8 exibem o formato característico das curvas de concentração de produto pelo tempo, como apresentado por Nelson e Cox (2014). Deve-se ressaltar que alguns dos pontos contidos nas curvas apresentaram concentrações menores que os pontos que os antecedem. Isso pode ter sido causado em virtude do método de diluição utilizado, no qual 200 µL de amostra eram pipetados e a esse volume adicionado o volume de água correspondente para alcançar a diluição desejada. Na ausência de vidrarias com função de diluição (por exemplo, balões volumétricos) por tratar-se de volumes pequenos, foi verificado que o método de diluição aplicado é viável e prático, embora possua imprecisão devido aos erros inerentes às micropipetas utilizadas. Possivelmente a maior fonte de erro, nesse contexto, refere-se à incapacidade de ejeção total do volume contido nas ponteiros das micropipetas, acarretando na redução da concentração da glicose nas amostras, efeito que se manifestou aleatoriamente com e diferentes magnitudes.

Entretanto, pode-se afirmar que o principal agente causador dessa disparidade entre os valores reais e os ideais foi a faixa de leitura das absorbâncias. As diluições realizadas que obtiveram leitura de absorbância com resultados abaixo de 0,100 apresentaram valores de concentração muito baixos com relação ao esperado. Isso foi evidente no T6, cuja curva original conteve todos os pontos abaixo desse valor de absorbância. Com exceção dos últimos dois pontos, refez-se a leitura da absorbância das amostras, reduzindo o fator de diluição, o que ocasionou a elevação das concentrações. Dessa forma, verifica-se que para diluições cujas medidas de absorbância apresentem-se abaixo de 0,100, não é ideal a utilização da curva de calibração aplicada neste estudo (Equação 10), sendo necessária a realização de testes para corrigir uma possível inconsistência dos parâmetros da equação utilizada ou utilizar outro método para essa finalidade.

$$\text{Absorbância} = 0,00816 + 0,00362 \times \text{Concentração de Glicose} \quad (10)$$

#### **4.1 Análise Fatorial**

A tabela 6 apresenta os dados das velocidades iniciais e suas respectivas atividades específicas para os testes de T1 a T8.

**Tabela 6 – Velocidades iniciais e atividades específicas para os testes do planejamento fatorial**

Teste	T (°C)	pH	[E] (U/mL)	V <sub>0</sub> (mg <sub>glicose</sub> /dL.min)	U <sub>L</sub> (mg <sub>glicose</sub> /dL.min.mg <sub>(solução enzimática)</sub> )
T1	30,0	6,9	3,0	2,928	0,978
T2	30,0	7,3	3,0	1,263	0,422
T3	30,0	6,9	9,0	3,282	0,367
T4	30,0	7,3	9,0	2,305	0,257
T5	40,0	6,9	3,0	6,322	2,109
T6	40,0	7,3	3,0	2,765	0,923
T7	40,0	6,9	9,0	8,474	2,827
T8	40,0	7,3	9,0	3,020	0,337

Fonte: própria autora

Ao realizar uma análise comparativa de valores de V<sub>0</sub> para os testes com as mesmas condições de pH e temperatura, observa-se concordância com as informações expostas no item 2.5.3, pois para concentrações de enzima 9,0 U/mL, os valores de V<sub>0</sub> apresentam-se maiores do que para concentrações de 3,0 U/mL.

#### **4.1.1 Modelo da atividade específica U<sub>L</sub> em função dos fatores temperatura, pH e concentração de enzima**

O modelo gerado no software Minitab 17, exposto pela equação 11, apresentou R<sup>2</sup> igual a 1, indicando um ajuste com 100% de eficiência.

$$U_L = 25,95958 - 0,37507 * T - 3,77951 * pH - 17,1436 * [E] + 0,061125 * T * pH \quad (11) \\ + 0,52527 * T * [E] + 2,373532 * pH * [E] - 0,07292 * T * pH * [E]$$

Deve-se ressaltar que o modelo apresenta limitações referentes ao desconhecimento do comportamento da enzima em condições de temperatura, pH e concentração da mesma que estejam entre os limites inferior e superior estudados de cada fator. Dessa forma, não se pode comprovar a linearidade da equação

devido à ausência de dados intermediários, o que limita a eficiência do modelo a sua aplicação nos níveis presentes no planejamento fatorial. Quanto mais afastadas as condições experimentais daquelas apresentadas no planejamento, maior será o erro do modelo.

#### 4.1.2 Efeitos principais e de interações dos fatores do planejamento fatorial

A partir dos dados de  $U_L$  apresentados na tabela 6, foram calculados os efeitos principais e de interação dos fatores, cujos dados encontram-se na tabela 7. O procedimento de cálculo utilizado está apresentado no apêndice A.

**Tabela 7 – Efeitos principais e combinados para os fatores temperatura (T), pH e concentração de enzima (E)**

Fatores	Efeitos
T	1,043
pH	-1,085
E	-0,161
T*pH	-0,753
T*E	0,227
pH*E	-0,214
T*E*pH	-0,438

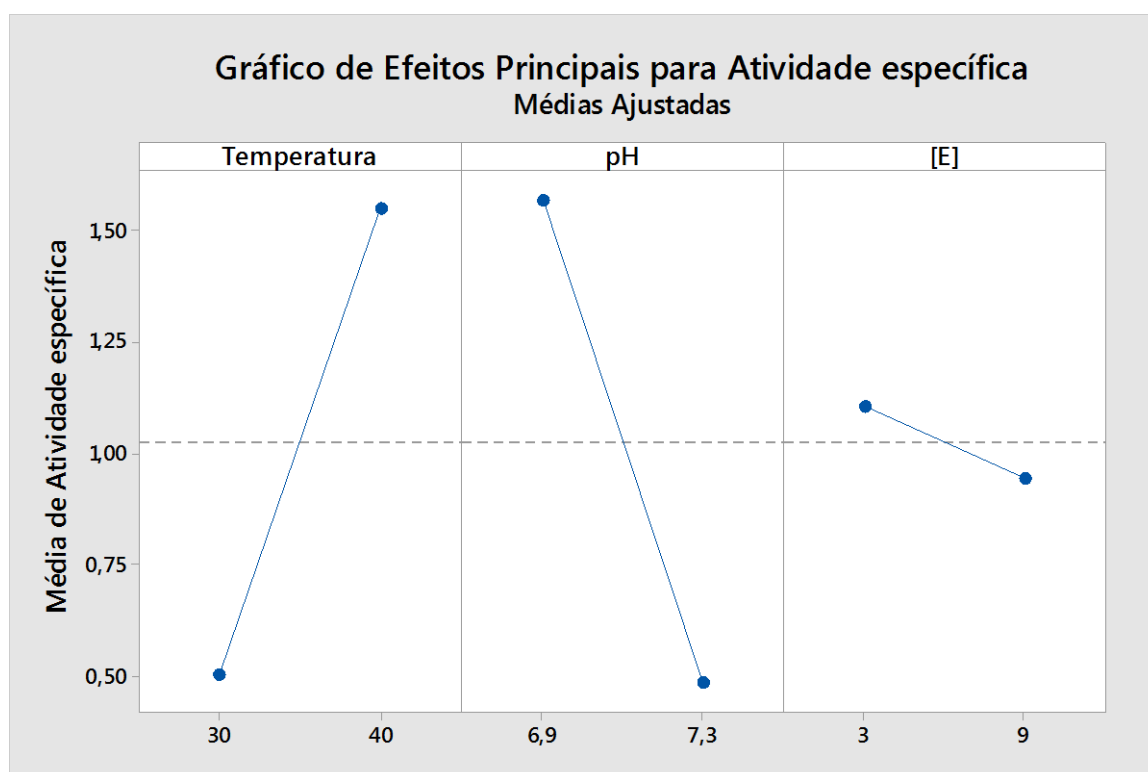
Fonte: própria autora

A interpretação dos efeitos principais diz respeito à variação na variável de resposta quando se passa do nível inferior de um fator para o nível superior deste. (OLIVEIRA, 2015)

Aplicando esse conceito para o planejamento fatorial deste estudo, percebe-se que o aumento da temperatura de 30 para 40°C faz com que haja um aumento de 1,043 em média para a atividade específica  $U_L$ . Essa análise pode ser feita analogamente para o pH e para a concentração de enzima: no primeiro caso há a redução da  $U_L$  em 1,085 ao elevar o pH de 6,9 a 7,3 e, no segundo, há redução da  $U_L$  em 0,161 ao passar de uma concentração de enzima de 3,0 a 9,0 U/mL.

Com base no valor em módulo desses dados, observa-se que os efeitos do pH e da temperatura na variável de resposta  $U_L$  foram mais acentuados do que o efeito da concentração da enzima. Além disso, verifica-se que em média, a atividade específica  $U_L$  foi maior para as condições de temperatura igual a 40°C, pH 6,9 e concentração de enzima 3,0 U/mL. A figura 12 mostra graficamente os efeitos principais dos fatores estudados.

**Figura 12 – Gráfico dos efeitos principais para a atividade específica  $U_L$**

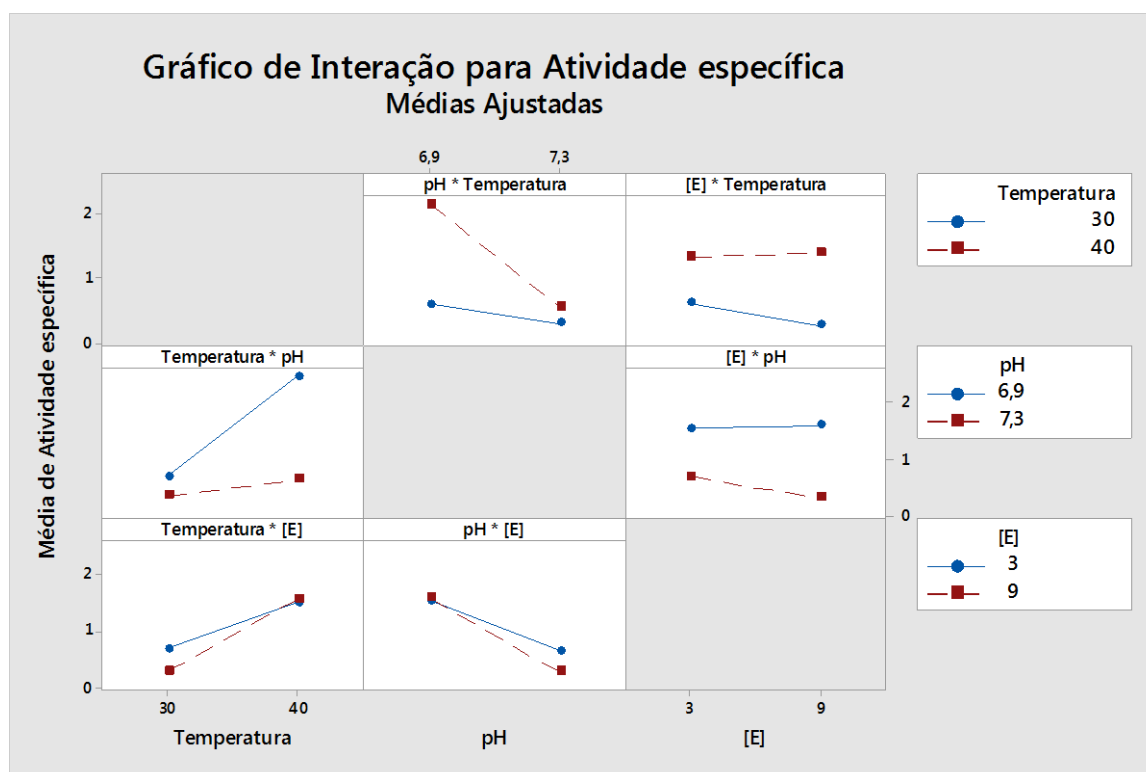


Fonte: própria autora

A análise dos efeitos principais é, entretanto, insuficiente para explicar o comportamento dos fatores na variável de resposta, devido ao fato de que existem interações entre eles. Interações ocorrem quando o efeito de um fator depende do nível das outras variáveis independentes (MALHOTRA, 2012). Isso é verificado, por exemplo, ao examinar o efeito da temperatura, que é maior para condições de pH 6,9 do que para pH 7,3, apresentando valores médios de 1,800 e 0,290 respectivamente. O mesmo pode ser observado para o efeito do pH, o qual para temperaturas de 40°C apresenta valor médio de -1,837 e para 30°C, -0,332.

Na tabela 7 observa-se que, dentre todas as interações, a do pH com a temperatura apresentou maior valor em módulo, indicando sinergismo entre as variáveis, ao contrário das interações da concentração da enzima com o pH e com a temperatura, que apresentaram valores inferiores. Graficamente, a falta de interações é indicada por retas paralelas e o contrário por retas concorrentes. Isso pode ser observado na figura 13, em que os efeitos de interação com a concentração da enzima mostram-se como retas mais próximas ao paralelismo do que as retas do efeito de interação do pH com a temperatura.

**Figura 13 – Gráfico de interação para a atividade específica  $U_L$**



Fonte: própria autora

A partir dos gráficos de interações com a concentração de enzima, presentes na figura 13, verifica-se que as condições de pH 6,9 e temperatura 40°C tiveram um efeito próximo para as concentrações 3,0 U/mL e 9,0 U/mL. Já as condições de 30°C e pH 7,3 tiveram efeito acentuado para a menor concentração.

A figura 13 também expõe os gráficos de interação da temperatura com o pH, nos quais observa-se que as médias da  $U_L$  foram próximas para os parâmetros 30°C e pH 6,9 e as condições de 40°C e pH 7,3. Além disso, para ambos os pHs

estudados, verifica-se maior média da  $U_L$  para a temperatura de 40°C do que para 30 °C e o mesmo é percebido para os níveis da temperatura, nos quais as médias da  $U_L$  são maiores para o pH 6,9 do que para o pH 7,3.

Com isso, pode-se definir que os níveis com maiores médias foram o pH 6,9 e a temperatura de 40°C , sendo a concentração de enzima que maximiza a  $U_L$ , nessas condições, correspondente à de 9,0 U/mL.

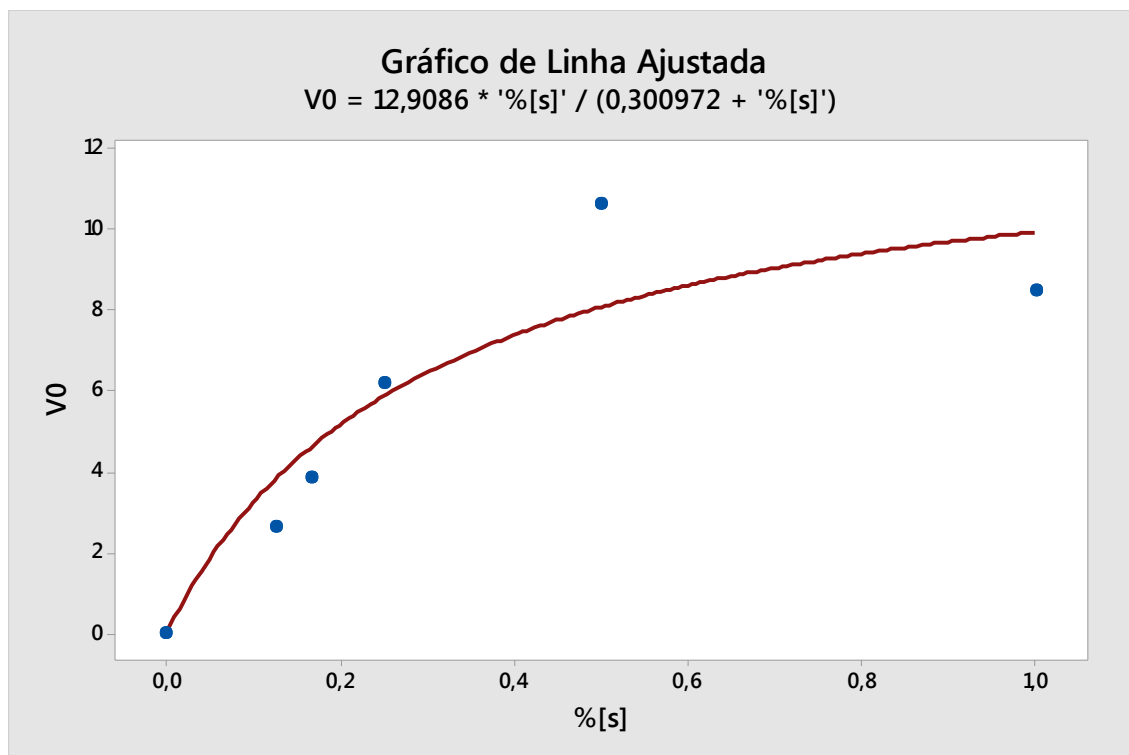
Esses dados estão de acordo com o estudos realizados por Bosso *et al* (2016) e por Rosolen *et al* (2015). No primeiro, foi analisado o grau de hidrólise para a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em leite desnatado e leite UHT nas condições de temperatura igual a 30; 35; 40 e 55°C e pH igual a 5,0; 6,0; 6,5 e 7,0. Foi verificado maior grau de hidrólise em pH 7,0 e temperatura 40°C, para ambos os leites. Já no segundo estudo, foi analisado o grau de hidrólise em leite em pó a 5% m/v de lactose, com concentrações de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* iguais a 3, 6 e 9 U/mL, sendo obtido melhor resultado para a concentração de 9 U/mL

#### **4.1 Modelo de Michaelis-Menten**

Com base nos parâmetros operacionais do experimento em que foi obtido maior valor de  $U_L$  (pH 6,9; 40°C; 9,0 U/mL), foram realizados outros quatro experimentos nas mesmas condições e com diferentes concentrações de substrato. Essas concentrações foram determinadas considerando o leite não diluído como referencial de 100% de concentração de substrato. Dessa forma, os resultados das velocidades iniciais pela porcentagem da concentração de substrato encontram-se no gráfico da figura 14, junto com o gráfico de resíduos correspondente, exposto na figura 15 .

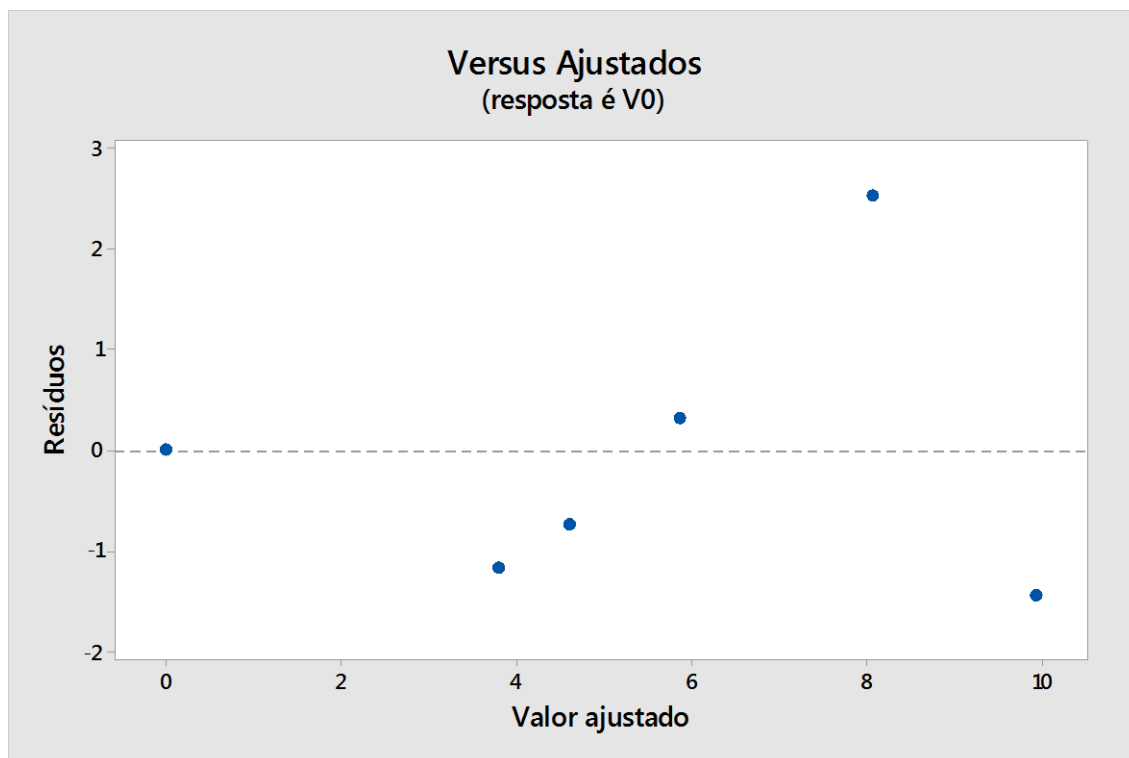


**Figura 14 – Curva de Michaelis-Menten para pH 6,9, temperatura 40°C e concentração de enzima 9,0 U/mL contendo todos os pontos avaliados**



Fonte: própria autora

**Figura 15 – Gráfico de resíduos para o modelo apresentado na figura 14**



Fonte: própria autora

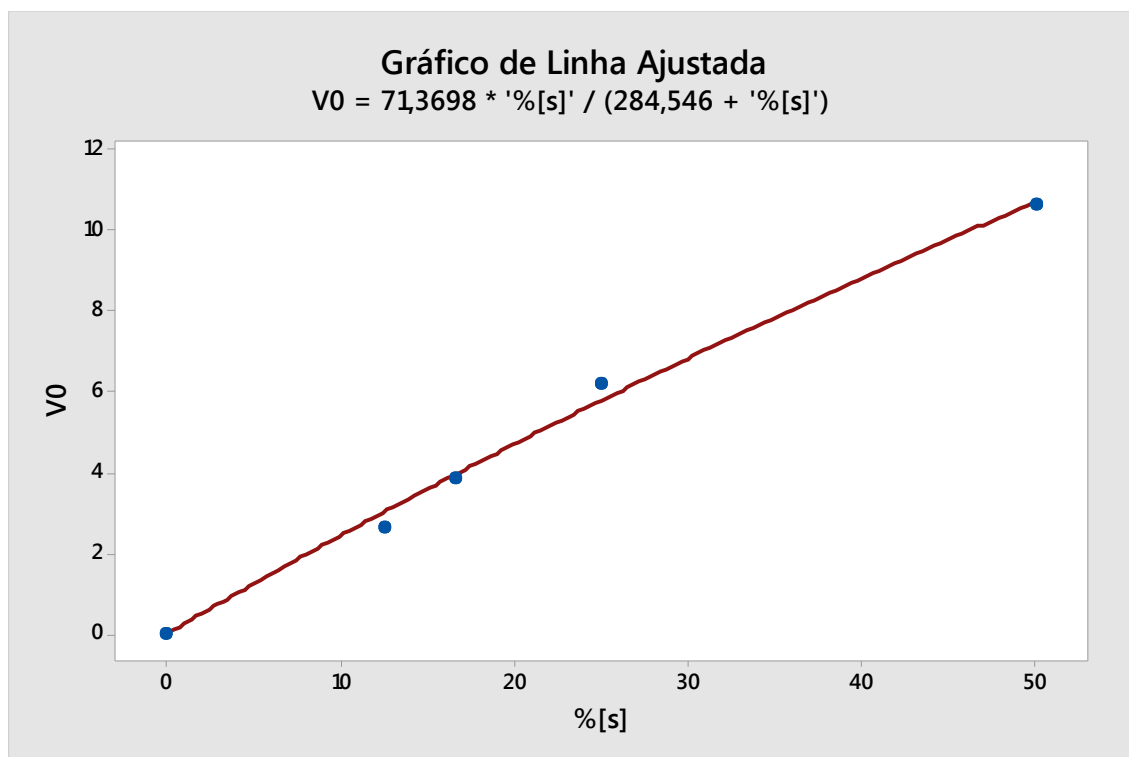
Observa-se que o ajuste do modelo foi ruim, o que é enfatizado pelo gráfico de resíduos na figura 15, no qual verifica-se divergências de até 2,5 em módulo do modelo ajustado com relação aos valores reais.

Além disso, o ponto de 100% de concentração de substrato apresentou queda na velocidade inicial, fato que contraria o modelo de Michaelis-Menten. As causas da redução da velocidade inicial, comparada à do ponto com 50% de concentração de substrato, podem decorrer da execução da metodologia e das mudanças que tiveram que ser efetivadas a longo dela: para os testes de T1 a T4 junto com T7 e T8, utilizou-se a micropipeta Gilson de 2 – 20  $\mu\text{L}$  para transferir os volumes de enzima, correspondentes a 2,6 e 7,7  $\mu\text{L}$  para as concentrações de 3,0 e 9,0 U/ml, respectivamente. Foi verificado que, para o volume de 2,6  $\mu\text{L}$ , havia dificuldade do equipamento em ejetar o conteúdo, portanto, para os testes T5 e T6, preparou-se 13  $\mu\text{L}$  de solução enzimática em 87  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, retirando-se 20  $\mu\text{L}$  para acrescentar nas amostras. Entretanto, posteriores utilizações da micropipeta empregada revelaram que esta apresentava possível descalibração, pois após fixar um volume de referência, o equipamento retirava-o em níveis visualmente diferentes e que reduziam após alguns segundos.

Além disso, a solução enzimática, por ser viscosa, apresentou maior resistência à ejeção pela micropipeta, permanecendo fixada às paredes internas das ponteiros na forma de uma camada delgada. Dessa forma, a partir dessas premissas, alterou-se a metodologia a ser aplicada aos experimentos de Michaelis-Menten para a diluição de 1 mL de enzima em balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado por tampão fosfato em pH 7,0. Logo, trabalhar-se-ia com volumes maiores e seria reduzida a viscosidade da solução enzimática, causando aumento da facilidade de ejeção do conteúdo pela micropipeta e redução do erro devido à diminuição da razão do volume remanescente na ponteira com relação ao volume total. Nesse caso, o volume aplicado foi de 193  $\mu\text{L}$  e o procedimento foi realizado com a micropipeta Eppendorf Reserach.

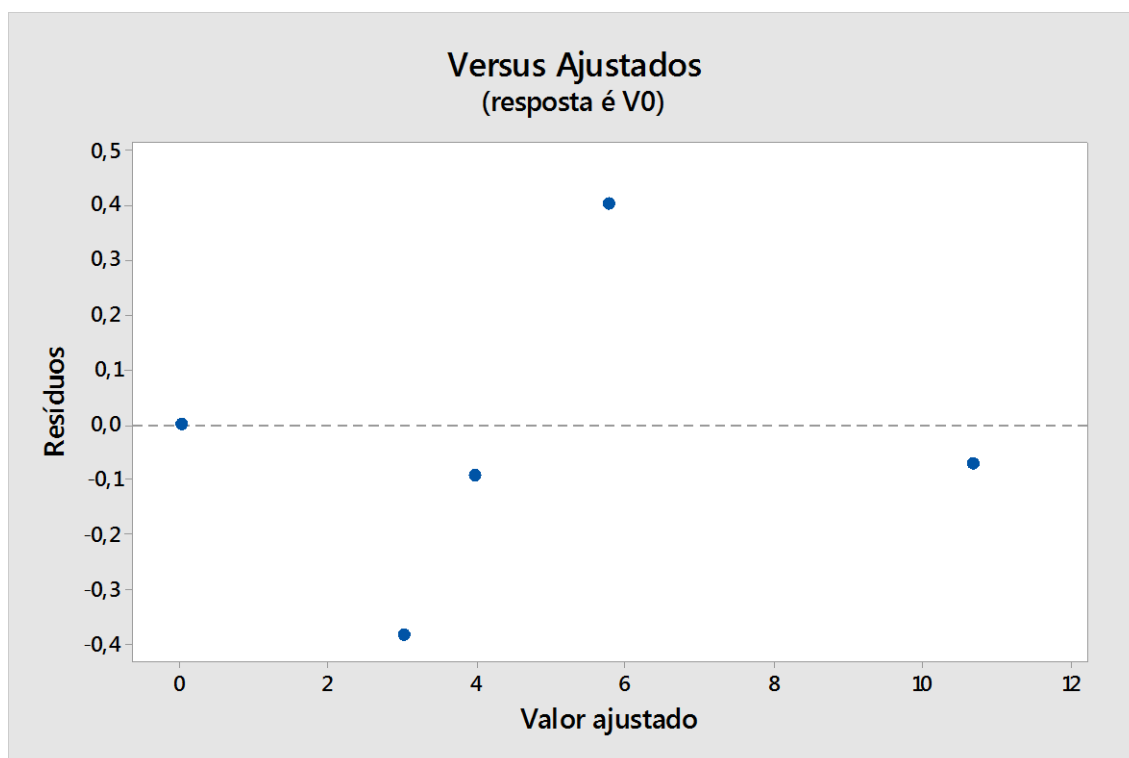
A partir das variações evidenciadas e da análise das possíveis hipóteses de interferência, decidiu-se eliminar o ponto com concentração de substrato a 100% e refazer a curva de Michaelis-Menten, que apresenta-se na figura 16, seguida pelos respectivos resíduos, mostrados na figura 17.

**Figura 16 – Curva de Michaelis-Menten para as amostras diluídas**



Fonte: própria autora

**Figura 17 – Gráfico de resíduos para o modelo apresentado na figura 16**



Fonte: própria autora

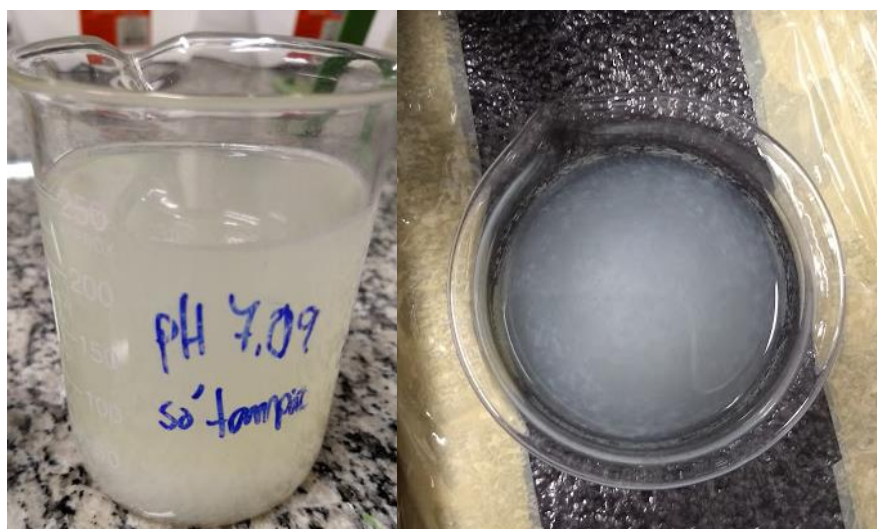
Dessa vez, percebe-se o ajuste mais eficiente do modelo aos dados, fato que é corroborado pela redução dos valores residuais para um máximo de 0,4 em módulo.

O modelo fornece a equação de Michaelis-Menten como  $V_0 = 71,3698 \cdot \%[S] / (284,546 + \%[S])$ . A partir dela, define-se  $V_{\text{máx}}$  como 71,3698 mg/dL.min, o que corresponde a 3,962 mM/min, e  $\alpha K_m$  como 284,546  $\%[S]$ . Considerando o teor de 4,5 a 5,1 g/100g de lactose no leite de vaca, como exposto na tabela 2, e uma densidade de 1,026 Kg/L a 38,9°C para o leite desnatado (JONES, 2002), deduz-se que o valor de  $\alpha K_m$  é cerca de 13137 a 14890 mg/dL, que correspondem aos valores de 384 a 435 mM.

Comparando os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $\alpha K_m$  com os definidos por Bezerra (2012) para a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em solução de lactose em pH 7,0 e 37°C, percebe-se aproximação com o  $V_{\text{máx}}$  calculado pela autora, correspondente a 3,13 mM/min, porém discrepância em relação ao  $\alpha K_m$  obtido por ela, equivalente a 45,57 mM. Um valor maior de  $\alpha K_m$  indica que a enzima possui menor afinidade pelo substrato, o que pode ter sido causado pela interferência de outros componentes contidos no leite, presença de inibidor (galactose) e devido ao fato de o ajuste de pH ter sido realizado com NaOH(aq) e não com um tampão.

O uso do tampão fosfato proposto por Gomori (2004) para o ajuste do pH do leite foi descartado para ser aplicado à metodologia. Isso ocorreu devido ao gasto de volumes altos para alcançar o pH desejado (provavelmente devido à interferência do tampão natural no leite) e também por ocorrer a precipitação das proteínas contidas nas amostras, como mostra a figura 18. O mesmo resultado foi observado para o uso combinado do tampão com o NaOH(aq). Dessa forma, foi necessário optar pelo uso da solução de NaOH para o ajuste do pH, o que pode ter contribuído para a redução da atividade da enzima. (SILVA, 1997)

**Figura 18 – Interferência do tampão fosfato utilizado no ajuste de pH do leite**



Fonte: própria autora

## 5. CONCLUSÃO

No estudo realizado objetivou-se modelar a cinética da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em leite desnatado UHT. Para isso, foi executado um planejamento fatorial contendo os fatores temperatura (30 e 40°C), pH (6,9 e 7,3) e concentração da enzima (3,0 e 9,0 U/mL). A variável de resposta aplicada foi a atividade específica  $U_L$  ( $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{dL} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}_{(\text{solução enzimática})}$ ). Com base nos resultados da análise fatorial, conclui-se que:

- A modelagem do planejamento fatorial apresentou uma equação com coeficiente correlacional de 100%, indicando o completo ajuste aos dados;
- Os efeitos da mudança do pH e da temperatura do nível inferior para o superior foram os que causaram maior impacto nos resultados. Respectivamente, os valores dos efeitos foram -1,085 e 1,043;
- A interação da temperatura com o pH foi, comparativamente às outras interações entre os fatores, a que teve maior valor em módulo, indicando a significância desse efeito;
- Em média, os resultados da  $U_L$  foram maiores para concentrações de enzima iguais a 3 U/mL. Entretanto, o valor máximo da atividade específica foi verificado para as condições 9 U/mL, 40°C e pH 6,9.

Os parâmetros operacionais em que foi obtida a maximização da  $U_L$  foram aplicados na realização dos experimentos da cinética de Michaelis-Menten. A partir da diluição das amostras de leite e com base na execução de uma curva de calibração para cada uma delas, foi obtida a curva de velocidade inicial pela concentração de substrato. As conclusões referentes a essa etapa são:

- O primeiro ajuste apresentou resíduos com valores altos e, após a retirada do ponto de 100% de concentração de substrato, obteve-se uma curva com melhor ajuste e valores de resíduos inferiores;
- O ponto de 100%[S] apresentou valor de  $V_0$  inferior ao de 50%[S] provavelmente devido à alteração da metodologia aplicada;
- Os valor obtido de  $V_{\text{max}}$  foi de 3,962 mM/min e o valor de  $\alpha K_m$  foi 284,546%[S];

- Com base em dados da literatura, predisse-se o  $\alpha K_m$  na faixa de 384 a 435 mM, valores que ultrapassam aqueles encontrados por outros autores. Possíveis causas para essa discrepância seriam: a diferença dos substratos utilizados; interferência dos componentes do leite e do inibidor galactose na atividade da enzima; redução da atividade enzimática devido ao ajuste de pH ter sido realizado com NaOH(aq) e não por tampão.

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos que serão executados sobre o tema estudado:

- Realização de um planejamento composto central, de forma a considerar pontos intermediários a serem inseridos no modelo gerado;
- Adicionar réplicas ao planejamento para que possa ser analisada a variância dos dados;
- Aplicar a todos os testes a enzima diluída no tampão, de forma a reduzir o erro causado pela ejeção inadequada de volumes pequenos, além da interferência da viscosidade da solução enzimática nesse processo;
- Realizar diluições das amostras de forma que as leituras das absorbâncias das mesmas sejam próximas;
- Adicionar mais pontos à curva de Michaelis-Menten;
- Utilizar um tampão em vez do NaOH(aq) para ajuste do pH e comparar os efeitos na atividade específica  $U_L$ ;
- Avaliar o efeito do inibidor galactose no modelo de Michaelis-Menten;
- Quantificar o teor de lactose no leite desnatado UHT;
- Estudar se e quais componentes do leite interferem na atividade da  $\beta$ -galactosidase.



## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada nº 53, de 07 de Outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Diário oficial da união**, n. 194, Brasília-DF, 08 de out. de 2013. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn.%2B53\\_2014\\_Lista%2Bde%2Benzimas.pdf/680b654b-2bab-4571-a498-d77dd1cec8c4](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn.%2B53_2014_Lista%2Bde%2Benzimas.pdf/680b654b-2bab-4571-a498-d77dd1cec8c4)> Acesso em: 16 out. 2016

ACHARYA, Tankeshwar. **ONPG Test (for  $\beta$ -galactosidase): Principle, procedure and results**. Disponível em: <<https://microbeonline.com/onpg-test-%CE%B2-galactosidase-principle-procedure-results/>> Acesso em: 28. Out. 2016

BEZERRA, José Raniere Mazile Vidal. Tecnologia de fabricação de derivados do leite. **Boletim técnico do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste**. Guarapuava, 56 p., 2008. Disponível em: <<http://www2.unicentro.br/wp-content/blogs.dir/15/files/2012/11/leite.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

BEZERRA, Camilla Salviano. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em: <[http://repositorio.ufc.br/ri/bitstream/riufc/10788/1/2012\\_dis\\_csbezerra.pdf](http://repositorio.ufc.br/ri/bitstream/riufc/10788/1/2012_dis_csbezerra.pdf)> Acesso em: 20 mai. 2017

BEZERRA, José Raniere Mazile Vidal. **Introdução à tecnologia de Leite e derivados**. Guarapuava: Editora Unicentro, 2010. Disponível em: <<http://www2.unicentro.br/editora/files/2012/11/raniere.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

BIANCONI, M.L. **Efeito da Concentração de Enzima na Atividade Enzimática**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <[http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/concn\\_enz.htm](http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/concn_enz.htm)> Acesso em: 8 out. 2016

BOMMARIUS, Andreas S.; RIEBEL, Betina R. Characterization of a (Bio-)catalyst. In: BOMMARIUS, Andreas S.; RIEBEL, Betina R. **Biocatalysis: Fundamentals and Applications**. 1 ed. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2004. Cap 2, p.19-39.

BORZANI, Walter. Cinética de reações enzimáticas. In: BORZANI, Walter *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 5ª reimpressão, 2012. V. 1, Cap. 7, p. 197-216.

BOSSO, Alessandra; MORIOKA, Luiz Rodrigo Ito; SANTOS, Leandro Freire dos *et al.* Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial  $\beta$ -galactosidase in

UHT and skimmed milk. **Food Science and Technology (Campinas)**, v.36 n.1, 2016.

BRASIL, Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51, de 18 de setembro de 2002, que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Disponível em:  
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 21 out. 2016

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011, que altera a Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Disponível em:  
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 21 out. 2016

CARMINATTI, Claudimir Antonio. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. Disponível em:  
<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/81434/206490.pdf?sequence>> Acesso em: 26 set. 2016

FARRELL, Shawn O.; Taylor, Lynn E. Enzyme Purification. In: FARRELL, Shawn O.; Taylor, Lynn E. **Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach**. 2 ed. United States of America: Thomson Brooks/Cole, 2005. Cap 4, p. 89-109.

FISCHER, Janaína. **Hidrólise de Lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em:  
<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15150/1/Diss%20Janaina.pdf>> Acesso em: 30 ago. 2016

FOGLER, H. Scott. Mecanismos e Caminhos de Reações, Biorreações e Biorreatores. In: FOGLER, H. Scott. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. Cap. 7, p. 303-376

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma, 2013. Disponível em:  
<<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

FREITAS, Fernanda Ferreira. **Otimização do processo de imobilização de Beta - galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído**. 2007. 219 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15100>> Acesso em: 30 ago. 2016

FREITAS, Maria de Fátima Matos de. **Produção de  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em Soro de Leite e Imobilização em Quitosana**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4795/1/2013\\_dis\\_mfmdefreitas.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4795/1/2013_dis_mfmdefreitas.pdf)> Acesso em: 26 set. 2016

GENSCRIPT. **coupled-enzyme assay**. Disponível em: <<http://www.genscript.com/molecular-biology-glossary/649/coupled-enzyme-assay>> Acesso em: 27 Out. 2016

GOMORI, G. **Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies**. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=5726eb24dc332d1e7743a98a&assetKey=AS%3A357174124531720%401462168356006>> Acesso em: 23 out. 2016

GRAVE, Eduardo. **Análise da eficiência do uso de Bactofugação na remoção de micro-organismos em amostras de leite**. 2011. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Química Industrial, Univates, Lajeado, 2011. Disponível em: <<https://www.univates.br/bdu/bitstream/10737/269/1/EduardoGrave.pdf>> Acesso em: 23 out. 2016

HATZINIKOLAOU, Dimitris G.; KATSIFAS, Efstathios; KARAGOUNI, Amalia D. *et al.* Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 161-172, 2005. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/222680029\\_Modeling\\_of\\_the\\_simultaneous\\_hydrolysis-ultrafiltration\\_of\\_whey\\_permeate\\_by\\_a\\_thermostable\\_b-galactosidase\\_from\\_AspERGILLUS\\_niger](https://www.researchgate.net/publication/222680029_Modeling_of_the_simultaneous_hydrolysis-ultrafiltration_of_whey_permeate_by_a_thermostable_b-galactosidase_from_AspERGILLUS_niger)> Acesso em: 24 out. 2016

HELD, Paul. **Kinetic Analysis of  $\beta$ -Galactosidase Activity using the PowerWave™ HT and Gen5™ Data Analysis Software: Basic enzyme kinetic determination**. Disponível em: <[http://www.biotek.com/resources/docs/B-Gal\\_Michaelis-Menten\\_App\\_Note.pdf](http://www.biotek.com/resources/docs/B-Gal_Michaelis-Menten_App_Note.pdf)> Acesso em: 28 out. 2016

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G. *et. al.* A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002. Disponível em: <<http://hera.ugr.es/doi/15023722.pdf>> Acesso em: 24 out. 2016

JONES, Alicia Noelle. **Density of milk**. Disponível em: <<http://hypertextbook.com/facts/2002/AliciaNoelleJones.shtml>> Acesso em: 20 mai. 2017

LEISTER, Tatjana. Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using chitin-binding domain and biochemical characterization of immobilized enzyme for lactose hydrolysis. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado) - Food

Sciences and Technology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 2014.

LIBRETEXTS. **Enzyme Assays**. Disponível em:<  
[http://chem.libretexts.org/Core/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry/Kinetics/Catalysis\\_and\\_Enzymes/Enzymes/Enzyme\\_Assays#Contributors](http://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Catalysis_and_Enzymes/Enzymes/Enzyme_Assays#Contributors)> Acesso em: 27 Out. 2016

LEITE BRASIL, **19º Ranking Maiores Empresas de Laticínios do Brasil – 2015**. Disponível em:  
<<http://www.leitebrasil.org.br/maiores%20laticinios%202015%20final.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

LONGO, Giovana. **Influência da adição de lactase na Produção de iogurtes**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em:  
<<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/4949/Disserta%E7%E3o%20GIOVANA%20LONGO%20-%20Tec%20Alimentos%20-%202006.pdf;jsessionid=65807B36110226D2B0D7C23663EB0108?sequence=1>> Acesso em: 16 out. 2016

MALHOTRA, Naresh K. **Pesquisa de Marketing - Uma Orientação Aplicada**. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. Cap. 16, p. 416.

MATIOLI, Graciette; MORAES, Flávio Faria de; Zanin, Gisela Maria. Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2003. Disponível em:  
<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/2244/1465>> Acesso em: 16 out. 2016

MÜLLER, José Miguel. **Centrifugação**. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento De Engenharia Química e de Engenharia De Alimentos, EQA 5313, Turma 645, Operações Unitárias de Quantidade de Movimento. 2012. Disponível em:  
<[https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/772387/mod\\_resource/content/0/OPERACOES/Centrifugacao.pdf](https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/772387/mod_resource/content/0/OPERACOES/Centrifugacao.pdf)> Acesso em: 23 out. 2016

NELSON, David L.; COX, Michael M. Enzimas. In: NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto alegre: Artmed, 2014. Cap. 6, p. 189-241.

OLIVEIRA, Anselmo E. de. **Full Factorial Design**. Disponível em:  
<<https://anselmo.quimica.ufg.br/p/11868-planejamento-e-otimizacao-de-experimentos>> Acesso em: 10 mai. 2017

OLIVEIRA, Renata Cabrera de; BANDO, Érika; JUNIOR, Miguel Machinski. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n.1, p. 59-62, 2007.

OLIVEIRA, Vanísia Cordeiro Dias. **Alergia à proteína do leite de vaca e intolerância à lactose: abordagem nutricional e percepções dos profissionais da área de saúde**. 2013. 104 f. Dissertação (mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/mestradoleite/files/2013/05/DISSERTA%C3%87%C3%83O-FINAL-PDF.pdf>> Acesso em: 16 out. 2016

ROSOLEN, Michele Dutra; GENNARI, Adriano; VOLPATO, Giandra *et al.* Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial  $\beta$ -Galactosidases. **Enzyme Research**, v. 2015, Article ID 806240, 7 p., 2015. Disponível em : <<https://www.hindawi.com/journals/er/2015/806240/>> Acesso em: 23 out. 2016

SANTOS, Renata Torres dos Santos e. Otimização do processo de hidrólise de leite utilizando enzimas de origem microbiana. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., 2014, Feira de Santana. **Resumos...** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2014, 4p. Disponível em: <<http://www.xviiisemic.esy.es/resumos/III/57372.pdf>> Acesso em: 23 out. 2016

SILVA, Paulo Henrique Fonseca. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Revista Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3-5, nov. 1997. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/quimsoc.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Novo perfil do consumidor abre espaço para orgânicos e alimentos alternativos**. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/novo-perfil-do-consumidor-abre-espaco-para-organicos-e-alimentos-alternativos/>> Acesso em: 25 out. 2016

TORTORA, Gerard J.; FUNKE Berdell R.; CASE Christine L. Controle do Crescimento Microbiano. In: TORTORA, Gerard J.; FUNKE Berdell R.; CASE Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 7, p. 183-209

VALSECHI, Octávio Antônio. Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal: **O Leite e seus Derivados**. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras, 2001. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf>> Acesso em: 17 out. 2016

VENETURINI, Katiani Silva ; SARCINELLI Miryelle Freire; SILVA, Luís César da. Características do Leite. **Boletim Técnico**, PIE-UFES, n. 01007, Ed. 26 ago. 2007. Disponível em: <[http://www.agais.com/telomc/b01007\\_caracteristicas\\_leite.pdf](http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf)> Acesso em: 17 out. 2016

ZANCAN, Natália Andrade. **Composição e quantificação de ácidos graxos de leite UHT integral, desnatado, semidesnatado e em pó integral comercializados em supermercados da cidade de Campinas/SP**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000842516&fd=y>> Acesso em: 22 out. 2016

**Apêndice A – Cálculo dos efeitos principais e combinados para o planejamento fatorial**

Teste	T	pH	E	U <sub>L</sub>
T1	30 ( - )	6,9 ( - )	3 ( - )	0,976
T2	30 ( - )	7,3 ( + )	3 ( - )	0,421
T3	30 ( - )	6,9 ( - )	9 ( + )	0,365
T4	30 ( - )	7,3 ( + )	9 ( + )	0,256
T5	40 ( + )	6,9 ( - )	3 ( - )	2,107
T6	40 ( + )	7,3 ( + )	3 ( - )	0,922
T7	40 ( + )	6,9 ( - )	9 ( + )	2,825
T8	40 ( + )	7,3 ( + )	9 ( + )	0,336

- Efeito da temperatura:

pH	E	Diferença = U <sub>L 40</sub> – U <sub>L 30</sub>
6,9	3	T5 – T1 = 2,107 – 0,976 = 1,131
7,3	3	T6 – T2 = 0,922 – 0,421 = 0,501
6,9	9	T7 – T3 = 2,825 – 0,365 = 2,460
7,3	9	T8 – T4 = 0,336 – 0,256 = 0,079

Efeito = média dos valores de diferença = (1,131+0,501+2,460+0,079)/4 = 1,043

- Efeito do pH:

T	E	Diferença = U <sub>L 7,3</sub> – U <sub>L 6,9</sub>
30	3	T2 – T1 = 0,421 – 0,976 = - 0,555
30	9	T4 – T3 = 0,256 – 0,365 = - 0,109
40	3	T6 – T5 = 0,922 – 2,107 = - 1,186
40	9	T8 – T7 = 0,336 – 2,825 = - 2,489

Efeito = ( -0,555+( -0,109)+( -1,186)+ ( -2,489) )/ 4 = - 1,085

- Efeito da concentração de enzima:

T	pH	Diferença = $U_{L\ 9} - U_{L\ 3}$
30	6,9	$T3 - T2 = 0,365 - 0,976 = - 0,611$
30	7,3	$T4 - T2 = 0,256 - 0,421 = - 0,165$
40	6,9	$T7 - T5 = 2,825 - 2,107 = 0,717$
40	7,3	$T8 - T6 = 0,336 - 0,922 = - 0,586$

$$\text{Efeito} = (- 0,611 + (- 0,165) + (0,717) + (- 0,586)) / 4 = - 0,1612$$

- Efeito da interação entre temperatura e pH:

pH	E	Diferença = $U_{L\ 40} - U_{L\ 30}$	Média
6,9	3	$T5 - T1 = 2,107 - 0,976 = 1,131$	1,800
6,9	9	$T7 - T3 = 2,825 - 0,365 = 2,460$	
7,3	3	$T6 - T2 = 0,922 - 0,421 = 0,501$	0,290
7,3	9	$T8 - T4 = 0,336 - 0,256 = 0,079$	

$$\text{Efeito} = (0,290 - 1,800) / 2 = - 0,752$$

- Efeito da interação entre temperatura e concentração da enzima:

pH	E	Diferença = $U_{L\ 40} - U_{L\ 30}$	Média
6,9	3	$T5 - T1 = 2,107 - 0,976 = 1,131$	0,816
7,3	3	$T6 - T2 = 0,922 - 0,421 = 0,501$	
6,9	9	$T7 - T3 = 2,825 - 0,365 = 2,460$	1,270
7,3	9	$T8 - T4 = 0,336 - 0,256 = 0,079$	

$$\text{Efeito} = (1,270 - 0,816) / 2 = - 0,227$$

- Efeito da interação entre pH e concentração da enzima:

T	E	Diferença = $U_{L\ 7,3} - U_{L\ 6,9}$	Média
30	3	$T2 - T1 = 0,421 - 0,976 = - 0,555$	-0,870
40	3	$T6 - T5 = 0,922 - 2,107 = - 1,186$	
30	9	$T4 - T3 = 0,256 - 0,365 = - 0,109$	-1,299
40	9	$T8 - T7 = 0,336 - 2,825 = - 2,489$	

$$\text{Efeito} = (- 1,299 - (- 0,870)) / 2 = - 0,214$$

- Efeito da interação entre temperatura, pH e concentração da enzima:

Teste	T	pH	E	U <sub>L</sub>	Multiplicação	Diferença = U <sub>L</sub> + – U <sub>L</sub> -
T1	30 ( - )	6,9 ( - )	3 ( - )	0,976	- - - = -	T8 – T1 = 0,336 – 0,976 = - 0,640
T8	40 ( + )	7,3 ( + )	9 ( + )	0,336	+ + + = +	
T4	30 ( - )	7,3 ( + )	9 ( + )	0,256	- + + = -	T5 – T4 = 2,107 – 0,256 = 1,851
T5	40 ( + )	6,9 ( - )	3 ( - )	2,107	+ - - = +	
T6	40 ( + )	7,3 ( + )	3 ( - )	0,922	+ + - = -	T3 – T6 = 0,365 – 0,922 = - 0,557
T3	30 ( - )	6,9 ( - )	9 ( + )	0,365	- - + = +	
T7	40 ( + )	6,9 ( - )	9 ( + )	2,825	+ - + = -	T2 – T7 = 0,421 – 2,825 = - 2,404
T2	30 ( - )	7,3 ( + )	3 ( - )	0,421	- + - = +	

$$\text{Efeito} = ( -0,640 + 1,851 + ( -0,557) + ( -2,404) ) / 4 = - 0,438$$