

**Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima beta-galactosidase****Determination of kinetic parameters of beta-galactosidase enzyme**

DOI:10.34117/bjdv6n5-316

Recebimento dos originais: 19/04/2020

Aceitação para publicação: 16/05/2020

**Karla Donato Gomes**

Bacharela em Engenharia de Alimentos pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos

Instituição: Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos

Endereço: Avenida Professor Roberto Frade Monte, n° 389 – Aeroporto, Barretos-SP, Brasil.

E-mail: donatogomeskarla@gmail.com

**Marcos Alexandre Polizelli**

Doutor em Biofísica Molecular pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Instituição: Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos

Endereço: Avenida Professor Roberto Frade Monte, n° 389 – Aeroporto, Barretos-SP, Brasil.

E-mail: mapolizelli@yahoo.com.br

**RESUMO**

A lactose é o açúcar presente no leite e seus derivados. A responsável por hidrolisar este substrato é a enzima  $\beta$ -galactosidase, formando glicose e galactose. Através dessa enzima são produzidos diversos produtos como, iogurtes e leites 0% lactose, galactoligosacarídeos e xarope de glicose-galactose. A obtenção experimental dos parâmetros cinéticos da  $\beta$ -galactosidase auxilia na otimização do seu uso na indústria. Com isto, o objetivo deste trabalho é determinar os parâmetros cinéticos da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, em função do pH e da temperatura. Os testes foram realizados em pH 5,8, 6,2 e 6,6 nas temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C em concentrações de lactose de 0,02 a 0,1g/L e volume de enzima 10 $\mu$ L, sendo os dois últimos permanecendo constantes. Os resultados indicam que a maior atividade foi conseguida em pH 6,2, temperaturas de 32, 34 e 36°C e concentração de substrato 0,1g/L, nestas condições a enzima hidrolisou 95% da lactose. Foi ajustado o modelo de Michaelis-Menten e obteve-se os valores da constante de Michaelis,  $K_m$ , e velocidade máxima,  $V_{m\acute{a}x}$ . Com estes ajustes foram obtidos,  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ , em pH 6,2 e temperaturas de 32, 34 e 36°C que são 0,0750g/L.h, 0,0822g/L.h e 0,0786g/L.h e 0,0177g/L, 0,0165g/L e 0,0160g/L, respectivamente, com  $R^2$  de 0,920 e 0,940. Os resultados permitem concluir que a temperatura e o pH interferem na atividade da enzima. As temperaturas de 32 a 36°C em pH 6,2, as condições onde há maior efetividade da enzima, com maiores valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e menores valores de  $K_m$ .

**Palavras-chave:** beta-galactosidase, cinética enzimática, hidrólise, pH, temperatura.

**ABSTRACT**

Lactose is the sugar present in milk and its derivatives. The responsible for hydrolyzing this substrate is the  $\beta$ -galactosidase enzyme, forming glucose and galactose. Through this enzyme, various products are produced, such as yoghurt and 0% lactose milk, galactoligosaccharides and glucose-galactose syrup. The experimental obtaining of the kinetic parameters of  $\beta$ -galactosidase helps to optimize its use in industry. Thus, the objective of this work is to determine the kinetic parameters of the enzyme  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, as a function of pH and

temperature. The tests were performed at pH 5.8, 6.2 and 6.6 at temperatures of 30, 32, 34, 36, 38 and 40 ° C in lactose concentrations from 0.02 to 0.1 g / L and volume of enzyme 10 $\mu$ L, the last two remaining constant. The results indicate that the greatest activity was achieved at pH 6.2, temperatures of 32, 34 and 36 ° C and substrate concentration 0.1 g / L, in these conditions the enzyme hydrolyzed 95% of the lactose. The Michaelis-Menten model was adjusted and the values of the Michaelis constant,  $K_m$ , and maximum speed,  $V_{max}$ , were obtained. With these adjustments,  $V_{max}$  and  $K_m$  were obtained at pH 6.2 and temperatures of 32, 34 and 36 ° C which are 0.0750g / Lh, 0.0822g / Lh and 0.0786g / Lh and 0.0177g / L, 0.0165g / L and 0.0160g / L, respectively, with  $R^2$  of 0.920 and 0.940. The results allow us to conclude that temperature and pH interfere with the enzyme's activity. Temperatures from 32 to 36 ° C at pH 6.2, the conditions where there is greater effectiveness of the enzyme, with higher values of  $V_{max}$  and lower values of  $K_m$ .

**Keywords:** beta-galactosidase, enzymatic kinetics, hydrolysis, pH, temperature.

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores eficientes, não só aumentando a velocidade de conversão de substrato em produto, mas também reconhecendo uma estrutura química específica na presença de estruturas semelhantes, para produzir um produto específico (DEVLIN; MICHELACCI, 2011).

Como outros catalisadores, a enzima se mostra inalterada depois que a reação ocorreu. Assim, apenas quantidades muito pequenas dela são necessárias. A sua especificidade é possível graças à complexa conformação tridimensional da molécula enzimática. Cada enzima tem uma fenda especial na qual uma parte ou toda a molécula do reagente pode se adaptar (MOTTA, 2011).

A molécula do reagente que é alterada pela reação química catalisada pela enzima é chamada substrato. A região especial da superfície da enzima que casa com o substrato é conhecida como sítio de ligação do substrato. Quando o substrato lá se fixa, forma uma combinação temporária chamada complexo enzima-substrato. A enzima é vista como uma fechadura e o substrato como a chave. Somente certos substratos (“chaves”) têm a forma correta para adentrar o sítio de ligação (“fechadura”) da enzima (MOTTA, 2011).

Para mudar a forma do substrato é necessário energia, e a velocidade de uma reação é inversamente proporcional à energia necessária para chegar ao estado de transição (quando a ligação esta começando a se formar e a geometria está mudando). As enzimas agem diminuindo a energia de ativação ( $\Delta E$ ) e acelerando a reação (DEVLIN; MICHELACCI, 2011).

A  $\beta$ -galactosidase é a enzima conhecida pela sua ação de hidrólise em lactose, sendo também chamada de lactase (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

A lactase é responsável pela hidrólise da ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 da lactose, originando como produto os monossacarídeos glicose e galactose. A galactose atua como inibidor na hidrólise da lactose, esta inibição é do tipo competitiva com o substrato, ou seja, com a lactose (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011; SEVERINSEN, 1979).

A enzima é amplamente distribuída e encontrada em animais, bactérias, fermentos e plantas. É encontrada também em humanos nas células da membrana mucosa intestinal (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Segundo Shukla (1975), a enzima beta-galactosidase pode ser obtida através das seguintes fontes microbianas:

-Bactérias: *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Streptococcus lactis* e *Lactobacillus bulgaricus*;

-Fungos filamentosos: *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus phoenecis*;

-Leveduras: *Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis*, *Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis* e *Candida pseudotropicalis*.

De acordo com a RDC nº 53, de 7 de outubro de 2014 aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos, destinados ao consumo humano, conforme a sua origem. Portanto, a enzima lactase utilizada pela indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente apenas dos seguintes fungos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* expresso em *Aspergillus niger*, *Candida pseudotropicalis* e *Saccharomyces sp*, reconhecidos como seguros (ANVISA, 2014).

Dependendo da origem que foi obtida a enzima lactase pode-se observar que há variações em algumas de suas propriedades, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Propriedades das enzimas microbianas.

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	2,5-8,0	Nenhum	55-60
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	7,0-7,5	Mn <sup>+2</sup> e Na <sup>+</sup>	35

Fonte: Mariotti (2000).

As propriedades descritas acima possibilitam a visualização e possível diferenciação das lactases produzidas por fungos filamentosos e por leveduras. O primeiro necessita de um pH ácido, diferente das leveduras que o pH é mais próximo da neutralidade, tornando estas excelentes para hidrolisarem o leite e o soro doce. Essas características são de fundamental importância para os processos industriais, pois a escolha da fonte da lactase deve estar de acordo com as necessidades impostas pela natureza do substrato e do produto (MORIWAC; MATIOLI, 2000).

Segundo Koblitz (2010), a enzima lactase é aplicada para obter os seguintes produtos: leites com baixo teor de lactose (destinados a consumidores intolerantes); iogurte (aumentando a doçura

do produto final sem aumentar o valor calórico, reduzindo o tempo de fermentação e melhorando a textura); queijo (reduz o tempo de maturação e produção do queijo tipo cheddar); produtos de panificação (a galactose presente no leite em pó, não fermentável, contribui para a formação da cor e aroma pela reação de Maillard); doce de leite, leite condensado e sorvete (evitar a formação de cristais que gera arenosidade por causa da concentração ou da temperatura); produção de xarope de glicose-galactose (adicionado à formulação de doce de leite, leite condensado, sorvete e sobremesas de leite congeladas para evitar a cristalização da lactose); e produção de galactoligossacarídeos (gerados pela ação de transferase das  $\beta$ -galactosidases, são substâncias pré-bióticas).

A lactose é um dissacarídeo formado por um radical  $\beta$ -D-galactose e um radical  $\alpha$ -D- glicose unidos por ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. É considerada um açúcar redutor, porque o carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000).

É o carboidrato dominante do leite e representa cerca de 5% do leite bovino e até 7% do leite humano. É um açúcar pouco solúvel, cristaliza-se em concentrações superiores a 18% e forma cristais capazes de provocar a sensação bucal de arenosidade. A lactose é pouco doce (apenas 16% da doçura da sacarose) e altamente higroscópica (KOBBLITZ, 2010).

Segundo Dixon e Webb (1979) e Segel (1993), a cinética enzimática estuda a velocidade da reação enzimática e como ela varia com as mudanças nas condições experimentais, principalmente em relação à concentração de substrato, concentração de enzima, inibidores e ativadores, pH, força iônica e temperatura. Estudar a cinética enzimática é necessário para, conhecer as melhores condições para a ação da enzima; os efeitos dos diversos fatores sobre ela; para otimizar o processo; estabelecer critérios para o controle do processo; dimensionar o reator adequado; e correlacionar as equações empíricas ou modelos matemáticos as velocidades de transformações com alguns dos fatores que as afetam.

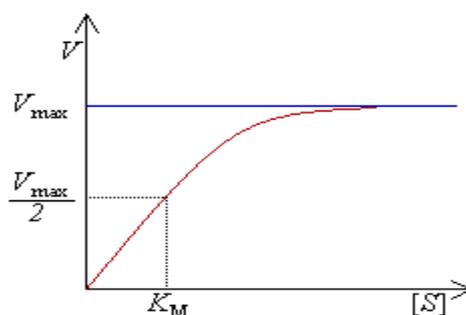
$K_m$  é denominada como a constante de Michaelis-Menten. Este parâmetro é igual à concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é a metade da velocidade máxima. Para uma reação de um substrato tem-se a dimensão moles por litro, e é independente da concentração enzimática. Porém,  $K_m$  varia com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura. Para as enzimas que possuem mais de um substrato, cada substrato possui um  $K_m$  característico. O  $K_m$  é usado frequentemente para indicar quão bem um substrato interage com uma enzima, portanto, quanto menor o valor de  $K_m$ , mais forte é a interação entre o substrato e enzima (LEHNINGER, 1976; DEVLIN; MICHELACCI, 2011).

O valor de  $K_m$  para uma determinada enzima pode ser facilmente obtido por aproximação de uma série de experimentos únicos em que a velocidade inicial de reação é medida em diferentes

concentrações iniciais do substrato, em uma concentração fixa da enzima. O valor aproximado do  $K_m$  é obtido a partir do gráfico da velocidade inicial versus concentração inicial do substrato (figura 1), que tem a forma de uma hipérbole retangular. Para concentrações de substrato muito baixas, a velocidade inicial é aproximadamente proporcional à concentração de substrato; isto é, a reação mostra essencialmente um comportamento de primeira ordem. Para concentrações de substrato muito elevadas, a velocidade de reação se aproxima da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e é essencialmente de ordem zero, isto é, aproximadamente independente da concentração de substrato (LEHNINGER, 1976).

$V_{m\acute{a}x}$  é denominado como velocidade inicial máxima e é encontrado quando a concentração de substrato é tão elevada que, essencialmente, toda a enzima no sistema está presente como complexo enzima-substrato, isto é, quando a enzima está saturada. O  $V_{m\acute{a}x}$  é dependente da concentração total da enzima (FOGLER, 1992).

Figura 1: Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.



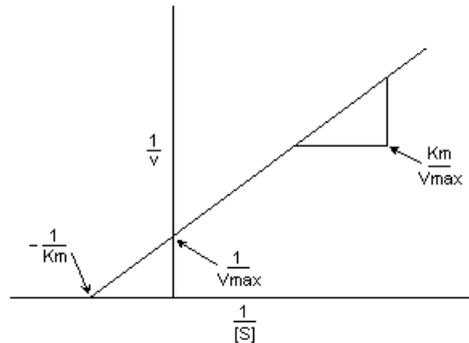
Fonte: Lehninger (1976).

De acordo com Devlin e Michelacci (2011), a relação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em outras formas que são úteis na obtenção de gráficos dos dados experimentais, como:

-A equação de Lineweaver-Burk: obtém-se um gráfico linear de  $1/V_o$  contra  $1/[S]$ . A linha reta terá uma inclinação de  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , a intercepção será  $1/V_{m\acute{a}x}$  no eixo  $1/V_o$  e uma intercepção de  $-1/K_m$  no eixo  $1/[S]$ . Esse gráfico duplo-recíproco tem a vantagem de permitir uma determinação muito mais exata de  $V_{m\acute{a}x}$ , que pode somente ser obtida como um valor-limite para

concentrações infinitamente elevadas de substrato a partir do gráfico simples  $V_o$  contra  $[S]$ . Este gráfico também fornece valores importantes com relação à inibição enzimática.

Figura 2: Gráfico de Lineweaver-Burk.



Fonte: Lehninger (1976).

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

De acordo com Villela (1978), Dixon e Webb (1979) e Smith et al. (1985), a inibição reversível das enzimas apresenta três tipos: inibição competitiva, inibição não-competitiva e a inibição acompetitiva.

-Inibição competitiva: os inibidores competitivos podem combinar-se reversivelmente com o sítio ativo da enzima e competir com o substrato por este sítio. Assim, enquanto este sítio estiver ocupado, não poderá efetuar a ligação com o substrato. A combinação de um inibidor competitivo I com a enzima E pode ser descrita da mesma maneira que a combinação com o substrato, embora o inibidor não seja quimicamente transformado em produto. A presença de um inibidor competitivo aumenta o  $K_m$  aparente da enzima para o substrato, isto é, faz com que seja necessária uma concentração mais elevada do substrato para atingir sua velocidade máxima. O  $K_m$  aparente para o substrato será maior do que o  $K_m$  verdadeiro, devido ao aumento da interceptação do eixo  $1/[S]$  do gráfico  $1/V_o$  versus  $1/[S]$ . Uma vez que a inclinação do gráfico da reação não-inibida é  $K_m/V_{max}$  e a inclinação para a reação inibida é  $K_m/V_{max} \cdot (1+[I]/K_i)$ , a inclinação esta aumentada por um fator de  $(1+[I]/K_i)$ . Por outro lado, um inibidor competitivo, não afeta  $V_{max}$ , indicando que ele não interfere com a velocidade de desdobramento do complexo enzima-substrato.

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico da enzima e do substrato, bem como de

muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente. A forma do perfil de atividade em função do pH varia usualmente com a concentração do substrato, uma vez que o  $K_m$  (constante de Michaelis) da maioria das enzimas se altera com o pH. Essas curvas serão mais significativas se a enzima for mantida saturada com o substrato em todos os valores de pH testados (LEHNINGER, 1976; SEGEL, 1993; SMITH et al., 1985).

Segundo Lehninger (1976) e Mariotto (2006), a velocidade das reações catalisadas por enzima aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. A velocidade da maioria das reações enzimáticas se duplica aproximadamente para cada elevação de 10°C em temperatura. Entretanto o coeficiente de temperatura varia consideravelmente de uma enzima para outra, dependendo da energia de ativação da reação catalisada.

Portanto, optou-se por determinar os parâmetros cinéticos da enzima  $\beta$ -galactosidase, pois cada enzima tem um pH e temperatura ótimo, ao qual a atividade enzimática é máxima. Sendo assim, de extrema importância conhecer estes valores, porque temperaturas muito elevadas podem levar a desnaturação destas enzimas, perdendo assim sua atividade. Já, o pH do meio de atuação é importante também, pois ele direcionará qual fonte microbiana da enzima será utilizada no processo, pois enzimas provenientes de leveduras apresentam pH mais neutros, enquanto de fungos filamentosos, pH mais ácidos. Cabe salientar que, os parâmetros cinéticos  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  variam em relação a cada valor de temperatura e pH. Portanto, obter estes valores ajuda na otimização do processo de produção. Com isto, o objetivo deste trabalho é determinar os parâmetros cinéticos,  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ , da enzima beta-galactosidase originária de *Kluyveromyces lactis*, em função do pH e temperatura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos testes, utilizou-se a enzima beta-galactosidase produzida através da fermentação do microrganismo *Kluyveromyces lactis*. O nome comercial da enzima é Granolact 6500 e foi doada pela empresa Granolab do Brasil S/A. Ela se apresenta na forma líquida de cor amarelo claro.

Para a construção da curva padrão foi empregada à técnica de espectrofotometria, utilizando-se glicose.

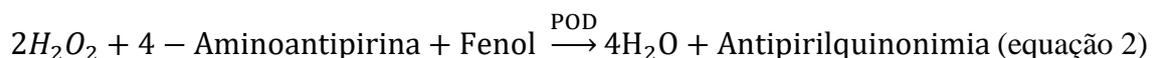
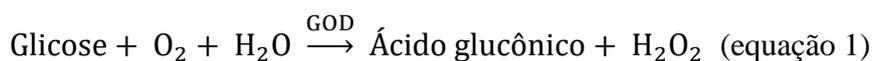
Construiu-se uma curva padrão de glicose para quantificar a concentração de glicose (produto) após a hidrólise da lactose (substrato) pela enzima. Preparou-se 100mL de solução estoque de glicose P.A na concentração de 1mg/mL. Separou-se 8 tubos de ensaio e em cada um adicionou-se solução de glicose, água destilada e por último o reagente enzimático Glicose

Monoreagente, conforme descrito na tabela 2. As concentrações finais foram: 0; 0,0015; 0,0025; 0,0035; 0,0040; 0,0045; 0,0055 e 0,0070mg/mL.

Tabela 2: Preparação das concentrações de glicose para construção da curva padrão.

Concentrações de glicose (mg/mL)	0	0,0015	0,0025	0,0035	0,0040	0,0045	0,0055	0,0070
Volume de solução de glicose (mL)	0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Volume de água destilada(mL)	0	13,3	8,0	5,7	5,0	4,4	3,6	2,9
Volume de reagente Glicose	4	2	2	2	2	2	2	2
Monoreagente (mL)								

Durante os testes, a glicose será oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD) formando o ácido glucônico e o peróxido de hidrogênio. Este, na presença da enzima peroxidase (POD) reage com a 4-aminoantipirina e o fenol, produzindo a antipirilquinonimina que tem a coloração avermelhada. A intensidade da cor vermelha é diretamente proporcional a quantidade de glicose presente no meio (equação 1 e 2). Para a obtenção da coloração utilizou-se o reagente enzimático Glicose Monoreagente, que foi doado pela empresa Quibasa Química Básica Ltda.



Após adição dos componentes descritos na tabela 2, levou-se os tubos de ensaio ao banho termostático na temperatura de 37°C por 10 minutos. Com isto, analisou-se as amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 505nm em triplicatas. Os dados coletados foram empregados na construção da curva padrão.

Para a análise da atividade enzimática, Km(constante de Michaelis-Menten) e V<sub>máx</sub>(velocidade máxima), foi empregada à técnica de espectrofotometria, utilizando-se lactose como substrato.

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de 100mL de lactose P.A na concentração de 1mg/mL em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio, pH 5,8 (MORITA, 2007). Separou-

se 6 tubos de ensaio e em cada um adicionou-se solução de lactose, água destilada tamponada pH 5,8 (MORITA, 2007) e solução enzimática, como mostra a tabela 3.

Tabela 3: Preparação dos meios reacionais para determinar a atividade enzimática, variando-se o substrato e permanecendo constante a concentração de enzima.

Concentração de lactose inicial(mg/mL)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Volume de solução de lactose tamponada(mL)	0	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2
Volume de água destilada tamponada(mL)	2	1,96	1,92	1,88	1,84	1,8
Volume de solução enzimática(mL)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Todos os tubos foram mantidos dentro de um recipiente com gelo para que a enzima não atuasse antes do tempo estabelecido. Levou-se os tubos em banho termostático na temperatura de 30°C por 5 minutos. Retirou-se e adicionou-se em cada amostra 1 mL de HCl 0,1M, para desnaturar a enzima e assim parar a reação. Pipetou-se o reagente enzimático Glicose Monoreagente nos volumes de 4; 2; 4; 6; 8 e 11mL e adicionou-se nos tubos de concentrações 0 a 0,1mg/mL, respectivamente. Colocou-se no banho termostático a 37°C por 10 minutos e filtrou-se as amostras para retirar a turbidez do meio causado pela desnaturação da enzima. Leu-se em espectrofotômetro a 505nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Repetiu-se os procedimentos acima, em pH 5,8, porém modificando a temperatura de atuação da enzima para 32; 34; 36; 38 e 40°C. Depois, realizou-se novamente estes testes mudando o pH para 6,2 e 6,6.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

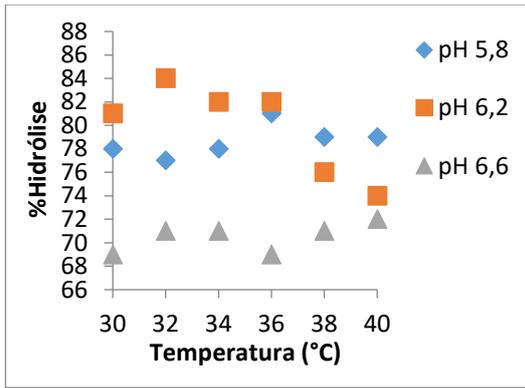


Figura 3: Porcentagem de lactose hidrolisada em função da temperatura. Concentração de lactose inicial 0,02g/L e volume de enzima 10µL.

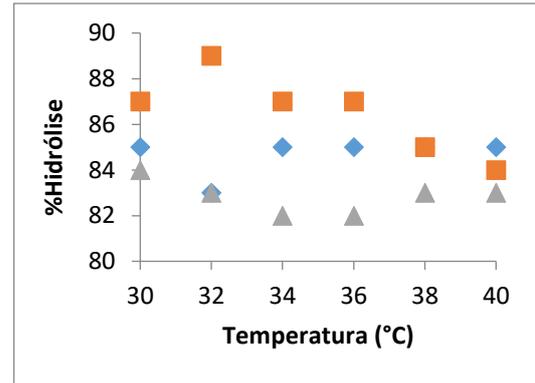


Figura 4: Porcentagem de lactose hidrolisada em função da temperatura. Concentração de lactose inicial 0,04g/L e volume de enzima 10µL.

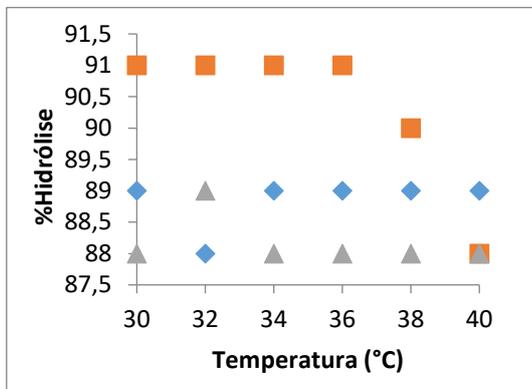


Figura 5: Porcentagem de lactose hidrolisada em função da temperatura. Concentração de lactose inicial 0,06g/L e volume de enzima 10µL.

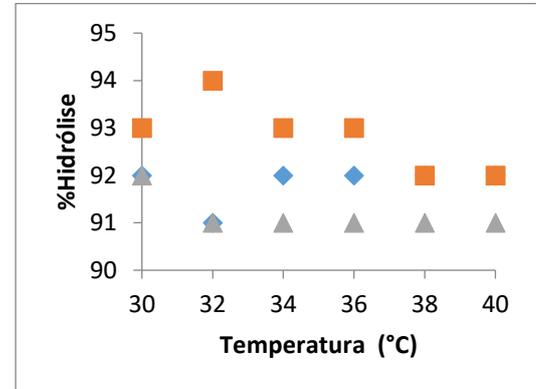


Figura 6: Porcentagem de lactose hidrolisada em função da temperatura. Concentração de lactose inicial 0,08g/L e volume de enzima 10µL.

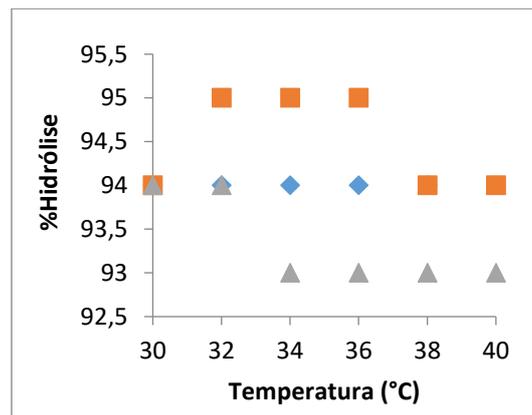


Figura 7: Porcentagem de lactose hidrolisada em função da temperatura. Concentração de lactose inicial 0,1g/L e volume de enzima 10µL.

Ao visualizar os gráficos acima, observou-se que, o pH e a temperatura alteram a atividade da enzima, influenciando na hidrólise da lactose.

O pH 6,2 contribuiu para que a  $\beta$ -galactosidase tivesse melhor atividade enzimática, ou seja, maior % de hidrólise de lactose, obtendo-se assim os produtos glicose e galactose.

Para atingir 95% de hidrólise da lactose, as melhores condições de atuação para a enzima  $\beta$ -galactosidase são as temperaturas de 32, 34 e 36°C em pH 6,2, concentração de substrato 0,1g/L e volume de enzima 10 $\mu$ L. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Carminatti (2001) que obteve-se valores próximos de 100% de hidrólise utilizando-se temperaturas de 30, 35 e 40°C, sob pH 6 e concentração de enzima 1250mg/L.

Em relação aos pHs 5,8, 6,2 e 6,6 verificou-se que, com o aumento da concentração de substrato inicial de 0,02 até 0,1g/L teve-se aumento também na % de hidrólise da lactose. Na concentração de 0,1g/L de lactose foi onde encontrou-se a maior porcentagem de hidrólise (95%), este fato provavelmente se deve a alta concentração de substrato diminuir o efeito de inibição que é causado pelo próprio produto da reação, galactose, pois este compete pelo sítio ativo da enzima beta-galactosidase impedindo que a mesma hidrolise a lactose presente no meio reacional, visto que esta inibição é do tipo competitiva. Portanto, em altas concentrações de lactose, a galactose perde seu efeito inibidor e a enzima continua hidrolisando a lactose presente no meio reacional.

Tabela 4: Valores da velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) de atuação da enzima, constante de Michaelis-Menten ( $K_{\text{M}_{\text{aparente}}}$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), conforme pH e temperatura.

T (°C)	pH 5,8			pH 5,2			pH 6,6		
	$V_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$K_{\text{M}_{\text{ap}}}$ (g/L)	$R^2$	$V_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$K_{\text{M}_{\text{ap}}}$ (g/L)	$R^2$	$V_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$K_{\text{M}_{\text{ap}}}$ (g/L)	$R^2$
30	0,0876	0,0117	0,845	0,0774	0,0132	0,952	0,0780	0,00082	0,030
32	0,1014	0,0156	0,840	0,0750	0,0177	0,920	0,0846	0,00359	0,615
34	0,0870	0,0122	0,856	0,0822	0,0165	0,940	0,0936	0,00635	0,816
36	0,0972	0,0205	0,896	0,0786	0,0160	0,920	0,0918	0,00380	0,648
38	0,0948	0,0166	0,884	0,0870	0,0091	0,940	0,0894	0,00477	0,689
40	0,0924	0,0165	0,905	0,0900	0,0084	0,799	0,0900	0,00625	0,694

Os valores da tabela 4 foram obtidos através da linearização do gráfico de Michaelis-Menten, pelo método de Lineweaver-Burk (1/V versus 1/S). Para cada temperatura estudada obteve-se a equação da reta:

$$y = a * x + b \quad (3)$$

onde,

$$b = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (4)$$

$$a = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \quad (5)$$

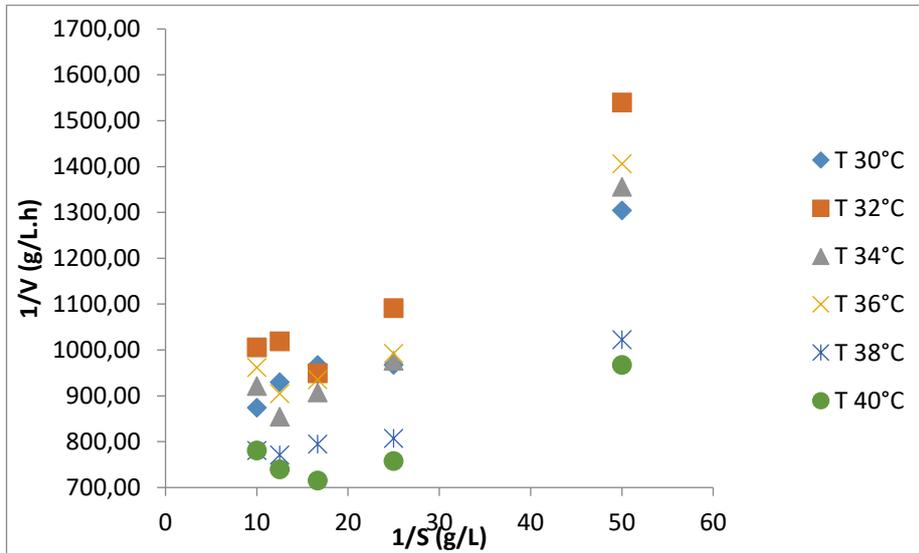


Figura 8: linearização de michaelis-menten pelo método lineweaver-burk; ph 6,2.

Observando os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) presentes na tabela 4, verifica-se que no pH 6,2 estes apresentaram-se valores mais próximos de 1, indicando um melhor ajuste dos dados ao modelo linearizado, figura 2. Com isto, os melhores ajustes foram conseguidos no pH 6,2 e temperaturas de 30 a 38°C, e com pH 5,8 na temperatura de 40°C.

Comparando os parâmetros cinéticos encontrados no pH 6,2, pH no qual foram obtidos os melhores ajustes, pode ser notado que, com o aumento da temperatura, há uma tendência em aumentar a  $V_{\text{máx}}$ . Também pode ser notado um comportamento de ligeira queda nos valores de  $K_{m_{\text{ap}}}$  com o aumento da temperatura. Isto é viável, pois quanto menor o valor de  $K_m$ , maior é a afinidade da enzima com o substrato e maior é a velocidade de atuação da enzima, em baixas concentrações de substrato.

Estes resultados vão ao encontro dos resultados dos gráficos de % de hidrólise onde há um aumento da atividade enzimática com o aumento da temperatura, exceto para a temperatura de 40°C. Este fato indica que os parâmetros cinéticos encontrados nesta temperatura não são exatos, confirmando-se pelo baixo coeficiente de determinação (0,799).

Como discutido anteriormente, para conseguir hidrolisar 95% da lactose, as melhores condições são as temperaturas de 32, 34 e 36°C em pH 6,2. Sendo as velocidades máximas e  $K_{m_{\text{ap}}}$

0,0750g/L.h, 0,0822g/L.h e 0,0786g/L.h e 0,0177g/L; 0,0165g/L e 0,0160g/L, respectivamente. Nos experimentos de Vieira (2006), verificou-se que a enzima beta-galactosidase apresentou-se  $K_{m_{ap}}$  de 12,47g/L e  $V_{máx}$  de 16,2g/L.h, ao qual utilizou soro de queijo como substrato. O fato do substrato ser soro de queijo, contendo além da lactose, como também sais minerais e proteínas do soro que auxiliam e melhoram a atividade da enzima, proporcionando-lhe, assim, maior energia para atuação. O que difere do substrato utilizado neste trabalho, lactose P.A, não contendo os outros componentes que estão presentes no soro. Deste modo, contribuindo com os diferentes e menores valores dos parâmetros cinéticos.

No trabalho de Segalla (2015) encontrou-se  $K_{m_{ap}}$  2,28g/L e  $V_{máx}$  15,05g/L.h, valores distantes perante aos analisados neste trabalho. Isto deve-se a concentração de enzima utilizada nos experimentos serem diferentes, pois quanto maior a concentração de enzima, maior é a velocidade de atuação da mesma.

#### 4 CONCLUSÃO

A temperatura e o pH interferem na atividade da enzima. As temperaturas de 32, 34 e 36°C em pH 6,2 sendo as condições onde há maior efetividade da enzima, hidrolisando 95% da lactose, e obtendo maiores valores de  $V_{máx}$  e menores valores de  $K_{m_{aparente}}$ .

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB) pela bolsa PIBIC/UNIFEB.

As empresas Granolab do Brasil S/A e Quibasa Química Básica Ltda pelas doações concedidas.

#### REFERÊNCIAS

ANVISA. **RDC 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 nº 194, Brasília-DF. 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?version=1.0](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?version=1.0). Acesso em: 16 jun. 2017.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Dissertação de pós-graduação em Engenharia química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

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

DEVLIN, T.M.; MICHELACCI, Y.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. São Paulo: Blucher, 2011. p. 396-423.

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

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Enzimas**. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2017.

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

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

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: Teoria e Aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 55-62.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. São Paulo. 2ª Ed. Vol. 1. p. 127-136. 1976.

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

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

MORITA, T e ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos**, 2ª. edição. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

MORIWAC, C.; MATIOLI, G. **Influencia da  $\beta$ -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose.** Arquivo de Ciências da Saúde Unipar, Umuarama, v. 4, n. 3, p. 283-290, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica.** 2ª Ed. Editora: MedBook. 2011.

SEGALLA, R. **Screening de suportes para imobilização de beta-galactosidases comerciais.** Dissertação de mestrado. Universidade regional integrada do alto Uruguai e das Missões – URI ERECHIM, 2015.

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

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

SHUKLA, T.P. **Beta-galactosidase Technology: A solution to the lactose problem.** *Critical Reviews in Food Technology.* V.1, p.325-356, 1975.

SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica: Aspectos Gerais.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 1985.

VIEIRA, A.A.M.T. **Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Lactozym e Prozym.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

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