

ANDRÉIA TREMARIN

Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana

FLORIANÓPOLIS – SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Co-orientador: Prof. Dr. José Miguel Muller

ANDRÉIA TREMARIN

Engenheira de Alimentos

Florianópolis, 25 de maio de 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos de Separação por Membranas (LABSEM) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

*É enfrentando as dificuldades que você fica forte,
É superando seus limites que você cresce,
É resolvendo problemas que você desenvolve a maturidade,
É desafiando o perigo que você descobre a coragem.
Arrisque e descobrirá como as pessoas crescem quando exigem mais de si próprias.*

Roberto Shinyashiki

Dedico este trabalho aos meus pais Rosamar e João Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço à Deus, por ter me dado forças para vencer todos os obstáculos e por me permitir concretizar mais um sonho.

Ao meu orientador, Professor José Carlos Cunha Petrus, pelo apoio, pelos ensinamentos, carinho, amizade e, sobretudo, por ter acreditado em mim.

Ao meu co-orientador José Miguel Müller, pela paciência, amizade e contribuição nesta etapa de minha formação.

Agradeço a meus Pais por me proporcionarem esta oportunidade, sem eles nada disso seria possível. Por estarem sempre presentes, mesmo estando longe. Agradeço pela compreensão em todos momentos da minha vida, por sempre me incentivarem, por todo carinho e amor que me deram ao longo desses anos. O meu muito obrigada é pequeno diante da grandeza do que fizeram por mim. Por isso, por mais que eu cresça, espero nunca ser grande demais para voltar aos seus braços.

Ao meu querido irmão, por sempre torcer por mim e sempre me ajudar a enfrentar os problemas e as dificuldades, pelo sorriso amigo procurando amenizar minha ansiedade diante dos obstáculos.

Aos meus queridos amigos e amigas que fiz durante essa caminhada: Ana e Sílvio, Bruno, Carol, Cláudia, Dani, Daniel, Fran D., Fran S., Jaci, Pri e Vanessa. Sem vocês não teria a mesma graça, sem vocês não teria valido à pena... Obrigada por todos momentos que passamos juntos, pelas horas de conversas, por todas risadas dadas, pelas festas, pelas jantinhas, pelos conhecimentos trocados. Obrigada por toda ajuda nos momentos difíceis. Digo com toda certeza, que a minha maior conquista aqui foi a amizade de vocês.

Não posso esquecer dos demais amigos, de longe e de perto, que sempre me deram forças para vencer as dificuldades encontradas no decorrer de todos estes anos.

Agradeço aos professores que participaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram e torceram para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram fundamentais. Minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
NOMENCLATURA	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Soro Lácteo	5
3.2 Lactose	9
3.3 β -galactosidase	12
3.4 Hidrólise da Lactose	15
3.4.1 Cinética da hidrólise da lactose	19
3.5 Processo de Separação por Membranas	21
3.6 Ultrafiltração	26
3.7 Adsorção e interação proteína-membrana	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material	29
4.1.1 Substrato	29
4.1.2 Enzima	29
4.1.3 Membranas	30

4.1.4 Equipamentos utilizados nos experimentos_____	30
4.1.5 Materiais utilizados na preparação do permeado para hidrólise _____	32
4.1.6 Materiais utilizados na análise dos produtos_____	33
4.2 Métodos_____	33
4.2.1 Preparo das membranas_____	33
4.2.2 Determinação da concentração da solução enzimática_____	35
4.2.3 Determinação das constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima_____	35
4.2.4 Determinação da lactose_____	36
4.2.5 Ensaio laboratoriais_____	37
4.2.5.1 Condicionamento físico das membranas e determinação do fluxo permeado médio_____	37
4.2.5.2 Retenção da enzima_____	38
4.2.6 Determinação da concentração de glicose_____	38
4.2.7 Determinação do percentual de hidrólise_____	40
4.2.8 Caracterização da membrana_____	41
4.2.8.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)_____	41
4.2.9 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Lactozym 3000_____	41
4.2.10 Influência das peptonas na hidrólise da lactose e no fluxo permeado no reator com fluxo perpendicular_____	43
4.2.11 Influência das peptonas na hidrólise e no método de determinação de glicose _____	43
4.2.12 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Maxilact L 5000_____	45

4.2.13 Teste de permeação da enzima e desempenho do sistema_____	46
4.2.14 Verificação da atividade da enzima adsorvida na membrana_____	47
4.2.15 Efeito da temperatura, pressão, velocidade tangencial e concentração de enzima sobre o fluxo permeado no reator operando em fluxo tangencial_____	47
4.2.16 Índice de colmatagem _____	48
4.2.17 Hidrólise em equipamento piloto de fluxo tangencial _____	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO_____	50
5.1 Determinação da concentração da solução enzimática_____	50
5.2 Determinação das constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima_____	51
5.3 Determinação de lactose_____	52
5.4 Fluxo permeado médio e retenção da enzima_____	52
5.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)_____	53
5.6 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Lactozym 3000_____	55
5.6.1 Influência da concentração de enzima_____	55
5.6.2 Influência da temperatura e do pH_____	57
5.7 Influência das peptonas na hidrólise da lactose e no fluxo permeado médio no reator com fluxo perpendicular, em função do tempo de filtração_____	58
5.8 Influência das peptonas na hidrólise e no método de determinação de glicose_____	61
5.9 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Maxilact fora do reator e na célula de ultrafiltração_____	62
5.9.1 Fora do reator (em <i>shaker</i>)_____	62
5.9.1.1 Influência da temperatura_____	62

5.9.1.2 Influência da concentração de enzima_____	63
5.9.2 Célula de ultrafiltração_____	65
5.9.2.1 Influência da concentração de enzima_____	65
5.9.2.2 Influência da temperatura na hidrólise da lactose no permeado e no retentado_____	67
5.10 Teste de permeação da enzima e desempenho do sistema_____	69
5.11 Atividade da enzima adsorvida na membrana_____	69
5.12 Utilização do equipamento piloto com fluxo tangencial_____	70
5.12.1 Influência da pressão_____	70
5.12.2 Influência da temperatura_____	72
5.12.3 Influência da velocidade tangencial_____	72
5.12.4 Influência da concentração de enzima_____	73
5.12.5 Influência da pressão na filtração do permeado com peptona_____	75
5.13 Índice de colmatagem_____	76
5.14 Hidrólise em equipamento piloto de fluxo tangencial_____	77
6 CONCLUSÕES_____	78
7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS_____	80
8 REFERÊNCIAS _____	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estruturas da lactose, galactose e glicose_____	16
Figura 3.2 - Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten_____	21
Figura 3.3 - Características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz_____	24
Figura 4.1 - Desenho esquemático da célula de ultrafiltração de bancada com fluxo perpendicular_____	31
Figura 4.2 - Desenho esquemático do equipamento de ultrafiltração com fluxo tangencial_____	32
Figura 4.3 - Etapas e condições de preparação das membranas_____	34
Figura 4.4 - Permeado hidrolisado com peptonas em diferentes concentrações_____	44
Figura 4.5 - Permeado hidrolisado sem peptona e posteriormente adicionado com diferentes concentrações de peptona _____	45
Figura 5.1 - Absorbância a 278 nm das soluções em função da concentração de enzima_____	50
Figura 5.2 - Determinação da Constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima_____	51
Figura 5.3 - Fluxo permeado médio e retenção da enzima a 25°C e pressão de 4 bar para as diferentes membranas_____	52
Figura 5.4 - Análise de FTIR da membrana nova, da membrana submersa em solução enzimática e da membrana utilizada na filtração de uma solução enzimática_____	54
Figura 5.5 - Hidrólise da lactose no permeado com e sem peptonas em diferentes concentrações de enzima (temperatura 40°C, pH 6,6 e agitação de 200 min ⁻¹)____	55
Figura 5.6 - Influência das peptonas na hidrólise da lactose (temperatura 40°C,	

pH 6,8, concentração de enzima de 1 g.L ⁻¹ , pressão de 2 bar e agitação de 200 min ⁻¹)_____	59
Figura 5.7 - Efeito das peptonas no fluxo permeado (temperatura 40°C, pH 6,8, concentração de enzima de 1 g.L ⁻¹ , pressão de 2 bar e agitação de 200 min ⁻¹)____	60
Figura 5.8 - Percentual de hidrólise no permeado hidrolisado com diferentes concentrações de peptona e no permeado sem peptona com subsequente adição de peptona após a hidrólise (temperatura de 35°C, pH 6,8, concentração de enzima de 0,4 g.L ⁻¹ e agitação de 200 min ⁻¹)_____	62
Figura 5.9 - Percentual de hidrólise para diferentes concentrações de enzima Maxilact à 35°C e 40°C e pH 6,8 com agitação a 200 min ⁻¹ no permeado sem peptona (PSP)_____	63
Figura 5.10 - Influência das diferentes concentrações da enzima Maxilact no permeado sem peptona PSP (temperatura de 35°C, pH 6,8 e 200 min ⁻¹)_____	64
Figura 5.11 - Percentuais de hidrólise da lactose no permeado utilizando-se diferentes concentrações de enzima (temperatura 35°C, pH 6,8 e agitação de 200 min ⁻¹), em função do tempo de processo_____	65
Figura 5.12 - Percentuais de hidrólise da lactose presente no retentado para diferentes concentrações de enzima (temperatura 35°C, pH 6,8 e agitação de 200 min ⁻¹), em função do tempo de processo_____	66
Figura 5.13 - Percentual de hidrólise da lactose no permeado em função do tempo e da temperatura (pH 6,8, concentração de enzima 0,2 g.L ⁻¹ e agitação de 200 min ⁻¹)_____	67
Figura 5.14 - Percentual de hidrólise da lactose no retentado em função do tempo e da temperatura (pH 6,8, concentração de enzima 0,2 g.L ⁻¹ e agitação de 200 min ⁻¹)_____	69
Figura 5.15 - Percentual de hidrólise da lactose na amostra imediatamente inativada e na amostra inativada após 90 minutos (temperatura de 35°C, pH 6,8, concentração de enzima 0,2 g.L ⁻¹)_____	69
Figura 5.16 - Percentuais de hidrólise da lactose no filtrado e no retentado, utilizando-se uma concentração de enzima de 0,2 g.L ⁻¹ , temperatura de 35°C, pH 6,8 e 200 min ⁻¹ _____	70
Figura 5.17 - Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada (temperatura de 20°C e velocidade tangencial de 0,9 m.s ⁻¹)_____	71

- Figura 5.18** - Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada, em função da temperatura (pressão de 2 bar e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$) _____ 72
- Figura 5.19** - Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água, em função da velocidade tangencial (temperatura de 40°C e pressão de 2 bar) _____ 73
- Figura 5.20** - Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada com diferentes concentrações de enzima (temperatura de 35°C , pressão de 2 bar e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$) _____ 74
- Figura 5.21** - Fluxo médio no reator de fluxo tangencial para o permeado com peptona a diferentes pressões (temperatura de 35°C e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$) _____ 75
- Figura 5.22** - Valores de hidrólise para o permeado sem peptona (PSP), com uma concentração de enzima de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, temperatura de 35°C , pH 6,8 e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$ em reator com fluxo tangencial _____ 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição dos soros doce e ácido_____	7
Tabela 3.2 -Composição do soro do leite e algumas propriedades de seus constituintes_____	8
Tabela 3.3 - Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares_____	10
Tabela 3.4 - Produtos obtidos por modificações enzimática e/ou química da lactose_____	12
Tabela 3.5 - Propriedades das lactases_____	14
Tabela 3.6 - Produtos desenvolvidos com a utilização de β -galactosidase_____	15
Tabela 3.7 - Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada_____	17
Tabela 3.7.1 - Modelos cinéticos enzimáticos_____	20
Tabela 3.7.2 - Parâmetros cinéticos obtidos com a enzima β -galactosidase_____	22
Tabela 3.8 - Exemplos de aplicações dos processos de separação por membranas_____	25
Tabela 4.1 - Códigos e composição das membranas utilizadas nos experimentos_____	35
Tabela 4.2 - Dados para determinação de K_m e V_m _____	36
Tabela 4.3 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose com a enzima Lactozym _____	42
Tabela 4.4 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose com a enzima Maxilact _____	46
Tabela 4.5 - Condições operacionais utilizadas nas filtrações com o equipamento piloto de fluxo tangencial_____	48
Tabela 5.1 - Influência da temperatura, pH e das peptonas na hidrólise da lactose no permeado com e sem peptonas_____	57

NOMENCLATURA

PVDF	Polifluoreto de Vinilideno
PCP	Permeado com Peptona
PSP	Permeado sem Peptona
UF	Ultrafiltração

RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose presente no soro lácteo é uma das possibilidades mais atrativas para utilização deste composto que é produzido em milhões de toneladas anualmente em todo o mundo. Atualmente, parte deste soro é utilizada para nutrição humana e animal e o restante é descartado no meio ambiente. Além da lactose, o soro apresenta em sua composição proteínas de alto valor biológico que podem ser concentradas por evaporação, precipitação ou ultrafiltração. Uma das possibilidades para valorização do soro lácteo com relação à lactose é sua hidrólise em reatores a membrana que apresenta a vantagem de permear continuamente o hidrolisado, mantendo-se a enzima ativa no retentado. Desta forma, maior quantidade de lactose pode ser hidrolisada por unidade de enzima. Sabe-se que enzimas podem interagir com superfícies hidrofóbicas, que são comuns em muitas membranas poliméricas. Portanto, é importante pesquisar se esta interação pode levar a uma perda de atividade catalítica da enzima adsorvida. Isto pode ocorrer devido à possibilidade da enzima utilizar o seu sítio ativo na adsorção, perdendo parte de sua atividade. Este trabalho teve como objetivo estudar a hidrólise da lactose a partir do permeado resultante da concentração de leite por ultrafiltração, verificando-se a influência das peptonas sobre a ação da enzima β -galactosidase. Verificou-se, também, a atividade da enzima adsorvida na superfície da membrana e a capacidade de retenção da enzima pelas membranas. A hidrólise da lactose foi estudada em reator a membrana de fluxo perpendicular. Foram utilizadas membranas planas de polifluoreto de vinilideno (PVDF) e de poliétersulfona (PES), ambas com ponto de corte de 10 kDa. Foram utilizadas duas marcas comerciais de β -galactosidase (*Kluyveromyces lactis*), Lactozym[®] 3000 L HP-G e Maxilact[®] L-5000. A taxa de hidrólise foi determinada através da pesquisa de glicose, um dos produtos da hidrólise, através de kit colorimétrico-enzimático. A maior atividade da enzima Lactozym foi na concentração de 0,4 g.L⁻¹, a 40°C e pH 6,8 e a melhor atividade da enzima Maxilact, na concentração de 0,2 g.L⁻¹, a 35°C e pH 6,8. Os resultados mostraram que a membrana foi capaz de reter totalmente a enzima lactase no reator, conseguindo-se até 95% de hidrólise da lactose após 90 minutos de processo, à temperatura de 35°C e pH 6,8. As peptonas do permeado foram removidas através de aquecimento e centrifugação e seu efeito sobre o fluxo permeado e a taxa de hidrólise foi investigado. A remoção das peptonas do soro fez aumentar o fluxo permeado em até 150% e a taxa de hidrólise em até 20%. Ficou evidenciado que a enzima adsorvida na superfície da membrana apresentou pouca atividade hidrolítica.

Palavras-chave: hidrólise da lactose, β -galactosidase, membrana, peptonas.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of lactose present in whey is one of the most attractive possibilities for the use of this compound, produced in millions of tons annually around the world. Currently, part of this whey is used for human and animal nutrition and the rest is discharged to the environment. Besides lactose, the whey contains proteins of high biological value which can be concentrated by ultrafiltration. Hydrolysis in membrane reactors has the advantage of continuously permeating the hydrolyzed ate keeping and enzyme active in the retentate. Thus, a greater quantity of lactose may be hydrolyzed per unit of enzyme. Generally, an enzyme may interact with hydrophobic surfaces, a characteristic of many polymeric membranes. Therefore, it is important to study whether this interaction can lead to a loss of catalytic activity of the adsorbed enzyme. This may occur due to the possibility for the enzyme to use its active site in the adsorption, losing part of its activity. The objective of this study was to investigate the hydrolysis of lactose from the permeate resulting from the concentration of milk by ultrafiltration, verifying the influence of peptones on the action of the enzyme β -galactosidase. The activity of the enzyme adsorbed on the membrane surface and the membrane capacity for enzyme retention was also verified. The lactose hydrolysis was studied in a perpendicular flux membrane reactor. Flat polyvinylidene fluoride (PVDF) and polyethersulfone (PES) membranes were used, both with a molecular weight cut-off (MWCO) of 10 kDa. Two commercial brands of β -galactosidase (*Kluyveromyces lactis*), Lactozym[®] 3000 L HP-G and Maxilact[®] L-5000, were used. The hydrolysis rate was obtained through the determination of glucose, one of the hydrolysis products, using an enzymatic-colorimetric kit. The greatest Lactozym enzyme activity was at a concentration of 0.4 g.L⁻¹, at 40°C and pH 6.8, and the best Maxilact enzyme activity was at a concentration of 0.2 g.L⁻¹, at 35°C and pH 6.8. The results showed that the membrane retained totally the lactase enzyme on the reactor, achieving up to 95% of lactose hydrolysis after 90 minutes of the process, at 35°C and pH 6.8. The permeated peptones were removed through heating and centrifugation and their effect on the permeate flux and the hydrolysis rate was investigated. The elimination of the whey peptones made the permeate flux increase by up to 150% and the hydrolysis rate by up to 20%. It was found that the enzyme adsorbed on the membrane surface showed a little hydrolytic activity.

Keywords: lactose hydrolysis, β -galactosidase, membrane, peptones.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A produção mundial de queijo tem alcançado de 11 a 12 milhões de toneladas por ano, sendo que deste processo é gerada uma quantidade total de soro de aproximadamente 100 milhões de toneladas.

De acordo com Leite (2006), o soro do queijo representa 85-95% do leite processado, após a precipitação da caseína, e contém 55% de nutrientes do leite tais como lactose, proteínas solúveis, lipídios, sais minerais, ácidos orgânicos e vitaminas e outros compostos de menor importância em termos quantitativos. O soro é visto como um resíduo sem qualquer valor comercial, normalmente descarregado em cursos de água ou incorporado em rações para animais. Este procedimento está sendo revisto dadas as suas propriedades funcionais e nutricionais. As aplicações do soro são inúmeras, englobando as próprias indústrias de lácteos, carnes, misturas secas (para condimentos), panificação, chocolate, sorvetes, aperitivos e bebidas.

A cada ano 3,2 milhões de toneladas de lactose, dissolvidas no soro, são resultantes da produção mundial de queijo. Quase metade é desperdiçada, sendo despejada diretamente no meio ambiente sem nenhum tipo de tratamento, contribuindo para poluição ambiental. Conseqüentemente, há uma necessidade de investigação sobre as possibilidades adicionais da utilização de lactose do soro. Uma destas aplicações, de interesse tecnológico e dietético é o hidrolisado enzimático de lactose, resultando, principalmente, em glicose e galactose (NOVALIN et al., 2005).

Algumas importantes vantagens tecnológicas resultam do hidrolisado de lactose em glicose e galactose. Por exemplo, a solubilidade aumenta de 18 a 55% na conversão de 80% e a doçura aumenta até 70%, comparando-se com a sacarose. Além disso, há uma depressão no ponto de congelamento na presença dos açúcares resultantes da hidrólise; um aumento nas taxas das reações de escurecimento não-enzimático e um processo de fermentação mais rápido. Além disto, os efeitos negativos

na textura de um produto, em razão da cristalização da lactose, são amenizados (NOVALIN, et al., 2005).

Pesquisas mostram que durante a hidrólise enzimática da lactose, além dos produtos principais da hidrólise - glicose e galactose, também são formados alguns tipos de oligossacarídeos (LÓPEZ-LEIVA e FODA, 1999).

A hidrólise enzimática da lactose pode ser influenciada por diversos fatores. Dentre eles estão as condições operacionais, como temperatura, pH e pressão, e a concentração de reagentes e produtos, que podem inibir a atividade da enzima (CARMINATTI, 2001).

Na hidrólise enzimática da lactose utiliza-se a enzima β -galactosidade. Esta enzima pode ser extraída de diversas fontes como animais, fungos, bactérias, leveduras e vegetais. Porém, nem todas as lactases podem ser utilizadas. As enzimas extraídas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces sp (lactis ou fragilis)* são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos realizados quanto à sua segurança (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A hidrólise enzimática da lactose pura ou do soro tem sido conduzida em reatores de várias configurações, inclusive com enzima imobilizada. Entretanto, uma vez que o custo da enzima é o fator mais importante na determinação da economia do processo, apenas os sistemas contínuos podem ser considerados. Dentre os processos contínuos estão os reatores a membrana, cuja principal vantagem, quando comparados aos sistemas de enzimas imobilizadas, é a possibilidade de se trabalhar com a enzima na forma livre em soluções homogêneas do seu próprio substrato, explorando-se ao máximo suas propriedades cinéticas (HATZINIKOLAOU et al., 2005).

Este sistema contínuo de hidrólise da enzima é viável e econômico resultando em pouca perda da atividade catalítica da enzima. As vantagens mais importantes deste processo são a operação contínua do reator a pressão baixa e o controle seletivo pela escolha das membranas apropriadas (NOVALIN, et al., 2005).

Para a separação dos componentes do soro, uma das mais promissoras técnicas é a ultrafiltração com membranas poliméricas. A ultrafiltração vem sendo utilizada na concentração de produtos lácteos e na recuperação das proteínas do soro que, após serem concentradas, são utilizadas, na forma líquida ou desidratada, em diversos produtos alimentícios (OLIVEIRA, 2000).

No presente trabalho, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática da lactose fora do reator e em reator a membrana, utilizando-se como substrato a lactose presente no permeado resultante da ultrafiltração do leite. A hidrólise foi realizada em uma célula de ultrafiltração com a enzima na forma solúvel. As enzimas β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* Lactozym 3000 L HP-G e Maxilact L-5000 foram utilizadas em diversas condições operacionais de pH, temperatura e concentração, determinando-se o percentual de hidrólise para cada condição. Também foi realizada a conversão da lactose fora do reator a membrana, para se comparar a eficiência da mesma em relação ao reator a membrana. A atividade da enzima adsorvida na membrana também foi investigada, bem como a influência que as peptonas exercem na taxa de fluxo permeado no reator e na conversão da lactose em glicose e galactose.

2.1 Objetivo Geral

Estudar a hidrólise enzimática da lactose, presente no permeado obtido da ultrafiltração do leite, utilizando-se a lactase (β -D-galactosidase) em reator a membrana, bem como os fenômenos que estão envolvidos na taxa de hidrólise e no fluxo permeado.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a cinética enzimática da lactase e os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$;
2. Preparar membranas poliméricas de ultrafiltração que possam ser utilizadas em reator a membrana;
3. Caracterizar as membranas quanto ao fluxo permeado e retenção de enzima;
4. Identificar através de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) o tipo de interação entre o polímero constituinte da membrana e a enzima;
5. Determinar os parâmetros ótimos para a ação da enzima lactase fora do reator e sob as condições do reator a membrana;
6. Determinar a influência das peptonas presentes no soro sobre o fluxo permeado e taxa de hidrólise da lactose;
7. Testar a atividade da enzima adsorvida na membrana;
8. Determinar a influência da concentração de enzima, pressão, velocidade tangencial e temperatura de processo, no fluxo permeado do reator a membrana com fluxo tangencial;
9. Determinar o índice de colmatagem das membranas após operação do reator;
10. Determinar a taxa de hidrólise no reator a membrana com fluxo tangencial.

3.1 Soro lácteo

De acordo com Zimmer (2006), as indústrias de laticínios geram três resíduos na forma líquida: o soro, resultante da produção de queijos; o leitelho, resultante da produção de manteiga e o leite ácido. Desses, o soro é o de maior importância devido à maior quantidade produzida, ao amplo espectro de possibilidades de reutilização devido ao seu potencial nutritivo e, principalmente, pelo seu elevado poder poluente.

As estimativas mais recentes mostram que cerca de 286 milhões de toneladas de soro de leite são produzidas diariamente em todo o mundo. Este soro pode fornecer, em média, 2,4 milhões de toneladas de proteínas que, potencialmente, podem satisfazer as necessidades protéicas diárias de cerca de 35 milhões de pessoas.

Durante muito tempo o soro foi considerado como um resíduo industrial ou produto com valor comercial residual. Só nas três últimas décadas foram desenvolvidos processos de separação que permitem obter ingredientes alimentares com alto teor protéico a partir do soro de leite (DUARTE, 2005).

O soro de queijo pode ser definido como a parte líquida do leite, após a precipitação da caseína, seja para fabricação desta, seja na produção de queijos. Permanece no soro aproximadamente metade dos sólidos contidos no leite, dos quais a lactose é o constituinte presente em maior quantidade. A composição do soro é variável, sendo função do leite que lhe deu origem e também das perdas que ocorrem durante a fabricação do queijo. No entanto, é de se esperar que os componentes solúveis do leite estejam presentes nas mesmas proporções que se encontravam originalmente no leite.

De uma maneira mais precisa, podemos considerar que o soro representa 85-95% do volume do leite e retém 55% dos seus nutrientes. Entre esses nutrientes destacam-se a lactose (4-5%), as proteínas solúveis (0,6-0,8%), os lipídios (0,4-0,5%) e os sais minerais (8-10% do extrato seco). Os sais minerais são essencialmente os

mesmos presentes no leite. Dentre os mais importantes destacam-se os sais de sódio e potássio, que representam metade do total. O restante é formado por sais de cálcio, magnésio e fósforo. Há também a presença de ácido láctico (0,1-0,8%), ácido cítrico, compostos nitrogenados não-protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (SISO, 1996 *apud* LEITE, 2006). As proteínas – em sua maior parte globulina e albumina – apresentam alto valor nutricional, constituindo-se em matéria-prima para produção de enzimas, anticorpos e outras substâncias necessárias ao metabolismo humano (MADRID et al., 1995 *apud* LEITE, 2006).

O soro de queijo pode ser classificado como ácido ou doce, dependendo do processo do qual ele é originado.

O soro ácido é resultante da produção de caseína ou de queijos com leites coagulados inicialmente por ácido, tais como o do tipo *cottage*, *quark*, requeijão e ricota. Esse tipo de soro apresenta uma acidez titulável de 0,5 a 0,6% em ácido láctico e pH de 4,6 a 4,7 (PONSANO et al., 1992 *apud* ALESSI, 2005). No caso da fabricação de queijo *cottage*, uma quantidade significativa de lactose do leite é convertida em ácido láctico antes que o soro seja separado da massa. À medida que aumenta a acidez, uma quantidade crescente dos sais de cálcio no leite se dissocia, o que provoca a solubilização do cálcio. Além disso, a quantidade de cálcio retido pela caseína é menor. Sendo assim, a fabricação do queijo tipo *cottage* dá origem a um tipo de soro de acidez mais elevada, teor de lactose mais baixo, teor de cálcio mais alto e perfil de minerais diferente do soro do tipo doce (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997 *apud* ALESSI, 2005).

O soro doce é proveniente da coagulação enzimática do leite em pH próximo a 6,7. Ele é obtido de queijos tipo cheddar, minas frescal, minas padrão, mussarela, prato e suíço. Sua acidez titulável em ácido láctico é de 0,15 a 0,18%, correspondente a um pH de 6,3 a 6,7 (PONSANO et al., 1992 *apud* ALESSI, 2005). O soro doce contém menos ácido láctico e apresenta percentuais de lactose e de cálcio mais elevados em comparação ao soro ácido (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997 *apud* ALESSI, 2005).

A Tabela 3.1 mostra a composição média dos diferentes tipos de soro.

Tabela 3.1 – Composição dos soros doce e ácido

Constituintes	Soro doce (%m/v)	Soro ácido (%m/v)
Água	93-94	94-95
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Proteínas	0,8-1,0	0,6-0,8
Sais minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Lipídeos	0,3-0,5	0,3-0,6
Ácido láctico	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid et al., 1995 *apud* Leite, 2006.

Ressalte-se que o soro é constituído por carboidratos e 20% do total protéico do leite integral, componentes responsáveis por sua baixa conservação e elevada demanda biológica de oxigênio, que está entre 30.000 e 50.000 mg.L⁻¹. A lactose é a principal responsável por estes altos valores, já que a recuperação de proteínas reduz esses números em apenas 10.000 mg.L⁻¹. Já a bioconversão da lactose reduz a DBO em mais de 75% (MAWSON, 1994 *apud* LEITE, 2006). Uma fábrica com produção média de 10.000L de soro por dia, polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes, por isso, quando descartado como resíduo industrial, o soro de leite tem sido considerado como um sério problema ambiental. Descartar o soro sem tratamento adequado não é apenas um crime previsto em lei, mas também rejeitar um alimento de alta qualidade constituído por uma rica fonte de proteínas com diversas propriedades nutricionais, biológicas e funcionais (SMITHERS et al., 1996 *apud* COSTA, 2004).

No Brasil, o lançamento dos efluentes das indústrias de laticínios diretamente nos cursos d'água, sem qualquer tratamento prévio, ainda é comum. Entretanto, essa é uma prática cada vez menos freqüente, devido a uma maior atuação dos órgãos ambientais.

A recuperação dos nutrientes do soro e a sua transformação em compostos de maior valor agregado parece ser uma boa alternativa. Deste modo, pode-se ter uma atividade econômica paralela à redução do efeito poluidor. A matéria orgânica presente no soro pode ser aproveitada de várias formas. As proteínas podem ser recuperadas

por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar. A lactose pode ser cristalizada e comercializada, ou fermentada para produzir etanol ou ácidos orgânicos, ou ainda hidrolisada para produzir glicose e galactose (SISO, 1996 *apud* LEITE, 2006).

As proteínas do soro são amplamente utilizadas na indústria de alimentos pelas suas propriedades funcionais. Pesquisas têm sido realizadas no sentido de estudar as propriedades funcionais das proteínas isoladas e/ou dos concentrados protéicos. Resultados têm mostrado que, às vezes, a soma das propriedades das proteínas pode limitar suas aplicações. Desta forma, se buscam técnicas de separação e isolamento de suas frações, podendo ser citadas dentre essas, as precipitações seletivas e ácidas, conjugadas com temperaturas, uso de membranas, enzimas e a combinação de ambos os métodos (SERPA, 2005).

As características das proteínas do soro do queijo podem ser visualizadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição do soro do leite e algumas propriedades de seus constituintes.

Proteínas	Massa molar (Da)	Ponto Isoelétrico	Concentração aproximada no soro (g.L ⁻¹)	Quantidade aproximada do total de proteínas do soro (%)
B-lactoglobulina	18.363	5,35-5,49	3,0	50
A-lactoalbumina	14.175	4,2-4,5	0,7	12
Imunoglobulinas	(1,61 a 10)x10 ⁵	5,5-8,3	0,6	10
Albuminas séricas	66.267	5,13	0,3	5
Proteoses-Peptonas e proteínas menores	4.100 a 40.800	3,3-3,7	1,4	23

Fonte: Cavallieri (2003).

Especialmente no caso da aplicação dos processos de separação com membranas, apesar das novas possibilidades para uma produção em grande escala de

proteínas/peptídeos do soro, o entupimento da membrana ainda limita sua aplicação. As condições experimentais, as condições de operação, as propriedades da membrana, e as propriedades do material de alimentação são os fatores principais que afetam o entupimento. A seleção das condições de operação, que ajudam a eliminar ou diminuir o entupimento da membrana, parecem ser muito importantes no caso da filtração de misturas multicomponentes como o soro (BUTYLINA et al., 2006).

A utilização racional e econômica do soro é o principal problema para os fabricantes do queijo apesar das inúmeras técnicas disponíveis. Possíveis minimizações de desperdício foram descritas por Zall e citadas por Butylina et al., 2006:

- aplicação das técnicas que minimizam a produção do soro durante a fabricação de queijo;
- uso do soro como um subproduto nutricional na indústria de alimentos;
- produção de metano e metanol;
- produção do ácido láctico e dos seus derivados;
- produção de plásticos e de polímeros biodegradáveis;
- o tratamento do soro como um resíduo.

Se por uma razão (econômica, sanitária, local) a valorização tecnológica do soro (tais como a recuperação da proteína e da lactose, e a secagem por pulverizador, etc.) ou a utilização direta do soro para a alimentação animal não for aplicável, o tratamento anaeróbico pode ser uma solução para o soro (FARIZOGLU et al., 2004).

3.2 Lactose

A lactose, cujo nome sistemático é o 4-O- β -D-galactopiranosil-D-Glucopiranosose, é o principal carboidrato do leite, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue. É o composto sólido em maior quantidade no leite desnatado, aproximadamente 50%, e no soro em torno de 70 a 80% (HOBMAN, 1994 *apud* CARMINATTI, 2001).

A lactose é um dissacarídeo com poder adoçante e solubilidade relativamente baixa que não é digerido facilmente por uma fração significativa da população global. Além disso, a lactose é um açúcar higroscópico e tem uma forte tendência a absorver sabores e odores e causa muitos defeitos em alimentos refrigerados tais como a cristalização em alimentos lácteos, desenvolvimento de textura arenosa e formação de depósito (CARRARA e RUBIOLLO, 1994 *apud* PANESAR et al., 2007). Portanto, estes problemas provocaram limitações na utilização do soro como alimento, sendo uma alternativa para a hidrólise da lactose através da enzima lactase, convertendo-a em glicose e galactose. O soro e/ou leite assim tratados podem ser utilizados no processo de produção de sorvetes, alimentos para bebês e podem ser muito interessantes para a produção de complementos de alimento humano e animal (OGRODOWSKI, 2006).

Seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem um alto poder adoçante, além de outras características desejáveis. Adicionando-se a esta propriedade o problema da baixa solubilidade, a lactose não possui características para ser utilizada como adoçante (ZANDOW, 1984 *apud* ANDRADE, 2005). A Tabela 3.3 relaciona a doçura de vários açúcares e suas solubilidades.

Tabela 3.3 – Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares.

Açúcar	Poder adoçante relativo	Solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-Galactose	32	28	36	47
D-Glicose	74	40	54	70
D-Frutose	173	-	82	87

Fonte: Zadow, 1984 *apud* Andrade, 2005.

A indústria de queijo produz grandes quantidades de lactose presente no soro do queijo e no soro permeado, gerando aproximadamente 27 milhões de toneladas por ano somente nos Estados Unidos. Foram encontrados muitos usos para o soro e a

lactose, incluindo-se formulações para bebês; produtos de panificação, laticínios e confeitaria; alimento animal; e suprimento alimentar para derivados da lactose após fermentação (MATIOLI et al., 2001).

A demanda ainda é insuficiente para toda a lactose disponível no soro. O resultado é um baixo valor de mercado. Aproximadamente metade do soro produzido não é utilizada, tornando-se um significativo problema de desperdício (MATIOLI et al, 2001). O Brasil importa cerca de 120 toneladas de lactose por mês para uso em produtos farmacêuticos e em alimentos (MINAS AMBIENTE, 1992 *apud* ANDRADE, 2005).

A obtenção de lactose a partir do soro é feita envolvendo tipicamente a remoção de proteínas (por coagulação ou ultrafiltração), a evaporação sob vácuo, dupla filtração, seguida de nova evaporação, indução à cristalização por semeadura, a centrifugação para remoção dos cristais e a secagem até pó em secador de leite fluidizado. Em geral, aproximadamente 50% da lactose é recuperada, enquanto que o líquido resultante pode ser vendido como soro em pó deslactosado (BRANDÃO, 1994; ZANDOW, 1984 *apud* CARMINATTI, 2001).

Segundo Andrade (2005), a lactose também pode ser usada como matéria-prima para a produção de diversos produtos:

- Lactosil urea, que é preparado pela condensação de lactose e uréia, usado como alimento de ruminantes para síntese de proteínas;
- Lactitol, que é um adoçante não nutritivo semelhante ao sorbitol;
- Lactulose, que é um isômero da lactose obtido pelo tratamento do açúcar do leite em meio alcalino.

A utilização fermentativa da lactose presente no permeado de soro de leite pode fornecer vários produtos de acordo com o microrganismo utilizado, como por exemplo: etanol, biomassa, acetona, butanol, ácido láctico, lactato de amônio, ácido cítrico, ácido acético, ácido málico, gomas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, enzimas e metano (POSANO et al., 1992 *apud* ANDRADE, 2005).

A molécula de lactose contém um número de sítios ativos (ligações glicosídicas, grupos redutores, grupo hidroxila livre, ligações carbono-carbono) que a tornam sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas, sendo esta uma característica comum aos carboidratos. Na Tabela 3.4 é apresentada uma variedade de processos para modificação enzimática e/ou química que tem sido estudados para utilização na indústria de alimentos (HOBMAN, 1984 *apud* CARMINATTI, 2001).

Tabela 3.4 – Produtos obtidos por modificações enzimática e/ou química da lactose.

Derivado	Processo	Uso potencial
Xarope hidrolisado	Hidrólise ácida ou enzimática	Alimentos doces
Lactulose	Isomerização	Alimentos para bebês
Ácido lactobiônico	Oxidação	Uso medicinal
Lactobionamidas	Reação de lactobiono-lactose com amida	Agente seqüestrante alcalino ou agente quelante
Lactitol	Hidrogenação	Açúcar
Lactitol palmitato	Esterificação de lactitol com ácido graxo	Emulsificantes em alimentos e detergentes
Polímeros	Polimerização	Espuma de poliuretano
Ácido ascórbico	Síntese	Vitamina C

Fonte: Hobman, 1984 *apud* Carminatti, 2001.

3.3 β -galactosidase

As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Galb1 – 4Glc) para formar glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactoligossacarídeos (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1985 *apud* ANDRADE, 2005). As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais – particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã - em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta e também são

produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais (SANTIAGO et al., 2004). As mais importantes são: *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (ANDRADE, 2005).

Diversos estudos sobre a lactase têm sido conduzidos, incluindo tópicos como: fontes para obtenção da enzima, métodos de isolamento e purificação, técnicas de ensaio, propriedades físico-químicas (tamanho, forma, desnaturação pelo calor, influência do pH), problemas relativos à hidrólise da lactose (biológicos e industriais) e disposição dos resíduos gerados na hidrólise.

As propriedades das β -galactosidases dependem da sua fonte. A lactase extraída da *Escherichia coli* possui a maior massa molecular (520kDa a 850kDa), enquanto que as de menor massa molecular são as extraídas de *Saccharomyces fragilis* (201 kDa) e *Aspegillus oryzae* (90 kDa) (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Como já mencionado, existem várias fontes de lactase, mas nem todas são recomendadas como seguras. Quando as aplicações envolvem sistemas alimentares, é mais significativo trabalhar com enzimas geralmente reconhecidas como seguras (GRAS). O status GRAS (Generally Recognized as Safe) é uma designação do FDA (Food and Drug Administration) para substâncias químicas ou aditivos adicionados ao alimento. Este status é determinado por especialistas que certificam que a utilização destas substâncias são seguras. Atualmente, o status GRAS é válido somente para *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*, porque essas enzimas já tem uma história de uso e têm sido submetidas a numerosos testes. A lactase bacteriana de *Escherichia coli*, embora seja uma espécie extensivamente estudada e utilizada em pesquisas, não é adicionada em alimentos devido aos problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes.

A Tabela 3.5 mostra as propriedades das enzimas microbianas, que variam consideravelmente com o microrganismo.

Tabela 3.5 – Propriedades das lactases

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

Fonte: Modificado de Gekas e López-Leiva, (1985).

*Nd – Não determinado

Como mostrado na Tabela 3.5, as melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte e também com o método de preparação comercial. Na imobilização das enzimas, o método de imobilização e o tipo de suporte podem influenciar as condições ótimas de operação. Geralmente as lactases fúngicas apresentam melhor condição de operação em pH ácido, sendo convenientes para hidrólise de soro ácido. Já as lactases de leveduras e bactérias apresentam melhor condição de operação em pH neutro, sendo usadas na hidrólise da lactose presente no leite.

A lactase pode ser utilizada em processos com os mais diversos tipos de reatores, incluindo reatores em batelada, reatores a membrana, reatores de leite empacotado, reatores de reciclo e reatores de leite fluidizado. A atividade da enzima é afetada pela temperatura, fluxo do substrato, material do suporte de imobilização, método de imobilização e componentes do substrato (FINOCCHIARO et al., 1980).

A importância industrial da β -galactosidase está na aplicação na indústria de laticínios. A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como “deficiência de lactase do adulto”. Ela ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade. Isto causa sintomas como diarreia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços (SANTIAGO et al., 2004).

Na Tabela 3.6 são apresentados alguns produtos desenvolvidos, empregando-se a β -galactosidase.

Tabela 3.6 – Produtos desenvolvidos com a utilização de β -galactosidase

Leite deslactosado
Produtos derivados de leite com baixa concentração de lactose
logurtes com baixa concentração de lactose
logurte adocicado
Concentrado para sorvete com baixa concentração de lactose
Xaropes alimentícios e produtos adocicados
Tratamento enzimático com lactase durante a produção de queijo
Processamento de lactose extraída de soro doce e ácido

Fonte: Carminatti, 2001.

3.4 Hidrólise da lactose

Como abordado anteriormente, a hidrólise da lactose vem sendo assunto de estudos intensos. Isto é devido a diversas razões, mas essencialmente ao fato que a

lactose é mal digerida por aproximadamente 70% da população mundial. Uma outra razão é relacionada à poluição ambiental (CURCIO et al., 2006).

Após hidrólise, a lactose se converte principalmente em glicose e galactose. Na lactose, os dois monossacarídeos são unidos por uma ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (ZADOW, 1984).

As estruturas da lactose, galactose e glicose estão representadas na Figura 3.1.

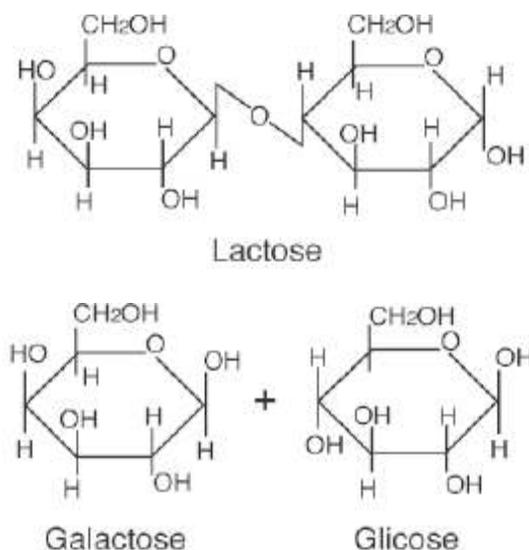


Figura 3.1 – Estruturas da lactose, galactose e glicose.

Fonte: Wattiaux, 2006.

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular. Na prática, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). Os oligossacarídeos são polímeros compostos de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações hemiacetálicas, neste caso denominadas ligações glicosídicas, em número que variam de duas até dez unidades (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

A fonte das enzimas, o tempo de reação e a concentração inicial de lactose têm uma forte influência sobre a quantidade de oligossacarídeos formados (LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995).

Importante ressaltar que a hidrólise da lactose previne sua cristalização em produtos lácteos, como doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes e melhora as características organolépticas destes alimentos como cor e sabor. A hidrólise deste açúcar também aumenta a facilidade de corte e dá cremosidade às misturas para sorvete, diminui o tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar, além de aumentar em cerca de 10% a produção dos queijos *Cottage* e *Quark* (FURTADO et al., 1995; MAHONEY, 1997) e produzir oligossacarídeos (JURADO et al., 2002).

A lactase tem sido usada preferencialmente na forma livre nas indústrias de laticínios em todo o mundo, porém em função de seu custo relativamente elevado, tem havido grande interesse em sua imobilização. Porém até o momento não se obteve uma enzima e um suporte com todas as propriedades desejadas para uso industrial. Uma outra alternativa é a redução do custo de produção da enzima, utilizando-se meios de cultura mais baratos, tais como o soro de queijo.

A hidrólise da lactose ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos. A Tabela 3.7 compara as propriedades de soluções de lactose pura e hidrolisada

Tabela 3.7 – Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada.

Propriedades	Lactose	Lactose 90% hidrolisada	Referência
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	17	55	Talley e Hunger (1952)
Viscosidade (cP) de solução a 50% a 25°C	17	105	Hemme et AL. (1979)
Fermentabilidade	Limitada	Boa	-
Taxa relativa de escurecimento	1	3,4	Pomeranz et AL. (1962)
Doçura relativa à solução de sacarose	30 – 40	65 – 90	Guy e Edmonson (1978); Amerine et al. (1965)
Propriedades umectantes	-	Comparável à sacarose	Shah e Nickerson (1978)

Fonte: Vinhal (2001) *apud* Andrade (2005).

Os hidrolisados da lactose, obtidos principalmente do soro, são produtos com boas propriedades funcionais: doçura, solubilidade, fermentabilidade e digestibilidade (ARNDT e WEHLING, 1989 *apud* KLEWICKI, 2005).

A taxa de hidrólise da lactose no leite é dependente da atividade da β -galactosidase. A atividade da β -galactosidase é dependente de sua concentração, condições de reação tais como pH, temperatura e tempo de hidrólise (ÖZBEK et al., 2006).

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ($1 < \text{pH} < 2$; $100^\circ\text{C} < \text{temperatura} < 150^\circ\text{C}$). Devido às suas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial restrita na indústria alimentícia, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de subprodutos indesejáveis e desnaturação de proteínas (SANTIAGO, 2002; ÖZBEK et al., 2006).

Realizada sob condições operacionais consideradas mais brandas ($3,5 < \text{pH} < 8,0$; $5^\circ\text{C} < \text{temperatura} < 60^\circ\text{C}$), a hidrólise enzimática, reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

Não obstante, pelo menos dois problemas são relacionados à utilização da β -galactosidase: os efeitos da inibição devido à formação de galactose e o custo elevado da enzima. Uma possibilidade para reduzir o custo com enzima e melhorar sua estabilidade é utilizar-se da técnica de imobilização com ou dentro de uma membrana sintética (CURCIO et al., 2006).

Apesar do alto custo, os sistemas em que ocorre imobilização da enzima são mais viáveis economicamente do que os sistemas em que permanecem solúveis, pois os processos em que são mantidas imobilizadas podem ser executados continuamente e oferecem a possibilidade de reutilização das mesmas (SZCZODRAK, 2000).

Devido às diferentes características e composição química das enzimas, diferentes propriedades do substrato e do produto e a finalidade de aplicação do produto obtido, não há um método único aplicável a todas as enzimas. Para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte numa imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade.

Os principais componentes de um sistema de enzimas imobilizadas são: a enzima, o suporte e o modo de ligação ao suporte. Alguns componentes adicionais, como pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de co-fatores e liberação do substrato com a remoção dos produtos, contribuem para melhor desempenho da enzima e devem ser levados em consideração na avaliação do sistema (BASSETTI, 1995).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são:

- uso da mesma enzima por um período maior de tempo;
- os processos podem ser operados continuamente e podem ser facilmente controlados;
- facilidade de separação do produto final;
- redução do volume do reator (alta concentração enzimática em menor volume);
- condições de operação mais brandas;
- facilidade de interrupção da reação;
- maior estabilidade ao pH e a temperatura.

3.4.1 Cinética da hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose em glicose e galactose tem sido modelada por diversos autores utilizando-se enzimas obtidas de bactérias, leveduras e fungos. Em geral, na modelagem é utilizada a equação de Michaelis-Menten, que fornece a relação entre

velocidade de hidrólise do substrato (V) e a concentração do substrato limitante (Cs) (SORENSEN e NOVAK, 1996).

Na Tabela 3.7.1 estão alguns dos modelos cinéticos utilizados.

Tabela 3.7.1 – Modelos cinéticos enzimáticos

Modelo cinético	Equação
Michaelis-Menten sem inibição	$V = \frac{V_m.C_s}{K_m + C_s} \quad (3.1)$
Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto	$V = \frac{V_m.C_s}{K_m + C_s \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right)} \quad (3.2)$
Michaelis-Menten com inibição incompetitiva pelo produto	$V = \frac{V_m.C_s}{C_s + K_m \left(1 + \frac{C_p}{K_i}\right)} \quad (3.3)$
Michaelis-Menten com inibição não-competitiva pelo produto	$V = \frac{V_m.C_s}{K_m \left(1 + \frac{C_p}{K_{i1}}\right) + C_s \left(1 + \frac{C_p}{K_{i2}}\right)} \quad (3.4)$

Fonte: Modificado de Santos et al., 1998.

Onde:

V = Velocidade de hidrólise ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

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

C_s = Concentração do substrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)

C_p = Concentração do produto ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)

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

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

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

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

A velocidade inicial (V) de uma reação pode ser relacionada com a concentração de substrato, tal como representado pela curva hiperbólica da Figura 3.2 e pela equação de Michaelis-Menten (3.1).

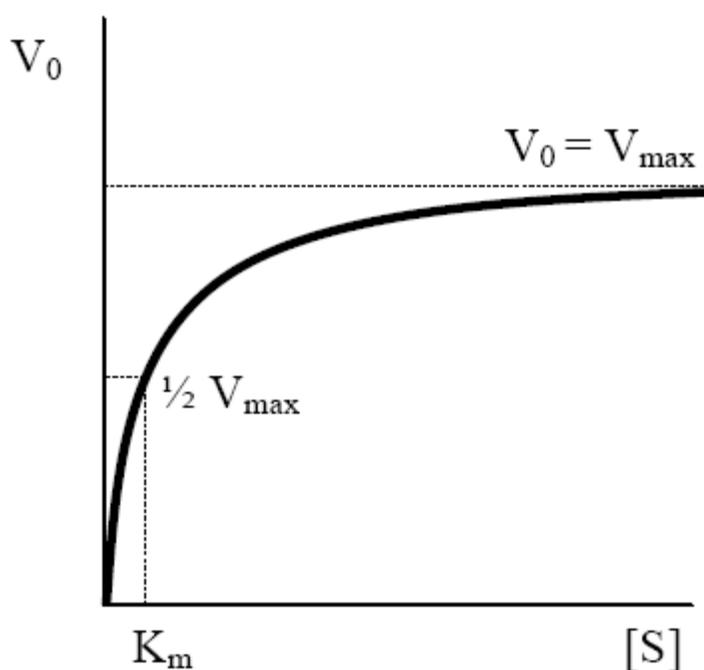


Figura 3.2 - Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten

Na Tabela 3.7.2 são apresentados parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores para a enzima β -galactosidase obtida de várias fontes e em diferentes temperaturas. Comparando-se os dados, verifica-se a existência de uma grande diferença entre os valores de V_m e K_m . Isto se deve principalmente à forma como a

enzima é utilizada. Solubilidade, método de imobilização, tipo de suporte, concentração inicial da enzima e condições de operação (temperatura, pH, fluxo) podem alterar significativamente a atividade da enzima (CARMINATTI, 2001).

Tabela 3.7.2 – Parâmetros cinéticos obtidos com a enzima β -galactosidase.

Fonte	T (°C)	Parâmetros cinéticos		Referência
		V_m ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	0,94	52	PETERSON et al., 1989
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	2,2 – 4,5	105 – 150	PORTACCIO et al., 1998
<i>Aspergillus niger</i>	40	383	70,5	YANG e OKOS, 1989
<i>Bacillus circulans</i>	60	-	41,7	NAKANISHI et al., 1983
<i>Escherichia coli</i>	21	570	0,23	HENG e GLATZ, 1994
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40	1170	5,76	MAHONEY e WHITAKER, 1977
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40	580	23	SANTOS et al, 1998
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	43	2	43,6	CARRARA e RUBIOLO, 1996
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	123	17,3	CAVAILLE e COMBES, 1995

3.5 Processos de separação com membranas

A partir do início da década de 1970, surge uma nova classe de processos que utilizam membranas sintéticas como barreira seletiva. As membranas sintéticas surgem como uma tentativa de se imitar as membranas naturais, em particular quanto as suas características únicas de seletividade e permeabilidade.

A separação por membranas é baseada na permeação ou na rejeição preferencial de várias moléculas de soluto no polímero semi-permeável ou nas

membranas inorgânicas. A força de direção para transferência de massa através das membranas é feita normalmente através de pressão mecânica. A separação por membranas é uma operação de baixa energia, e é mais barata do que as separações térmicas convencionais, isto é, evaporação e destilação. Os exemplos típicos de separações por membranas são a ultrafiltração (recuperação de proteínas), osmose inversa (dessalinização da água), e pervaporação (separação do etanol e aromas) (DEKKER et al., 2003).

De uma maneira geral, uma membrana é uma barreira que separa duas fases, restringindo total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases (HABERT et al., 2006).

Os fundamentos físico-químicos e as propriedades de transporte dos componentes, relacionados à separação por membranas são discutidos por Matsuura e Sourirajan (1995). A transferência do soluto através da membrana depende da estrutura física da membrana, que geralmente é um polímero sintético ou um material cerâmico poroso. Na osmose inversa, as membranas são materiais macroscopicamente não porosos e homogêneos, através dos quais os solutos são transportados por um mecanismo de difusão em nível molecular. Nas membranas de ultrafiltração e de microfiltração, a transferência do soluto é principalmente pelo fluxo viscoso, por convecção. Na maioria das aplicações em alimentos a concentração das moléculas do soluto é baixa e a equação da permeabilidade é aplicável (SARAVACOS E MAROULIS, 2001 *apud* DEKKER et al., 2003).

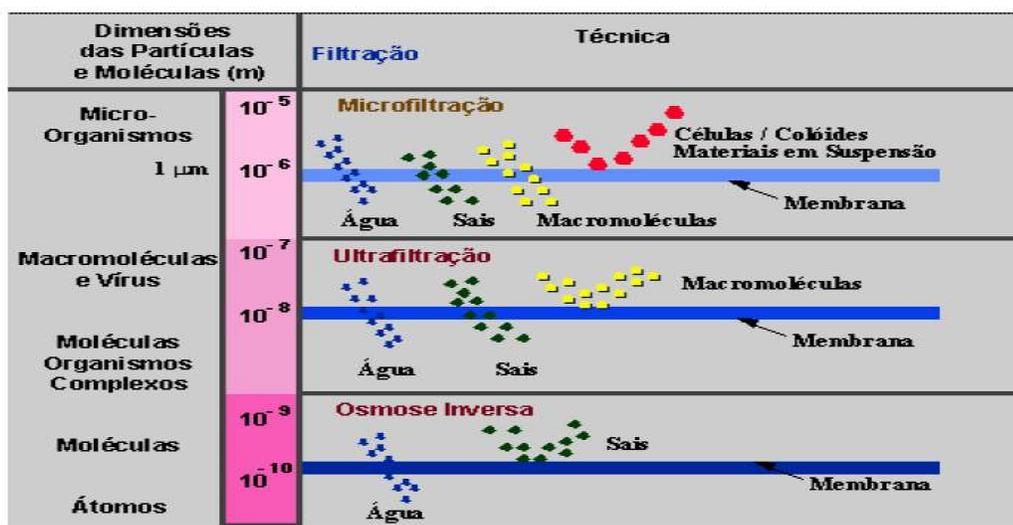
As membranas sintéticas comerciais, em sua grande maioria, são preparadas a partir de materiais poliméricos com características químicas e físicas variadas. As membranas inorgânicas apresentam vida útil maior e facilidade de limpeza, mas são mais caras que as membranas poliméricas.

Os processos de separação por membranas podem ser caracterizados em função de dois parâmetros: a) o fluxo permeado, que representa a vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área da membrana; b) a capacidade seletiva da membrana, a qual, dependendo do tipo de processo em questão, pode ser definida de diferentes formas.

Os processos de separação por membranas têm sido utilizados nos mais diferentes setores de atividade na indústria química, na área médica, passando pela biotecnologia, indústria alimentícia e farmacêutica e tratamentos de águas industriais e municipais.

Os principais atrativos para estes processos são o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas em um processamento, a maior eficiência na separação e a maior qualidade do produto final (PETRUS, 1997).

Na Figura 3.3 são apresentadas as principais características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz.



Fonte: MULDER, 2000; SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001.

Figura 3.3 - Características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz.

Na Tabela 3.8 são apresentados exemplos de aplicações de processos com membranas em algumas áreas acima mencionadas.

Tabela 3.8 – Exemplos de aplicações dos processos de separação por membranas.

Área	Aplicações
Química	Quebra do azeótropo benzeno/hexano; Recuperação de H ₂ – Síntese da amônia; Fracionamento CO ₂ , CH ₄ ; Fracionamento do ar: gás inerte e de corrente rica em O ₂ .
Biotecnologia e Farmacêutica	Separação de substâncias termolábeis; Desidratação de etanol; Purificação de enzimas; Fracionamento de proteínas; Esterilização de meios de fermentação; Biorreatores a membranas.
Alimentícia e Bebidas	Concentração de leite; Concentração do soro de queijo; Concentração de sucos de fruta; Clarificação e desalcoolização de vinhos e cervejas.
Tratamento de Águas	Dessalinização de águas; Eliminação de traços de orgânicos; Tratamento de esgotos municipais; Desmineralização de águas para caldeiras; Água ultrapura para indústria eletrônica.
Tratamento de Despejos Industriais	Separação água/óleo; Recuperação de índigo e PVA – Têxtil; Recuperação de íons metálicos – Couro; Recuperação de proteínas – Laticínio; Tratamento águas – Papel e Celulose.
Medicina	Rim artificial – Hemodiálise; Pulmão artificial – Oxigenadores; Ar enriquecido em oxigênio; Esterilização de soluções injetáveis; Dosagem controlada de remédios.

Fonte: HABERT et al., 2006.

Conforme observado na Figura 3.2, as membranas de microfiltração geralmente retêm células e materiais em suspensão, enquanto as membranas de ultrafiltração retêm macromoléculas.

Há inúmeras vantagens na utilização dos processos de separação por membranas, dentre elas, a possibilidade de separação de componentes sem a necessidade de utilização de altas temperaturas, mudanças de fase ou alterações de pH, mantendo as propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos. A baixa demanda de energia, a alta seletividade e a simplicidade de operação e escalonamento, também são vantagens que viabilizam a aplicação de processos de separação por membranas no meio industrial (MULDER, 2000).

3.6 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 a 100 nm. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar ($10^3 - 10^6$ Da) podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de UF são menores, uma força motriz maior é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo, as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 2 a 10 bar (HABERT et al., 2006).

As membranas de UF, normalmente, são especificadas através da retenção nominal (*cut off*). A retenção nominal de uma membrana é definida como sendo o valor da massa molar para qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição de 95%.

Os fluxos permeados em UF estão, em geral, na faixa de 150 a 250 L.h⁻¹m⁻². Fluxos permeados bem menores podem ser obtidos em função da polarização de concentrações e da incrustação, em função da natureza da solução a ser tratada e das condições operacionais do sistema.

Durante a UF, com a retirada do permeado através da membrana, ocorre a formação de uma camada secundária dos componentes retidos sobre a superfície da membrana. Este fenômeno é conhecido como concentração polarizada ou, se a camada superficial se torna aderente à membrana, o termo *fouling* é mais apropriado, levando à queda gradual do fluxo, diminuição do rendimento do processo e da

eficiência de separação na membrana. No caso do soro, isto é causado principalmente pela precipitação dos sais de cálcio e/ou adsorção de proteínas do soro, que ocorrem na superfície e dentro dos poros da membrana.

Este problema pode ser revertido pela limpeza da membrana. Porém alguns *fouling* são irreversíveis, necessitando assim, da troca da membrana após determinado tempo de uso (JULIANO, 2000).

As membranas de UF incluem acetato de celulose, poliamidas, polisulfonas, fluoreto de polivinilideno, e co-polímeros polivinil álcool-polietileno. Membranas cerâmicas, baseadas em alumina porosa e substratos de carbono, também são usadas. As membranas de UF são caracterizadas por suas propriedades de permeabilidade e de retenção. A permeabilidade da membrana é determinada pela distribuição do tamanho do poro e a espessura da camada ativa (DEKKER et al., 2003).

Na ultrafiltração do soro de queijo obtêm-se duas correntes: uma rica em proteína e a outra rica em lactose. A primeira é constituída de um concentrado protéico de alto valor nutritivo, chamada de corrente de retido ou do concentrado. A segunda corrente é a que atravessa a membrana de ultrafiltração, chamada de permeado, que é rica em lactose (HABERT et al., 2006).

As principais aplicações da UF são a clarificação, concentração e fracionamento de solutos. A separação é eficiente quando existe uma diferença de pelo menos 10 vezes no tamanho das espécies envolvidas. A UF é largamente utilizada na indústria de alimentos, bebidas e laticínios, assim como em aplicações na biotecnologia e na área médica. Algumas aplicações mais importantes nas indústrias de alimentos são apresentadas a seguir:

- recuperação de proteínas do soro de queijo;
- concentração do leite para produção de queijo;
- clarificação e estabilização biológica de suco de frutas;
- concentração de gelatina;
- recuperação de óleos vegetais.

3.7 Adsorção e interação proteína-membrana

Segundo Bowen et al. (2002), a investigação da adsorção e das interações de proteína com uma membrana microfiltrante é de suma importância. O conhecimento de tais interações e como estas afetam a superfície da membrana, é fundamental para a otimização de um processo de separação e/ou fracionamento e em um reator a membrana. Estas informações podem ser obtidas pela medição direta das interações proteína-proteína e proteína-superfície na membrana limpa e na membrana suja. Dentre as técnicas utilizadas para elucidar a perda de fluxo da membrana devido ao *fouling* estão: espectroscopia de infravermelho com reflexão interna (IR-IRS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (LINDAU e JONSSON, 1999) e elipsometria (BRINCK et al., 2000).

A adsorção de soroalbumina em superfícies sólidas tem sido estudada por várias técnicas como microscopia de varredura (STM), medida da força superficial (SFA), espectroscopia de energia fotoelétrica (XPS), cinética da adsorção e microscopia de força atômica (AFM). Com exceção desta última, todas as outras técnicas necessitam de uma grande preparação da amostra a ser analisada. Isto faz com que a AFM, que permite estudar a variação de potencial, a morfologia da superfície, a energia de interação e a propensão ao *fouling*, seja favorecida no estudo da adsorção de solutos em superfícies (BOWEN et al., 2002).

4.1 Material

4.1.1 Substrato

Como substrato foi utilizado o permeado resultante da ultrafiltração do leite integral, obtido em trabalho realizado no Laboratório de Processos de Separação por Membranas – LABSEM, do departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – EQA, da Universidade Federal de Santa Catarina.

O permeado do leite utilizado nos experimentos foi obtido em uma única ultrafiltração, realizada sob as seguintes condições operacionais: pressão transmembrana de 2,6 bar e temperatura de 45°C. O permeado foi colocado em recipientes com capacidade para 500 mL e armazenado à temperatura de -18°C. O permeado de cada recipiente foi descongelado imediatamente antes de sua utilização.

4.1.2 Enzima

Todos os experimentos de hidrólise da lactose foram realizados utilizando-se a enzima lactase (β -galactosidase *Kluyveromyces lactis*). Nos experimentos iniciais, foi utilizada a enzima comercialmente denominada de Lactozym 3000 L HP-G, gentilmente fornecida pela empresa Novozymes, Araucária, Paraná, Brasil. Em uma segunda etapa, utilizou-se a enzima comercialmente denominada de Maxilact L-5000, Gist-Brocades, Holanda, gentilmente fornecida pela empresa Global Food, São Paulo, Brasil.

Segundo informações dos fabricantes, cada grama do produto contém 5000 unidades de lactose neutra (Neutral Lactose Units – NLU). Uma NLU é definida como a quantidade de enzima que pode liberar 1,0 μ mol de o-nitrofenol por minuto sob as condições do teste. As enzimas foram mantidas sob refrigeração à 5°C.

4.1.3 Membranas

Neste trabalho foram utilizadas membranas de ultrafiltração preparadas no LABSEM, pela técnica de inversão de fases, através da coagulação dos polímeros em banho de não solvente (detalhes no item 4.2.1) e uma membrana comercial de PVDF. Todas as membranas foram utilizadas com o objetivo de permear os produtos da hidrólise e reter as enzimas no reator.

Nas membranas preparadas no LABSEM foram utilizados os seguintes polímeros: PVDF – Polifluoreto de Vinilideno, com massa molar de 160.000 g/mol (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie S.A.) e PES – Poliétersulfona, com massa molar de 115.000 g/mol (DuPont, S.A). Utilizou-se o DMF – N'N'Dimetilformamida (Nuclear, Casa da Química Ind. Com. Ltda), como dissolvente dos polímeros e o LiCl – Cloreto de Lítio (Vetec, Química Fina Ltda), como aditivo inorgânico, com a função de aumentar a porosidade das membranas. As membranas foram preparadas sobre suporte de poliéster-polipropileno (FO 2413 - Viledon Filter, Carl Freudenberg – Alemanha).

A membrana comercial de ultrafiltração utilizada na segunda etapa do trabalho, foi fornecida pela Romicon e preparada a partir de PVDF, com massa molar de corte de 10 kDa.

4.1.4 Equipamentos utilizados nos experimentos

1. Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Perkin Elmer.

2. Célula de filtração de bancada operando em fluxo perpendicular, conforme desenho esquemático mostrado na Figura 4.1. Esta célula foi utilizada nos ensaios preliminares.

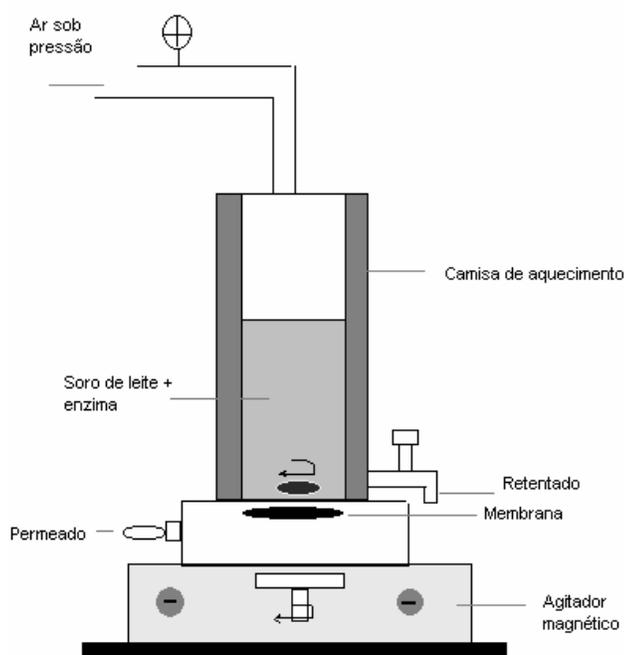


Figura 4.1 - Desenho esquemático da célula de ultrafiltração de bancada com fluxo perpendicular.

A célula foi confeccionada em aço inoxidável ANSI 316, com capacidade para 200 mL, dotada de membrana com área útil filtrante de $10,2 \text{ cm}^2$, sendo a mesma apoiada sobre um dispositivo de agitação mecânica, que permitiu a agitação do substrato através da utilização de agitador magnético. No seu interior, a célula possui na extremidade inferior uma grade de proteção, sobre a qual se localiza o agitador magnético e logo abaixo, o compartimento da membrana. Um banho termostaticado com circulação de água pela camisa da célula de ultrafiltração foi utilizado para manter a temperatura de processo no nível desejado. O controle da pressão pôde ser realizado pela utilização de um manômetro com regulador de pressão, acoplado a um sistema de ar comprimido, conectado na parte superior da célula.

Duas amostras para análise eram obtidas, simultaneamente, através dos pontos de coleta de permeado e retentado.

3. Equipamento piloto de ultrafiltração operando com fluxo tangencial, cujo desenho esquemático está representado na Figura 4.2.

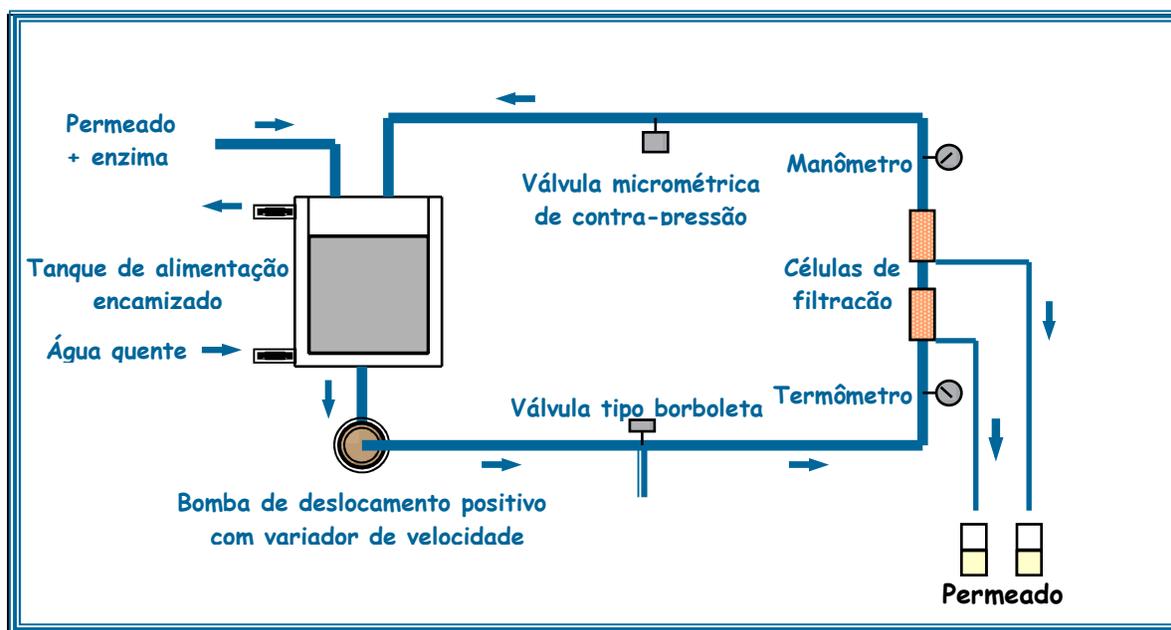


Figura 4.2 - Desenho esquemático do equipamento de ultrafiltração com fluxo tangencial.

O equipamento em escala piloto, mostrado na Figura 4.2, é dotado de um tanque de alimentação com capacidade para 5 litros, composto por uma bomba de 1,0 cv, com deslocamento positivo e inversor de frequência que permite trabalhar à pressão constante com vazões distintas e vazão constante a diferentes pressões. Também era dotado de instrumentos de medição (termômetro e manômetro) e válvula de contra-pressão.

As membranas, com área individual de 17,7 cm² foram colocadas, simultaneamente, nas duas células independentes, fabricadas em acrílico transparente e dispostas em série. A temperatura de processo foi estabelecida e mantida através de circulação de água quente, originada de um banho termostático conectado à camisa do tanque de alimentação.

4.1.5 Materiais utilizados na preparação do permeado para hidrólise

- Para retirada de parte do cálcio que se precipitou durante o congelamento das amostras, foi utilizado papel filtro (Qualy) com tamanho médio de poros de 14 µm.

- Para eliminação das peptonas presentes no permeado, utilizou-se banho-maria, tubos estéreis para centrifuga (Techno Plast Products) com capacidade para 50 mL e centrifuga (Fanem – Modelo 204 – N).
- pHmetro (Quimis – Q 400 MT).
- Solução tampão fosfato para ajuste do pH.

4.1.6 Materiais utilizados na análise dos produtos

- Kit enzimático para determinação de glicose enzimática (Gold Analisa Diagnóstica, Minas Gerais).
- Espectrofotômetro analógico CELM E225D, com cubetas de vidro.
- Espectrofotômetro de varredura Shimadzu UV-1650PC, com cubetas de quartzo.

4.2 Métodos

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1 Preparo das membranas

As membranas poliméricas denominadas de V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, foram preparadas no Laboratório de Processos de Separação com Membranas – LABSEM.

Foram preparadas membranas poliméricas com diferentes concentrações de polifluoreto de vinilideno (PVDF) e de poliétersulfona (PES).

A Figura 4.3 mostra as etapas e as condições de preparação das membranas.

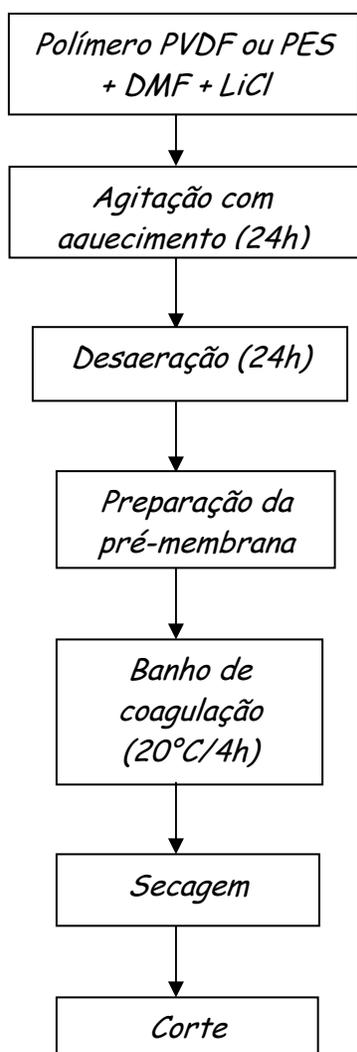


Figura 4.3 - Etapas e condições de preparo das membranas

As membranas, originalmente preparadas em folhas de 30 cm x 20 cm, foram cortadas em formato circular, com área filtrante útil de 10,2 cm², quando utilizadas na célula de bancada com fluxo perpendicular e em formato retangular, com área filtrante útil de 17,7 cm², quando utilizadas nas células do equipamento piloto de fluxo tangencial.

Na Tabela 4.1 estão indicados os códigos e a composição das membranas utilizadas neste trabalho. Todas as membranas, exceto a comercial, foram preparadas tendo como base o PVDF e o PES. Na preparação das membranas V1, V2, V3 e V4 foi adicionado o LiCl, como aditivo inorgânico. Os aditivos são comumente utilizados na

preparação de membranas visando melhorar suas características morfológicas e propriedades funcionais, principalmente a permeabilidade e seletividade.

Tabela 4.1 – Códigos e composição das membranas utilizadas nos experimentos

Polifluoreto de Vinilideno (PVDF) %		Poliétersulfona (PES) %	
V1	14% de PVDF	V5	12% de PES
V2	16% de PVDF	V6	15% de PES
V3	18% de PVDF	V7	18% de PES
V4	20% de PVDF		

4.2.2 Determinação da concentração da solução enzimática

A Lactozym e Maxilact são soluções enzimáticas que, de acordo com suas fichas técnicas, apresentam uma concentração de proteína pura de até 10%. Partindo-se da premissa que a concentração de enzima fosse 5%, foram preparadas quatro soluções com as seguintes concentrações de enzima: 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 g.L⁻¹, considerando-se que uma solução enzimática na concentração de 1,0 g.L⁻¹ (0.1%), apresenta absorvância próxima de 1.0. Para cada uma das soluções, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro de varredura, no comprimento de onda de 278 nm.

4.2.3 Determinação das constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima

Foram realizados ensaios para determinar os valores de K_m e V_m . Primeiramente, foram colocados em tubos de ensaio, o tampão fosfato (pH 7,0), a água destilada, o substrato (solução de lactose 1M) conforme indicado na Tabela 4.2. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a temperatura de 35°C. Na seqüência, colocou-se a enzima e incubou-se por 10 minutos. Após, as amostras foram retiradas e inativadas com banho-maria a 90°C por 3 minutos, preparando-se as amostras com kit colorimétrico enzimático e procedendo-se à leitura espectrofotométrica a 500 nm.

Tabela 4.2 – Dados para determinação de K_m e V_m .

Tubo	Tampão (mL)	Água (mL)	Lactose (mL)	Enzima (mL)
Branco	0,025	2,5	2,5	0
1	0,025	2,5	0,25	0,05
2	0,025	2,25	0,5	0,05
3	0,025	2	0,75	0,05
4	0,025	1,75	1	0,05
5	0,025	1,5	1,25	0,05
6	0,025	1,25	1,5	0,05
7	0,025	1	1,75	0,05
8	0,025	0,75	2	0,05
9	0,025	0,5	2,25	0,05
10	0,025	0,25	2,5	0,05
11	0,025	0	2,75	0,05

Através dos dados obtidos, foi possível calcular a velocidade inicial (V_o), dividindo-se a quantidade de produto formado (g/L) pelo tempo de reação (0,167 horas). Os dados foram graficados de acordo com Michaelis-Menten, que consiste na concentração de substrato (C_s) *versus* velocidade inicial. Os valores da velocidade inicial (V_o) e do substrato (C_s) são divisores de 1 ($1/V_o$ e $1/[C_s]$), desta forma, obtém-se um gráfico linear denominado de Lineweaver-Burk, onde os valores de K_m e V_m são calculados através da equação (4.1).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_m \cdot [C_s]} + \frac{1}{V_m} \quad (4.1)$$

4.2.4 Determinação da lactose

A determinação de lactose no soro lácteo foi baseada na Instrução Normativa nº 68 - Métodos Analíticos Oficiais Físicos Químicos, para controle de leite e produtos lácteos (BRASIL, 2006).

4.2.5 Ensaio laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram realizados fora do reator (em *shaker*) e utilizando-se a célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular, esquematizada na Figura 4.1. As condições operacionais utilizadas em cada ensaio estão descritas detalhadamente no Capítulo 5.

4.2.5.1 Condicionamento físico das membranas e determinação do fluxo permeado médio.

Após preparo, e imediatamente antes do uso, as membranas foram submetidas a um condicionamento com água destilada para que os seus poros se compactassem, reduzindo as possíveis diferenças de fluxo permeado e mantendo sua funcionalidade em ensaios distintos com a mesma membrana.

O condicionamento consistiu em submeter as membranas a duas ou três filtrações com duas horas cada uma. Para o condicionamento utilizou-se água destilada a 25°C e pressão transmembrana de 4 bar.

A determinação do fluxo permeado foi calculada para cada membrana dividindo-se o volume filtrado (L) pelo produto da área da membrana (m²) pelo tempo de filtração (h).

$$Fluxo = \frac{\text{volume permeado}(L)}{\text{área}(m^2) \cdot \text{tempo}(h)} \quad (4.2)$$

As condições operacionais utilizadas nos ensaios foram as mesmas utilizadas no condicionamento (25°C/4 bar).

A amostra inicial foi coletada durante os primeiros 5 minutos de filtração e as demais em intervalos de 15 minutos até a filtração de todo o volume adicionado na célula (200 mL).

4.2.5.2 Retenção da enzima

Para se determinar a retenção da enzima pelas membranas, uma solução aquosa foi preparada adicionando-se 4 mL da solução enzimática em 200 mL de água. A densidade ótica desta solução foi lida em espectrofotômetro a 278 nm, antes de ser disposta na célula de filtração.

A retenção de enzima em cada membrana foi calculada pela diferença da absorbância da solução enzimática inicial pela absorbância da solução enzimática permeada.

$$\text{retenção} = 100 - \left(\frac{E_p}{E_i} \right) \quad (4.3)$$

Onde:

E_p = absorbância da solução de enzima permeada

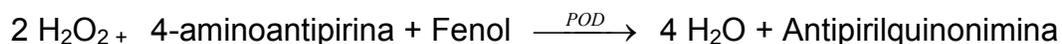
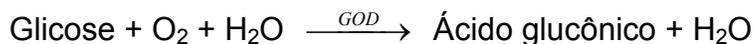
E_i = absorbância da solução de enzima inicial

4.2.6 Determinação da concentração de glicose

Nas amostras de permeado e retentado, o objetivo principal foi determinar a concentração de glicose presente, resultante da hidrólise da lactose. Todas as amostras foram analisadas utilizando-se o kit de Glicose Enzimática fornecido pela Analisa Diagnóstica.

a) Princípio do método

O método baseia-se na oxidação da glicose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio com a enzima glicose oxidase atuando como catalisador. O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha. A coloração é determinada em espectrofotômetro ajustado para absorbância a 500 nm. As reações que ocorrem durante a realização do teste são:



A linearidade do método é garantida até uma concentração de glicose máxima de 4 mg.dL⁻¹. Acima disso, foram realizadas diluições para adequação da amostra à faixa de análise do teste.

b) Análise das amostras

Em um tubo de ensaio adicionou-se 20 µL de amostra obtida nos ensaios e 2 mL do reagente de cor. Paralelamente, em outro tubo de ensaio, preparou-se um branco, contendo 2 mL do reagente de cor, e um padrão, contendo 20 µL do padrão de glicose e 2 mL do reagente de cor. O branco foi utilizado para a calibração do espectrofotômetro e o padrão, que continha uma concentração conhecida de glicose, para se determinar a curva de calibração do teste. Devido à linearidade do teste, apenas uma leitura do padrão foi realizada.

Os tubos de ensaio preparados foram deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi realizada em até uma hora em espectrofotômetro ajustado para absorvância a 500 nm. A absorvância obtida é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra, devendo ficar entre os valores de 0,000 a 0,800, que é a precisão máxima do espectrofotômetro utilizado.

A quantidade de glicose na amostra pode ser calculada pelas equações (4.4) e (4.5):

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} \quad (4.4)$$

$$C_g = F_c \cdot A_a \quad (4.5)$$

Onde:

Fc = Fator de calibração

Cp = Concentração do padrão = 0,001 g.mL⁻¹

Cg = Concentração de glicose

Ap = Absorbância do Padrão

Aa = Absorbância da Amostra

4.2.7 Determinação do percentual de hidrólise

O percentual de hidrólise é determinado através da estequiometria da reação, considerando-se que para cada molécula de lactose degradada é formada uma molécula de glicose e uma de galactose, segundo a reação:



Através da determinação da concentração de glicose, foi possível calcular a quantidade de lactose hidrolisada através da equação (4.6). Estes valores foram utilizados na construção dos gráficos % de hidrólise *versus* tempo para as condições operacionais testadas.

$$\%hidrólise = \left(\frac{Cg}{C} \right) \cdot 100 \quad (4.6)$$

Onde,

Cg= concentração de glicose em gramas

C= 2,18 que é a quantidade de glicose presente na amostra.

4.2.8 Caracterização da membrana

A caracterização da membrana foi realizada por FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier para determinar a ocorrência de interações adsorptivas membrana-enzima, o que pode provocar diminuição do fluxo permeado e redução da atividade da enzima.

4.2.8.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

No estudo dos polímeros, através do FTIR, pode-se analisar os compostos presentes na estrutura dos mesmos e a interação entre eles. Exceto para isômeros óticos, não se conhecem compostos com um mesmo espectro. Neste trabalho utilizou-se a espectroscopia por reflexão interna (FTIR – ATR) devido à baixa transmissão (opacidade) da membrana.

Esta técnica mede o nível vibracional das moléculas através do contato da amostra com um cristal com alto índice de refração e baixa absorção na região do infravermelho. Geralmente, a radiação atinge uma profundidade variando entre 0,1 a 5,0 micra, dependendo, principalmente, do ângulo de incidência e do comprimento de onda.

Amostras da membrana nova, de uma membrana mergulhada numa solução enzimática e, por último, de uma membrana usada na filtração de uma solução enzimática, foram analisadas.

4.2.9 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Lactozym

Os ensaios para determinação das condições ótimas de hidrólise da lactose em glicose e galactose, utilizando-se a β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* Lactozym, foram realizados sob diferentes condições operacionais, através da alteração das variáveis temperatura, pH e concentração de enzima, conforme detalhamento apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose com a enzima Lactozym.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de enzima (g.L ⁻¹)
40	6,6	0,4
		0,8
		1,2
37	6,6	0,4
40		
43		
40	6,4	0,4
	6,6	
	6,8	

Os experimentos foram realizados fora do reator e na célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular (vide Figura 4.1).

Na hidrólise da lactose fora do reator, o pH do permeado, resultante da ultrafiltração do leite, foi ajustado nas condições mostradas na Tabela 4.3, transferindo-se 50 mL para um erlenmeyer e levado à agitação a 200 min⁻¹ com aquecimento controlado. Quando o permeado atingiu a temperatura desejada, adicionou-se a enzima e, após uma hora, eram retiradas amostras para análise que eram inativadas em banho-maria à 90°C por 1 minuto e, posteriormente, levadas à determinação da taxa de hidrólise da lactose.

Para hidrólise da lactose em reator a membrana com fluxo perpendicular, após a membrana com 12% PES (V5) ser disposta na célula de ultrafiltração, 150 a 200 mL de permeado resultante da ultrafiltração do leite, foram adicionados ao sistema. Quando a solução atingia a temperatura desejada, a enzima era adicionada. O reator era então fechado e a pressão dentro da célula foi controlada através de ar comprimido. Uma rotação de 200 min⁻¹ foi utilizada para manter a solução em constante agitação.

Os ensaios foram realizados durante um período de 2 a 4 horas. A primeira amostra foi retirada nos primeiros 5 minutos de ensaio e as demais em intervalos de 15 minutos, sendo coletadas amostras do permeado, que foram imediatamente levadas ao banho-maria a 90°C por 3 minutos para inativação da enzima (caso permeasse a

membrana). A temperatura da célula encamisada foi mantida através da utilização de um banho termostaticado.

Em intervalos regulares de tempo, foram coletadas amostras para determinação do fluxo permeado.

4.2.10 Influência das peptonas na hidrólise da lactose e no fluxo permeado no reator com fluxo perpendicular

Para verificar se as peptonas influenciavam na hidrólise da lactose foram realizados alguns testes preliminares. Para retirada das peptonas, o permeado foi aquecido a 80°C por 20 minutos e depois centrifugado a 3000 min⁻¹ por 20 minutos.

Foram realizadas ultrafiltrações com permeado sem peptona (PSP) e outra com permeado com peptona (PCP), a 40°C e pH 6,8, utilizando-se membrana de V5 (PES 12%). Para ajuste do pH foi utilizada uma solução-tampão de fosfato de potássio.

A enzima foi adicionada na concentração de 1 g.L⁻¹ após o permeado (com e sem peptona) mantido sob agitação, ter atingido 40°C. A célula foi então fechada e submetida à pressão de 2 bar. Foram coletadas amostras em diferentes intervalos para verificar o percentual de hidrólise em função do tempo e o fluxo permeado médio.

4.2.11 Influência das peptonas na hidrólise e no método de determinação de glicose

Realizou-se um ensaio para se verificar a influência das peptonas na hidrólise da lactose presente no permeado e no método de quantificação de glicose (kit enzimático colorimétrico). As peptonas foram eliminadas do permeado por aquecimento e centrifugação.

Numa primeira etapa, foram transferidas diferentes concentrações de peptona (0,002 g.mL⁻¹; 0,004 g.mL⁻¹; 0,006 g.mL⁻¹ e 0,008 g.mL⁻¹) para um erlenmeyer e adicionaram-se 50 mL de PSP com pH 6,8, conforme Figura 4.4. O sistema foi colocado em banho com aquecimento a 35°C e agitação de 200 min⁻¹ e adicionou-se 0,4 mL da

solução de enzima (na concentração de $0,4\text{g.L}^{-1}$). Este ensaio foi realizado para verificar se as peptonas influenciam na hidrólise.

Na segunda etapa, 5 mL de permeado sem peptona (PSP) já hidrolisado (pH 6,8; aquecimento a 35°C , agitação de 200 min^{-1} e concentração de enzima de $0,4\text{ g.L}^{-1}$) foi adicionado a diferentes concentrações de peptona ($0,002\text{ g.mL}^{-1}$; $0,004\text{ g.mL}^{-1}$; $0,006\text{ g.mL}^{-1}$ e $0,008\text{ g.mL}^{-1}$), conforme Figura 4.5. Para leitura fez-se uma diluição de 1:100 seguida de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm. As Figura 4.4 e 4.5 ilustram o procedimento adotado.

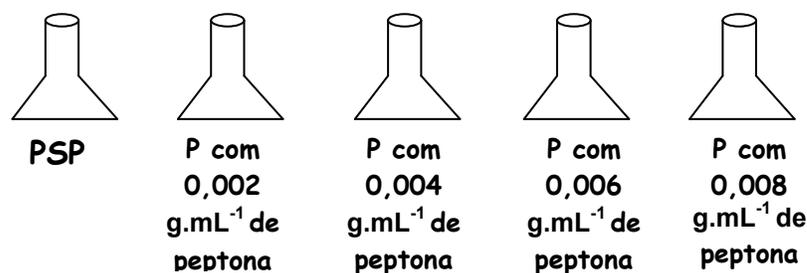


Figura 4.4 - Permeado hidrolisado com adição de diferentes concentrações de peptonas.

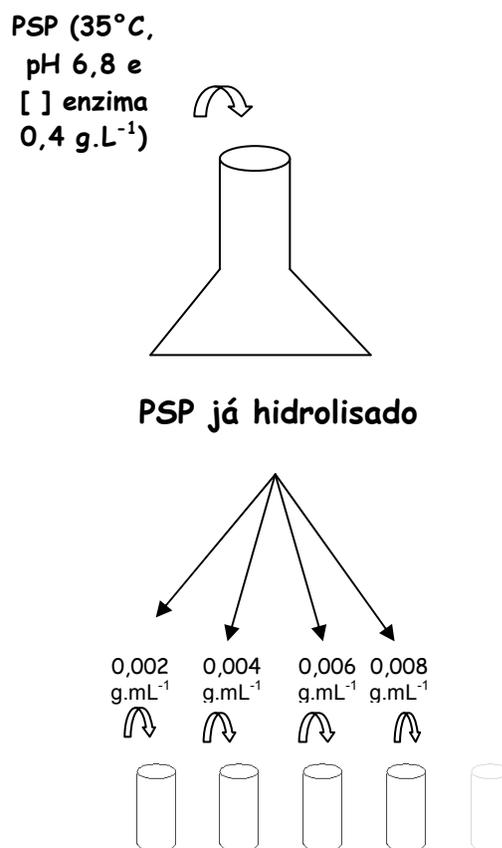


Figura 4.5 - Permeado hidrolisado sem peptona e posteriormente adicionado com diferentes concentrações de peptona.

4.2.12 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Maxilact

Os ensaios para determinação das condições ótimas de hidrólise da lactose em glicose e galactose, utilizando a β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* Maxilact, foram realizados sob diferentes condições operacionais, através da alteração das variáveis temperatura e concentração de enzima, conforme descritas na Tabela 4.4. O pH não foi variado, pois a levedura (*Kluyveromyces lactis*) é a mesma produtora da enzima para as duas diferentes marcas comerciais.

Tabela 4.4 – Condições operacionais utilizadas nos ensaios de hidrólise da lactose com a enzima Maxilact.

Temperatura (°C)	Ph	Concentração de enzima (g.L ⁻¹)
35	6,8	0,2
		0,4
		06
		0,8
		1,0
40	6,8	0,2
		0,4
		06
		0,8
		1,0

Os experimentos foram realizados fora do reator (em *shaker*) e na célula de ultrafiltração com fluxo perpendicular, para os permeados com e sem peptona para verificar se as peptonas influenciavam positivamente ou negativamente na hidrólise da lactose. A membrana utilizada neste ensaio foi uma membrana comercial de PVDF. Os demais procedimentos foram idênticos aos realizados com a enzima Lactozym.

4.2.13 Teste de permeação da enzima e desempenho do sistema

A hidrólise do PSP foi realizada no reator adicionando-se 0,2 g/L de enzima a 60 mL de soro. Após 90 minutos parte do permeado foi colocada em banho-maria a 90°C para inativação da enzima e outra parte foi colocada em um banho a 35°C por mais 90 minutos para verificar se a enzima havia permeado a membrana.

No mesmo ensaio também foi verificado o desempenho do sistema. A cada 50 mL permeado, eram adicionados mais 50 mL de PSP no reator e filtrado por mais 90 minutos.

Este ensaio foi realizado para mostrar que a mesma quantidade de enzima é capaz de hidrolisar uma maior quantidade de permeado.

4.2.14 Verificação da atividade da enzima adsorvida na membrana

Foram realizados testes de adsorção, para verificar se a lactase ficava adsorvida na membrana e se havia atividade catalítica nestas condições.

Permeado sem peptona foi colocado na célula de filtração, adicionando-se 0,2 g.L⁻¹ de enzima. A filtração foi feita por duas horas, recolhendo-se amostras do permeado e do retentado em diferentes intervalos de tempo. Neste ensaio, utilizou-se a membrana de ultrafiltração comercial de PVDF.

Após ultrafiltração com o permeado e solução enzimática, a célula de filtração foi lavada três vezes com água destilada. Na seqüência, adicionaram-se 150 mL de PSP, sem adição da enzima, e filtrado por duas horas. Amostras foram recolhidas dentro e fora do reator em diferentes intervalos de tempo e posteriormente analisadas para pesquisa de glicose. Esse PSP foi então descartado e a célula de filtração novamente lavada com água destilada, um algodão umedecido com água foi passado sobre a membrana para remover a enzima que estivesse depositada sobre ela. Novamente, foram colocados 150 mL de PSP, sem adição de enzima, e filtrado por duas horas. Amostras foram recolhidas dentro e fora do reator em diferentes intervalos de tempo e posteriormente analisadas para pesquisa de glicose.

4.2.15 Efeito da temperatura, pressão, velocidade tangencial e concentração de enzima sobre o fluxo permeado no reator operando em fluxo tangencial

Foram realizados ensaios para verificar se a pressão, temperatura, velocidade tangencial e concentração de enzima influenciavam no fluxo permeado quando se operava com o ultrafiltro em fluxo tangencial.

Inicialmente, realizou-se um experimento com água à temperatura constante de 35°C e velocidade tangencial de 0,9 m.s⁻¹, variando-se a pressão a cada 15 minutos, testando-se os valores de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 bar, para determinação do fluxo permeado. As demais condições operacionais estão mostradas na Tabela 4.5.

Quando se utilizou o equipamento piloto de fluxo tangencial, a água foi aquecida até a temperatura desejada, no próprio tanque de alimentação, através de circulação de

água aquecida na camisa do tanque. Atingindo a temperatura desejada, o equipamento foi ligado com velocidade tangencial programada em $0,9 \text{ m.s}^{-1}$, regulava-se a pressão através da válvula de contra-pressão e iniciava-se a contagem do tempo de operação e de coleta do permeado, que foi feita no início e em intervalos de 15 minutos.

Tabela 4.5 – Condições operacionais utilizadas nas filtrações com o equipamento piloto de fluxo tangencial.

Condições operacionais	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Velocidade tangencial (m.s^{-1})	Concentração de enzima (g.L^{-1})	
Água	35	0,5	0,9	-	
		1,0			
		1,5			
		2,0			
		2,5			
		3,0			
	20 30 40 50	2,0	0,9	-	
		40	2,0	0,43	-
				0,54	
				0,64	
	0,75				
	0,86				
	0,9				
	Solução de enzima	35	2,0	0,9	0,05
					0,1
0,2					
0,4					
0,8					
Permeado	35	0,5	0,9	-	
		1,0			
		1,5			
		2,0			
		2,5			
		3,0			

4.2.16 Índice de colmatagem

Para se verificar o índice de colmatagem da membrana, filtrou-se água destilada antes e após a realização dos experimentos com permeado ou com solução de enzima.

Através da equação (4.6) calculou-se o índice de colmatagem para cada condição de ensaio.

$$IC = 1 - \left(\frac{F_f}{F_i} \right) \quad (4.6)$$

Onde:

F_f = Fluxo de água final

F_i = Fluxo de água inicial

4.2.17 Hidrólise em equipamento piloto de fluxo tangencial

Para verificar a hidrólise da lactose no PSP, o pH foi fixado em 6,8 com solução tampão fosfato. Colocou-se 2.800 mL do PSP no reator com fluxo tangencial e quando a temperatura estava em 35°C foram adicionados 0,2 g.L⁻¹ de enzima (11,2 mL da solução de enzima). Amostras do permeado foram recolhidas em diferentes tempos para verificar o percentual de hidrólise em função do tempo. Parte dessas amostras foram inativadas e a outra parte foi deixada em banho-maria a 35°C, retirando-se amostras nos tempos 30, 60 e 90 minutos. A reação foi interrompida em banho-maria a 90°C por 3 minutos.

A leitura da concentração de glicose, após diluição de 1:100, foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 500 nm.

5.1 Determinação da concentração da solução enzimática

As enzimas utilizadas neste trabalho - Lactozym[®] 3000 L HP-G e Maxilact[®] L-5000 são comercializadas na forma de extratos enzimáticos que, de acordo com suas fichas técnicas, apresentam uma concentração de proteína pura de até 10%. Assumindo-se uma concentração de enzima de 5% em cada extrato, foram preparadas quatro soluções aquosas com diferentes concentrações de enzima e para cada uma das soluções, foi feita a leitura espectrofotométrica. O resultado é mostrado na Figura 5.1.

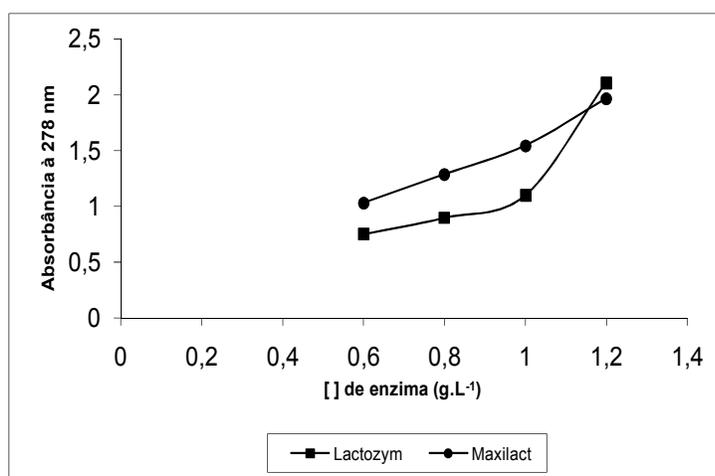


Figura 5.1 – Absorbância a 278 nm das soluções em função da concentração de enzima.

Sabendo-se que uma solução enzimática com concentração de 0,1% apresenta absorbância próxima de 1,0, verifica-se pela Figura 5.1 que a enzima Lactozym, em solução aquosa, numa concentração de 1,0g.L⁻¹, apresentou absorbância de aproximadamente 1,0. Portanto, considerou-se que a concentração da enzima

Lactozym no extrato era de 5%. Observa-se, ainda, pela Figura 5.1, que a enzima Maxilact estava presente no extrato em uma concentração de aproximadamente 6,3%, portanto superior à Lactozym.

5.2 Determinação das constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima

A determinação das constantes K_m e V_m para a enzima Maxilact podem ser verificadas através da Figura 5.2.

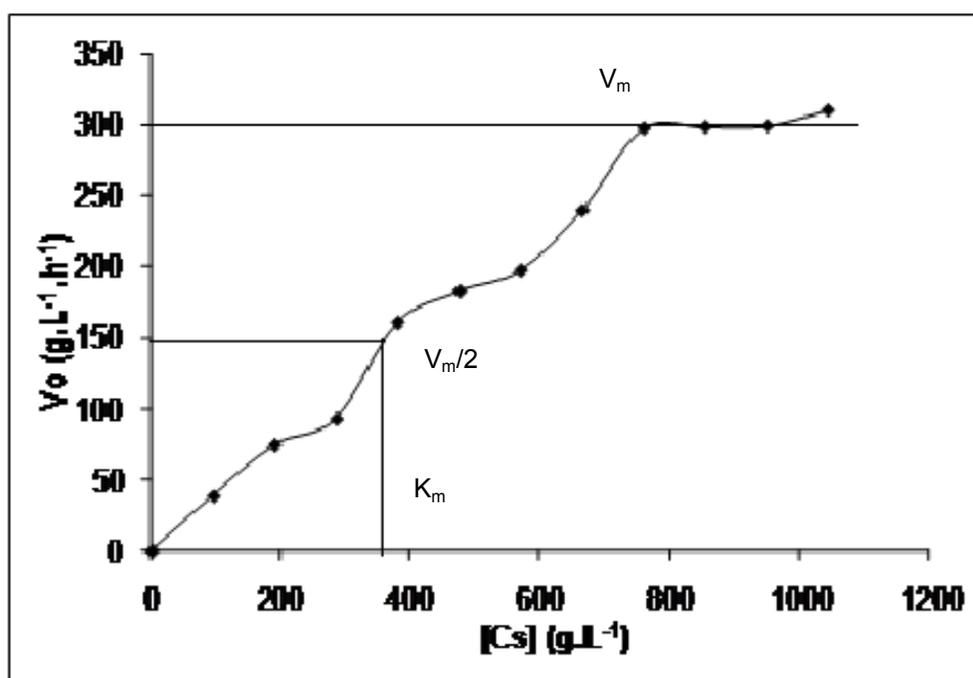


Figura 5.2 – Determinação da Constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima .

Pelo gráfico acima é possível verificar que os valores de K_m e V_m são 380 g.L^{-1} e $300 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivamente.

De um modo geral, as enzimas possuem mecanismos de reação diferentes, portanto, o significado real da magnitude de K_m e V_m pode variar de uma enzima para outra.

5.3 Determinação de lactose

O soro lácteo utilizado nos experimentos apresenta uma concentração de lactose de 4,14 g/100g.

5.4 Fluxo permeado médio e retenção da enzima

A Figura 5.3 mostra o fluxo permeado médio com água e a retenção da enzima Lactozym pelas membranas V1 a V7, preparadas a partir de soluções poliméricas com diferentes concentrações de PVDF (V1, V2, V3 e V4) e PES (V5, V6 e V7) (Tabela 4.1)).

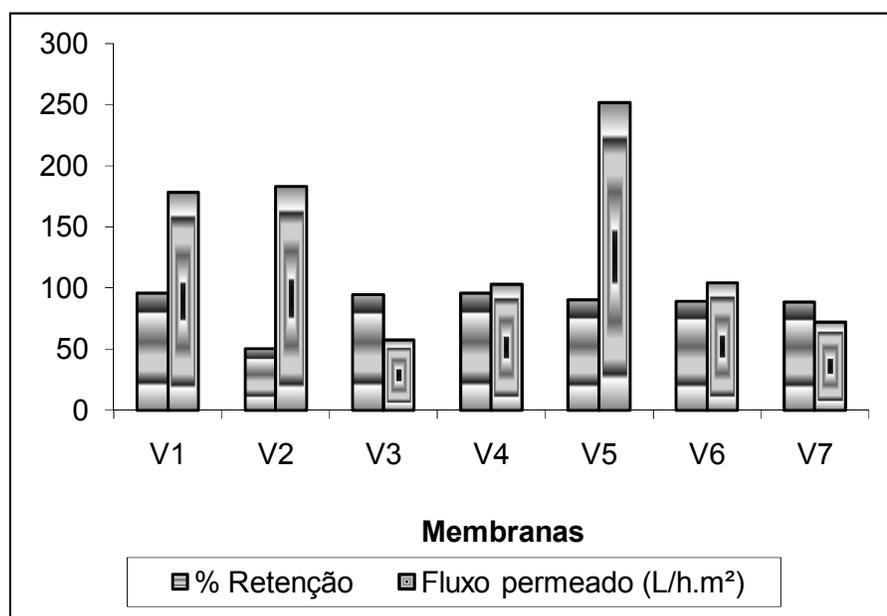


Figura 5.3 – Fluxo permeado médio e retenção da enzima a 25°C e pressão de 4 bar para as diferentes membranas

Pela Figura 5.3 verifica-se que houve uma maior variação no fluxo permeado (58 a 250 L.h⁻¹.m⁻²) do que no percentual de retenção da enzima Lactozym (50 a 96%) para as diferentes membranas testadas. Este comportamento funcional das membranas pode ser atribuído às diferenças nos seus pontos de corte em razão das diferentes concentrações e do tipo de polímero utilizado nas soluções poliméricas para a

preparação das membranas. Observa-se, também, que não houve uma relação entre fluxo permeado e retenção da enzima. À exceção da membrana V2, todas apresentaram valores importantes de retenção da enzima (88 a 96%). A membrana V5 apresentou o melhor desempenho, quando se considera, conjuntamente, fluxo permeado e retenção da enzima. Estas características são desejáveis em uma membrana a ser utilizada em um reator a membrana, ou seja, a enzima permanecerá no reator, ao mesmo tempo em que se obtém bom fluxo de material hidrolisado, neste caso, a glicose e galactose.

5.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A ocorrência dos fenômenos de colmatagem e “*fouling*” diminui a permeabilidade da membrana através da formação de uma camada superficial de gel sobre a pele filtrante da membrana (colmatagem) ou através da diminuição do diâmetro dos poros (*fouling*), impedindo a passagem de solutos de massa molar elevada.

Para confirmar esta hipótese, e verificar se ocorria ou não interações entre a enzima Maxilact e a membrana, foi realizada a Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, em três membranas utilizadas nos ensaios (membrana com 14% de PVDF). A primeira membrana foi analisada antes de ser realizado qualquer teste, isto é, uma membrana nova, sem uso, enquanto que a segunda membrana foi submersa em uma solução enzimática a $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e a terceira membrana foi utilizada em um ensaio de ultrafiltração com a mesma solução enzimática.

Na Figura 5.4 são apresentados os espectros de FTIR para as três membranas. A região do espectro analisada está compreendida entre os números de comprimento de onda de 1100 a 1800 cm^{-1} , pois a absorbância dos principais radicais do PVDF (C - F) e das proteínas (radical NH^+), encontra-se nesta região.

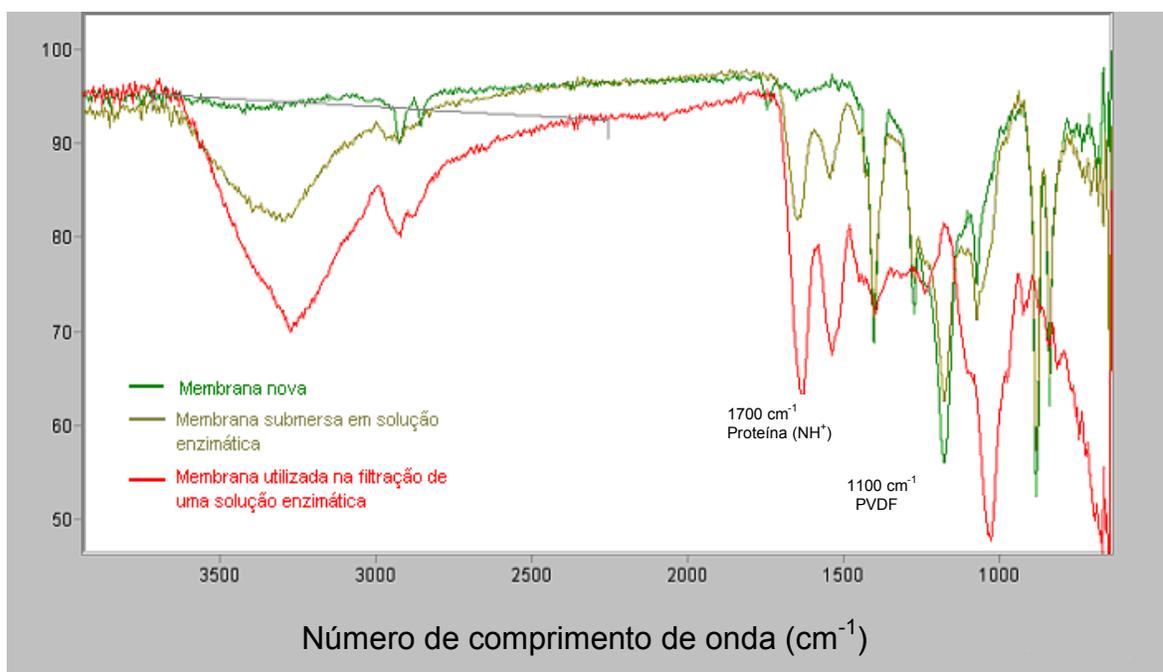


Figura 5.4 – Espectro de FTIR da membrana nova, da membrana submersa em solução enzimática e da membrana utilizada na filtração de uma solução enzimática.

O pico correspondente à região de 1700 cm^{-1} é decorrente da vibração do radical NH^+ da proteína adsorvida na superfície da membrana possivelmente com o flúor, pois as proteínas têm uma forte afinidade por superfícies hidrofóbicas, como é o caso da membrana de PVDF.

A análise da Figura 5.4 demonstra que durante a utilização da membrana na ultrafiltração da solução enzimática ocorre uma ligação em nível estrutural entre os polímeros formadores da membrana e a enzima, o que provoca modificação da análise do espectro FTIR, aparecendo uma banda referente à proteína (radical NH^+ da lactase) na membrana utilizada. A ocorrência desta interação diminui a permeabilidade da membrana através da diminuição do diâmetro efetivo dos poros, o que provoca a formação de uma camada superficial de gel sobre a pele filtrante da membrana, impedindo a passagem de solutos de massa molar elevada.

5.6 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Lactozym 3000

5.6.1 Influência da concentração de enzima

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de condições ótimas de temperatura, pH e concentração de enzima. Estas condições ótimas influenciam diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade da reação e, por consequência, a conversão do substrato em produtos. Em função disto, o conhecimento da faixa de atividade ótima para cada enzima é fundamental para otimização dos processos envolvendo reações enzimáticas.

Para determinação da concentração ótima da enzima Lactozym foram realizados experimentos, fora do reator (em *shaker*), a diversas concentrações de enzima, conforme especificado na Tabela 4.3.

A Figura 5.5 mostra o percentual de hidrólise obtido nos ensaios com diferentes concentrações de enzima no permeado com e sem peptonas.

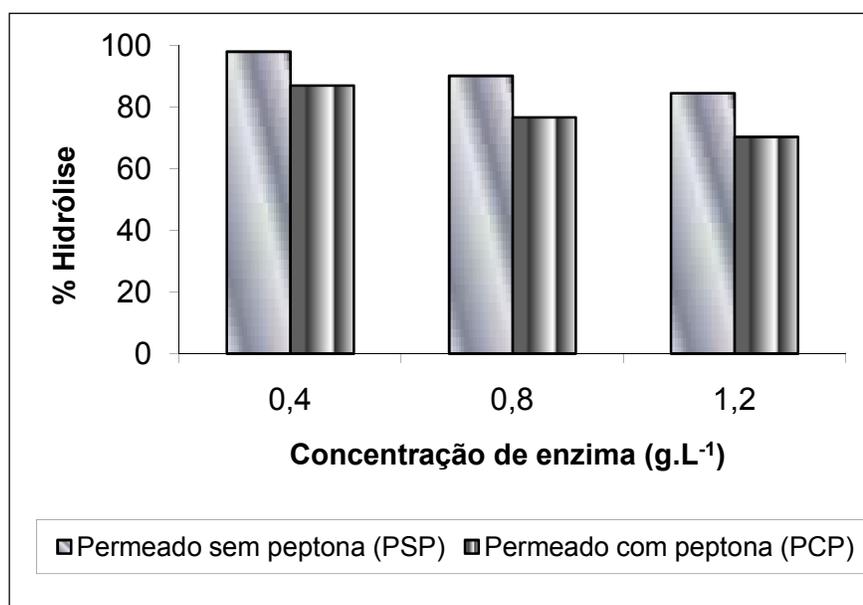


Figura 5.5 – Hidrólise da lactose no permeado com e sem peptonas em diferentes concentrações de enzima (temperatura 40°C, pH 6,6 e agitação de 200 min⁻¹)

Os resultados apresentados na Figura 5.5 mostram que o percentual de hidrólise foi maior para todos os PSP e que o maior percentual de hidrólise foi alcançado com a enzima numa concentração de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, atingindo-se 98% de hidrólise. Em trabalho realizado por Carminatti (2001), se obteve uma hidrólise de 90% utilizando-se a mesma enzima numa concentração de $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ à temperatura de 40°C e pH 6,0.

Ainda pela análise dos dados apresentados na Figura 5.6, observa-se que existe uma redução significativa no percentual de hidrólise quando foram utilizadas maiores concentrações da enzima. Obón et al. (2000), verificaram que o aumento da concentração de enzima solúvel não resulta no aumento no percentual de hidrólise da lactose. Estes autores estudaram a hidrólise da lactose do leite em batelada usando $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ da lactase proveniente do *K. lactis* com pH 7,0.

Em relação ao efeito das peptonas na hidrólise da lactose, conforme já observado, verifica-se que houve uma diferença entre os permeados – sem e com peptona. As peptonas são constituídas por unidades de aminoácidos denominados polipeptídios que não apresentam número suficiente de aminoácidos para serem consideradas proteínas. Às vezes são denominadas apenas como “pedaços de proteínas”. A instabilidade física destes compostos está relacionada à temperatura e pH. Normalmente quando se aquece o permeado às temperaturas próximas de 85°C , ocorre uma coagulação das peptonas, seguida de precipitação. Elas podem, então, ser eliminadas através de centrifugação, como feito neste trabalho.

A princípio, os resultados obtidos são insuficientes para se afirmar se este menor percentual de hidrólise, na presença de peptonas, está associado à interferência negativa destes compostos sobre a enzima, reduzindo a sua atividade catalítica, ou se eles interferem no método utilizado para determinação da glicose, produto da hidrólise. Até esta data, não se encontrou na literatura nenhuma investigação a respeito do efeito das peptonas na hidrólise da lactose. Entretanto, neste trabalho, uma maior investigação foi feita e será apresentada nos itens 5.7 e 5.8.

5.6.2 Influência da temperatura e do pH

Para determinar os intervalos de temperatura e de pH ótimos para a atividade da enzima Lactozym, foram realizados ensaios de hidrólise, cujas condições foram apresentadas na Tabela 4.3.

A Tabela 5.1 apresenta os percentuais de hidrólise obtidos nos ensaios realizados. Foi utilizada uma concentração de enzima de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ nestes ensaios.

Tabela 5.1 – Influência da temperatura, pH e das peptonas na hidrólise da lactose no permeado com e sem peptonas.

% Hidrólise						
37°C			40°C		43°C	
pH	PCP	PSP	PCP	PSP	PCP	PSP
6,4	91,10	94,09	90,18	92,25	54,29	57,51
6,6	71,08	76,14	83,05	95,01	45,78	60,27
6,8	76,37	92,94	96,62	98,46	47,16	61,19

A análise dos dados da Tabela 5.1 confirma aqueles obtidos nos ensaios anteriores onde houve maior hidrólise da lactose no permeado sem peptonas. Uma análise mais detalhada mostra, ainda, que a hidrólise da lactose foi maior no permeado sem peptona para os três valores de pH e temperatura testados. Ressalte-se que, à exceção da temperatura de 40°C e pH 6.8, ocorreu uma maior diferença entre a hidrólise da lactose nos permeados com e sem peptona, com o aumento do pH. Observa-se, também, que a partir de 40°C, um aumento da temperatura, resultou num decréscimo importante na hidrólise da lactose, principalmente a pHs mais altos. Entretanto, constata-se que a maior taxa de hidrólise ocorreu a 40°C, quando se utilizou

o pH 6,8, tanto para o permeado com e sem peptonas. Estas variações na hidrólise da lactose, podem ser devidas à sensibilidade das enzimas às alterações, mesmo pequenas, de temperatura e pH.

Roy e Gupta (2003), testaram soluções a diferentes pHs para estudar a ação catalítica da lactase (*K. fragilis*) (com concentração de 85 U.mL⁻¹), utilizando-se tampão acetato e tampão fosfato, em reator a membrana. Foram obtidos melhores resultados quando se utilizou o tampão fosfato, em relação à estabilidade e ação da enzima, a pH 6,5 com hidrólise perto de 100%. Entretanto, quando não se utilizou o reator a membrana, conseguiu-se hidrólise inferior a 85%, nas mesmas condições operacionais.

Zhou e Chen (2001), também estudaram os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade catalítica da β -galactosidase imobilizada, proveniente do *K. lactis*. Variou-se a temperatura entre 30 e 55°C, mantendo-se o pH 6,6 e a concentração de enzima em 71,55 mg.L⁻¹. Pequenas diferenças foram obtidas. Para atividade da enzima livre, alcançou-se uma hidrólise de lactose máxima de 55% à 40°C, enquanto para a enzima imobilizada a hidrólise atingiu 58% à 50°C.

O efeito do pH na faixa entre 5,5 a 8,0 e temperatura de 37°C, utilizando-se a mesma enzima e concentração, também foi estudado por estes mesmos pesquisadores. Os melhores resultados de hidrólise, 65% e 72%, foram obtidos a pH 6,6 com a enzima livre e pH 7,5, com a enzima imobilizada, respectivamente.

5.7 Influência das peptonas na hidrólise da lactose e no fluxo permeado médio no reator com fluxo perpendicular, em função do tempo de filtração.

Foi realizada hidrólise da lactose no permeado sem peptona e com peptona para verificar se estes compostos influenciam, além da hidrólise da lactose, no comportamento do fluxo permeado, em função do tempo de filtração. Os resultados são mostrados na Figura 5.6.

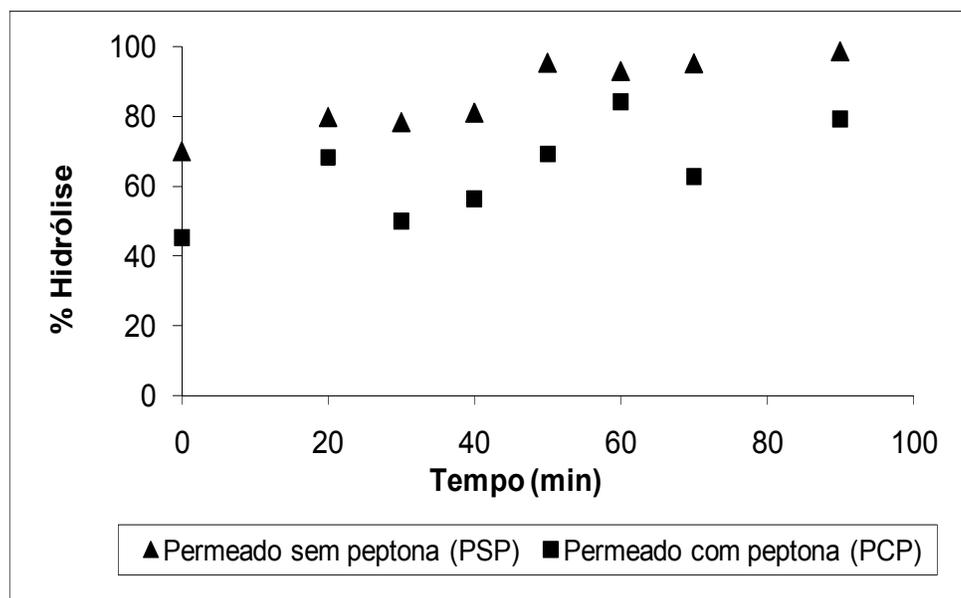


Figura 5.6 - Influência das peptonas na hidrólise da lactose (temperatura 40°C, pH 6,8, concentração de enzima de 1 g.L⁻¹, pressão de 2 bar e agitação de 200 min⁻¹).

Como esperado, a hidrólise no permeado sem peptona foi maior durante todo o tempo de operação do reator a membrana. A partir destes resultados, verifica-se que, pelo menos no intervalo de tempo e nas condições operacionais utilizadas no reator, não houve também uma variação muito acentuada na taxa de hidrólise com o tempo de operação do reator. Ou seja, a intensidade do efeito adverso das peptonas sobre a ação da enzima é praticamente o mesmo independentemente do tempo de hidrólise, portanto, indiferente da concentração de lactose e glicose presentes na solução.

Fluxos dos permeados com e sem peptonas, durante a operação do reator a membrana, são mostrados na Figura 5.7.

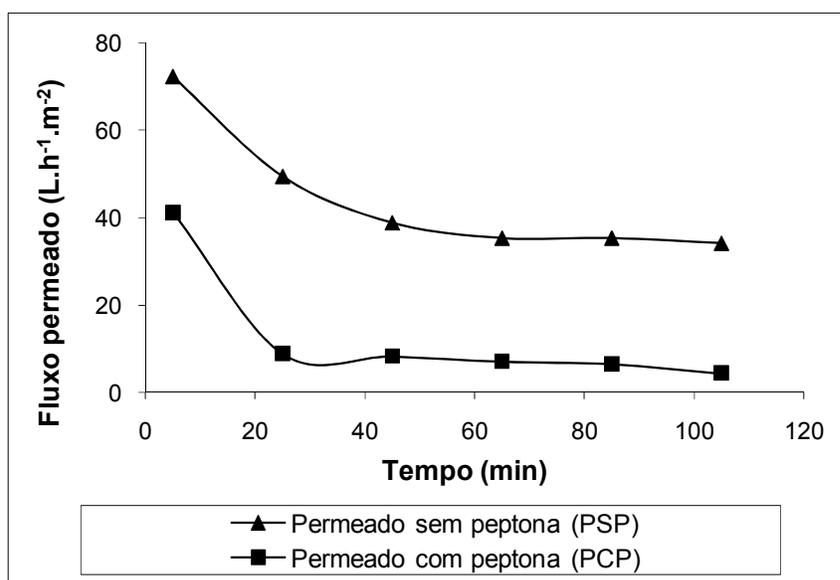


Figura 5.7 - Efeito das peptonas no fluxo permeado (temperatura 40°C, pH 6,8, concentração de enzima de 1 g.L⁻¹, pressão de 2 bar e agitação de 200 min⁻¹) em membrana com 12% de PES.

A partir da Figura 5.7, observa-se um comportamento semelhante entre as curvas de fluxo para os dois permeados através da membrana com 12% de PES. Houve uma redução na taxa de fluxo para ambos os permeados com uma tendência à estabilização após 50 minutos de filtração. Este comportamento das curvas de fluxo é característico num sistema de filtração. No início do processo, devido à camada de polarização que se forma junto à superfície da membrana, nos primeiros instantes da filtração, ocorre a formação de um filme que leva a uma redução do fluxo permeado. Na seqüência, dependendo das condições operacionais, pode ocorrer um entupimento dos poros superficiais com uma queda maior no fluxo. Depois ocorre uma estabilização neste fluxo ou uma queda muito lenta com o tempo de filtração. Ainda, pela Figura 5.8, verifica-se um maior fluxo para o permeado sem peptona, indicando que estes compostos levam a um entupimento gradual dos poros da membrana. A diferença entre os fluxos foi tão acentuada que nos experimentos seguintes optou-se por utilizar sempre o permeado sem peptona. Além de se obter maior percentual de hidrólise da

lactose, obtêm-se maiores fluxos permeados. Vale ressaltar que, num processo de separação com membranas, atingindo o nível de retenção desejado, o desempenho do processo passa a ser avaliado principalmente pelo fluxo permeado. Quanto maior o fluxo permeado menor o tempo de processo e/ou menor a área de filtração necessária para processamento de certo volume de solução.

5.8 Influência das peptonas na hidrólise da lactose e no método de determinação de glicose

Os resultados destes ensaios são mostrados na Figura 5.8. Observa-se que as diferenças entre os percentuais de hidrólise da lactose foram devidas não à interferência das peptonas sobre a enzima e sim no método utilizado na determinação de glicose. Foram observadas diferenças de até 20% nos resultados entre os dois ensaios. Na realidade, os percentuais de hidrólise são os mesmos, na presença ou ausência das peptonas. As diferenças encontradas são devidas à ação destas peptonas sobre os reagentes utilizados na determinação da glicose. Fugiria aos objetivos deste trabalho uma investigação mais detalhada para se determinar de que forma ocorre esta interação e como evitá-la.

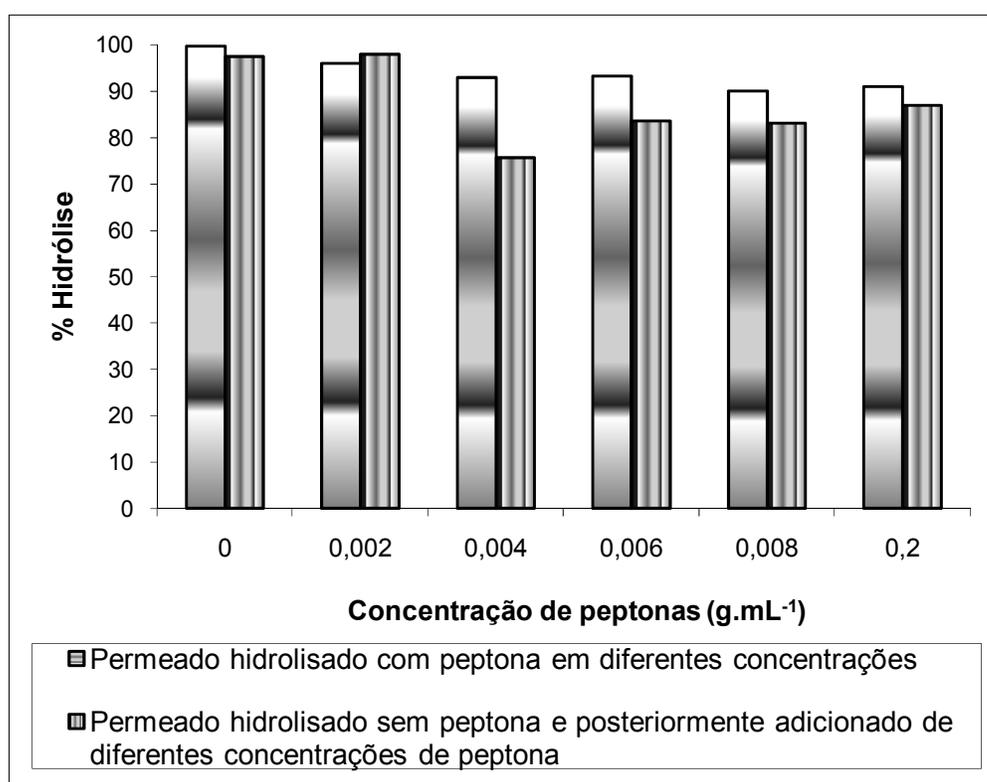


Figura 5.8 – Percentual de hidrólise no permeado hidrolisado com diferentes concentrações de peptona e no permeado sem peptona com subsequente adição de peptona após a hidrólise (temperatura de 35°C, pH 6,8, concentração de enzima de 0,4 g.L⁻¹ e agitação de 200 min⁻¹).

5.9 Determinação das condições ótimas para atividade da enzima Maxilact fora do reator e na célula de ultrafiltração

5.9.1 Fora do reator (em *shaker*)

5.9.1.1 Influência da temperatura

A Figura 5.9 mostra os percentuais de hidrólise obtidos a diferentes concentrações de enzima e a diferentes temperaturas.

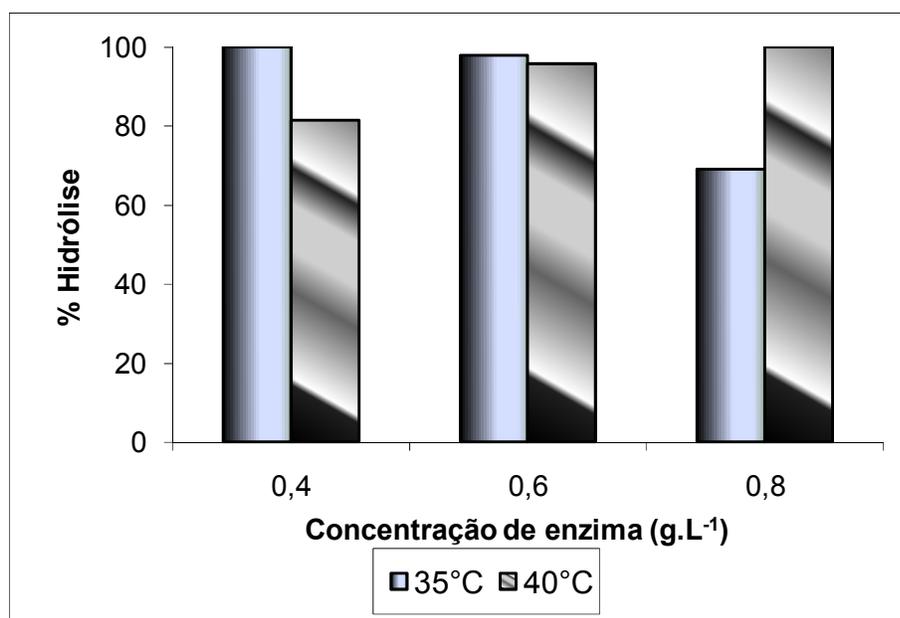


Figura 5.9 - Percentual de hidrólise para diferentes concentrações de enzima Maxilact à 35°C e 40°C e pH 6,8 com agitação a 200 min⁻¹ no permeado sem peptona (PSP).

Observa-se que à temperatura de 40°C, maiores concentrações da enzima levaram a uma maior hidrólise da lactose, ocorrendo o contrário quando se trabalhou a 35°C. Os resultados também mostram que um aumento na concentração da enzima Maxilact não leva, necessariamente, a um aumento no percentual de hidrólise da lactose.

Trabalho realizado por Thomet et al. (2005), mostrou a possibilidade de obtenção de um xarope de glicose, após hidrólise de 91,3% da lactose utilizando-se um processo em batelada. Neste trabalho foi utilizada a mesma enzima numa concentração de 1 g.L⁻¹, pH 6,6 e temperatura de 37°C.

Özbek et al. (2006), estudaram também a hidrólise da lactose com lactase produzida por *K. marxianus* em batelada à temperatura de 37°C, pH 6,7 e concentração de enzima de 1 mL.L⁻¹ o que resultou num grau de hidrólise de 83,7%.

5.9.1.2 Influência da concentração de enzima

Para se conhecer o comportamento da taxa de hidrólise em função do tempo de processamento, realizou-se um experimento fora do reator, cujos resultados são apresentados na Figura 5.10. Fica evidenciado que, indiferente da concentração de enzima utilizada, ocorre uma alta taxa de hidrólise nos primeiros 30 minutos de processo, levando a percentuais de hidrólise variando entre 90 e 98%.

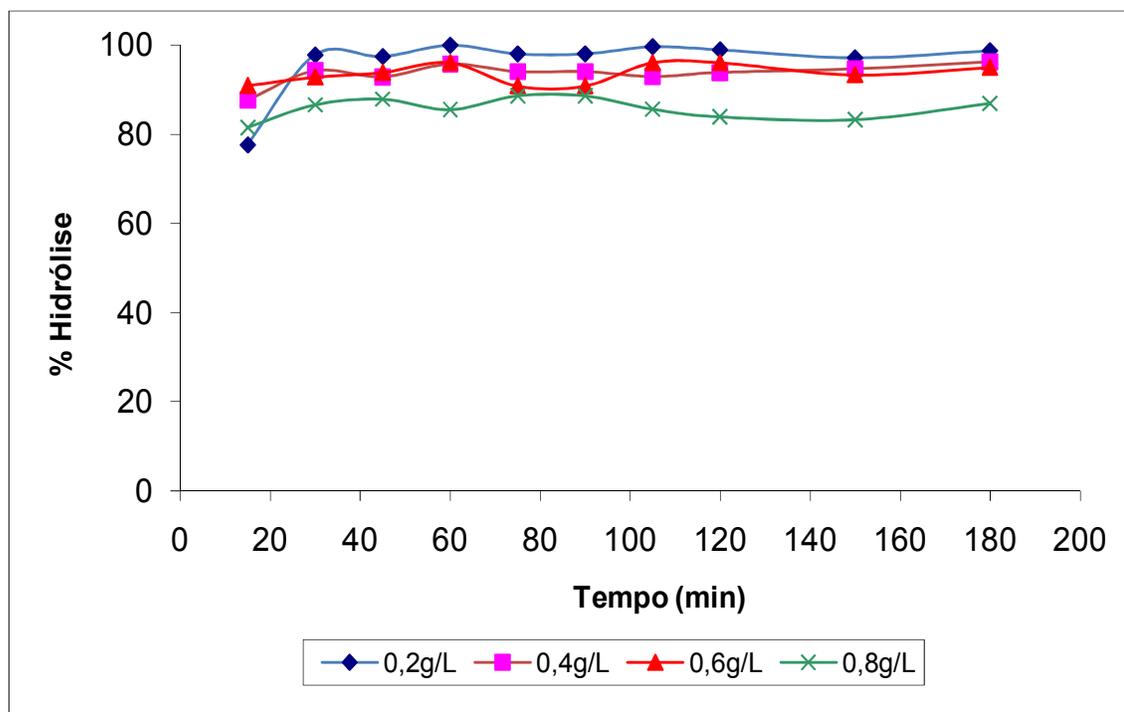


Figura 5.10 - Influência das diferentes concentrações da enzima Maxilact no permeado sem peptona PSP (temperatura de 35°C, pH 6,8 e 200 min⁻¹).

As variações ocorridas quando se utilizaram maiores concentrações da enzima, principalmente 0,8g.L⁻¹, podem ser atribuídas ao fato das reações enzimáticas serem fortemente dependentes de condições ótimas de concentração de enzima. Como já verificado em outros trabalhos, já citados, o aumento da concentração de enzima não resulta num maior percentual de hidrólise.

Em razão dos resultados obtidos, nos trabalhos subsequentes, optou-se por utilizar a enzima Maxilact na concentração de 0,2 g.L⁻¹

5.9.2 Célula de ultrafiltração

5.9.2.1 Influência da concentração de enzima Maxilact

As Figuras 5.11 e 5.12 mostram os percentuais de hidrólise da lactose no permeado e do retentado, em função do tempo, utilizando-se diferentes concentrações de enzima, conforme especificado na Tabela 4.4.

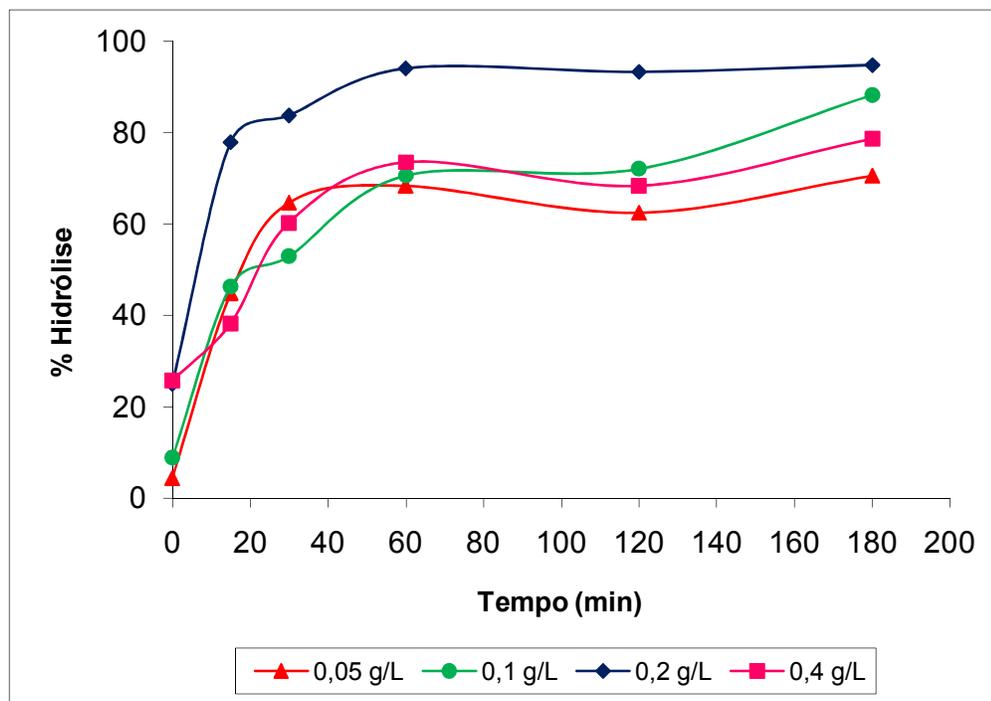


Figura 5.11 – Percentuais de hidrólise da lactose no permeado utilizando-se diferentes concentrações de enzima (temperatura 35°C, pH 6,8 e agitação de 200 min⁻¹), em função do tempo de processo.

Como observado na Figura 5.11, o maior percentual de hidrólise da lactose (95%) foi alcançado quando se utilizou uma concentração de enzima Maxilact de 0,2 g.L⁻¹. Verifica-se, também, que houve uma maior taxa de hidrólise nos primeiros 50 minutos e na seqüência, ocorreu uma tendência à estabilização.

Trabalho realizado por Novalin et al. (2005), mostrou que é possível utilizando um bioreator a membrana de fibra oca, para hidrolisar lactose presente no soro de leite

desnatado, em até 78%, utilizando-se uma concentração de 120 U.mL^{-1} de β -galactosidase (lactase) *K. lactis* à temperatura de 25°C .

Da mesma forma que no experimento anterior, determinaram-se os percentuais de hidrólise da lactose presente no retentado (dentro do reator) para as diferentes concentrações de enzima, em função do tempo, conforme mostrado na Figura 5.12.

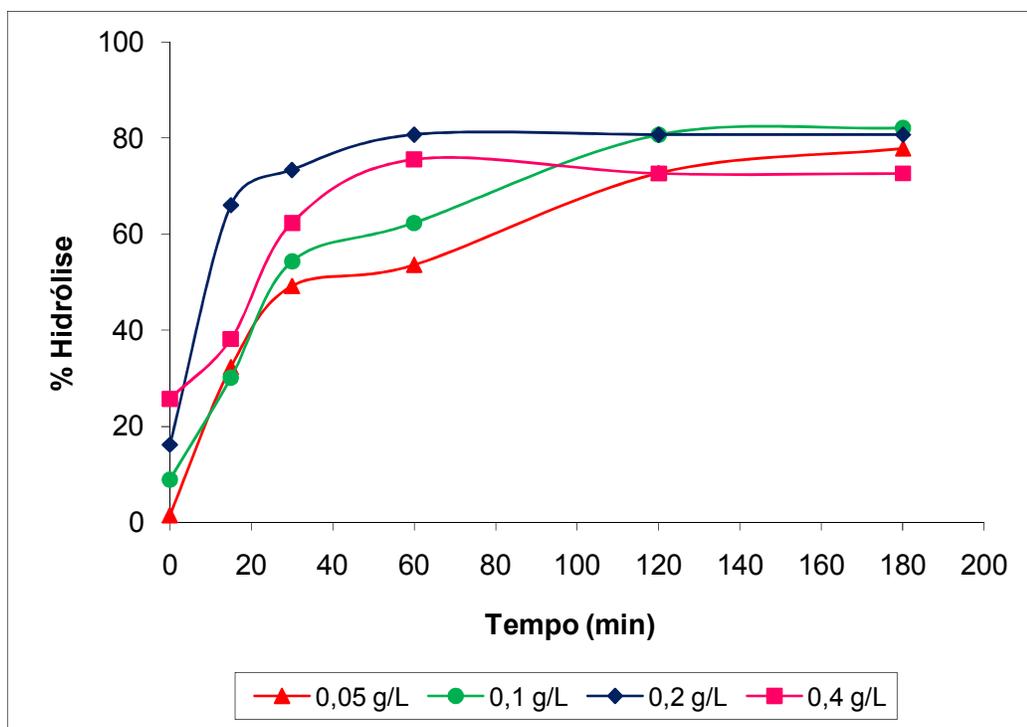


Figura 5.12 – Percentuais de hidrólise da lactose presente no retentado para diferentes concentrações de enzima (temperatura 35°C , pH 6,8 e agitação de 200 min^{-1}), em função do tempo de processo.

Interessante observar que foram alcançados maiores percentuais de hidrólise da lactose, tanto no permeado (Figura 5.11) quanto no retentado (Figura 5.12), quando foi utilizada uma concentração da enzima de $0,2\text{g.L}^{-1}$. Ressalte-se, ainda, que na concentração de $0,2\text{g.L}^{-1}$ de enzima, o percentual de hidrólise da lactose foi maior no permeado do que no concentrado. Este resultado pode ser atribuído às enzimas que ficam retidas na superfície das membranas e, como estão mais concentradas, aumenta a atividade catalítica quando a lactose não hidrolisada permeia a membrana. Como a

permeação é lenta, resulta em maior tempo de contato da lactose com as enzimas na superfície da membrana, o que aumenta ainda mais a taxa de hidrólise. A menor taxa de hidrólise no retentado também pode ser atribuída aos produtos formados na hidrólise (principalmente glicose e galactose) que inibem a ação da enzima, reduzindo sua atividade.

5.9.2.2 Influência da temperatura na hidrólise da lactose no permeado e no retentado

Para determinar a faixa de temperatura ótima para ação catalítica da enzima Maxilact, foram realizados ensaios, conforme especificado na Tabela 4.4. A Figura 5.13 apresenta os resultados obtidos onde se verifica que maior percentual de hidrólise foi obtido à temperatura de 35°C, atingindo valores da ordem de 95% após 60 minutos de operação do reator a membrana.

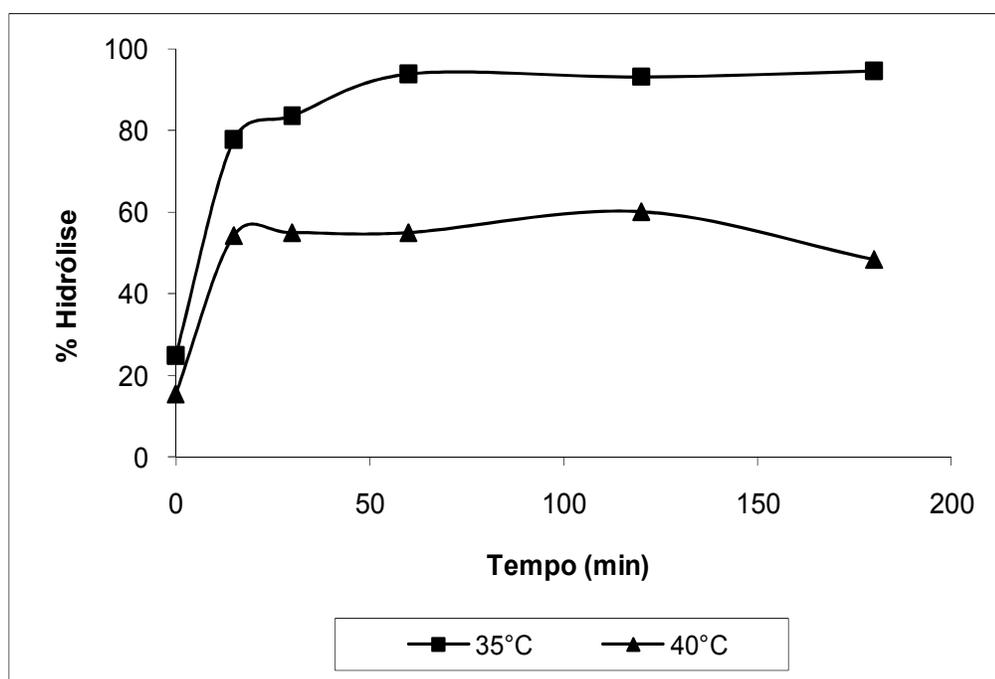


Figura 5.13 – Percentual de hidrólise da lactose no permeado em função do tempo e da temperatura (pH 6,8, concentração de enzima 0,2 g.L⁻¹ e agitação de 200 min⁻¹).

A Figura 5.14 mostra os valores de hidrólise no retentado em função do tempo e à diferentes temperaturas.

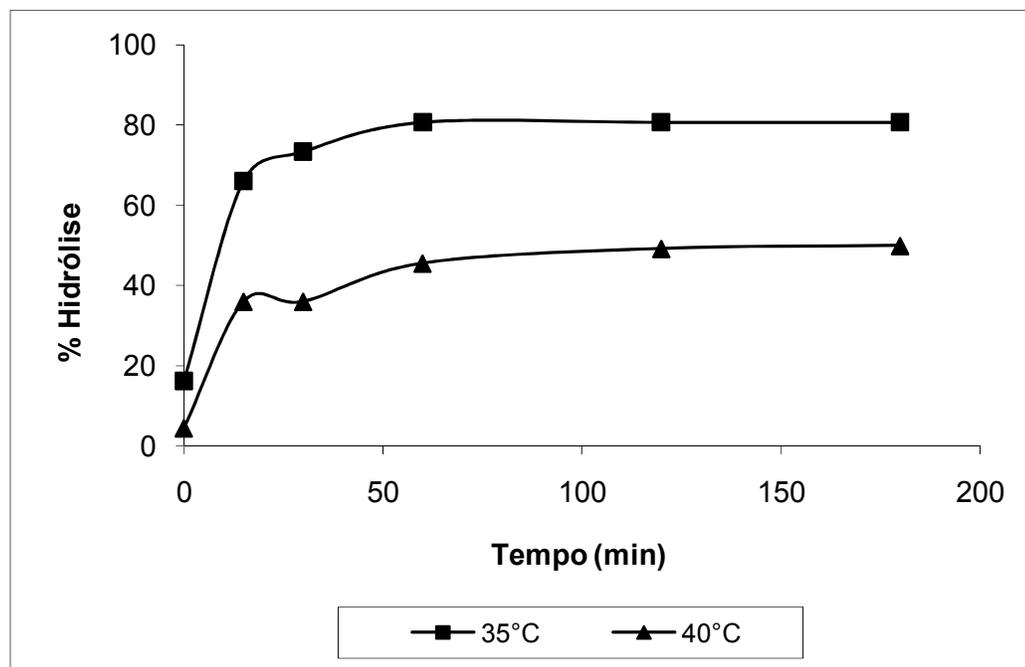


Figura 5.14 – Percentual de hidrólise da lactose no retentado em função do tempo e da temperatura (pH 6,8, concentração de enzima $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e agitação de 200 min^{-1}).

Estes resultados reforçam aqueles do experimento anterior (Figura 5.11) onde houve uma maior hidrólise da lactose no permeado em relação ao concentrado, pelas mesmas razões expostas anteriormente. Da mesma forma que no permeado, a temperatura de 35°C foi a que resultou em maior atividade da enzima Maxilact, levando a uma hidrólise de lactose no retentado de 83% após 60 minutos de operação do reator a membrana.

5.10 Teste de permeação da enzima e desempenho do sistema

Os resultados mostrados na Figura 5.15 evidenciam que a enzima Maxilact presente no retentado do reator, não permeia a membrana. Isto garante que não haverá perda de enzima do reator, resultando em maiores taxas de hidrólise. Também podem

ser observados, na mesma figura, os resultados para hidrólise adicionando-se maiores quantidades de permeado para a mesma quantidade de enzima, onde B1, B2, B3 e B4 representam as bateladas onde foram adicionadas maiores quantidades de permeado (cerca de 50 mL).

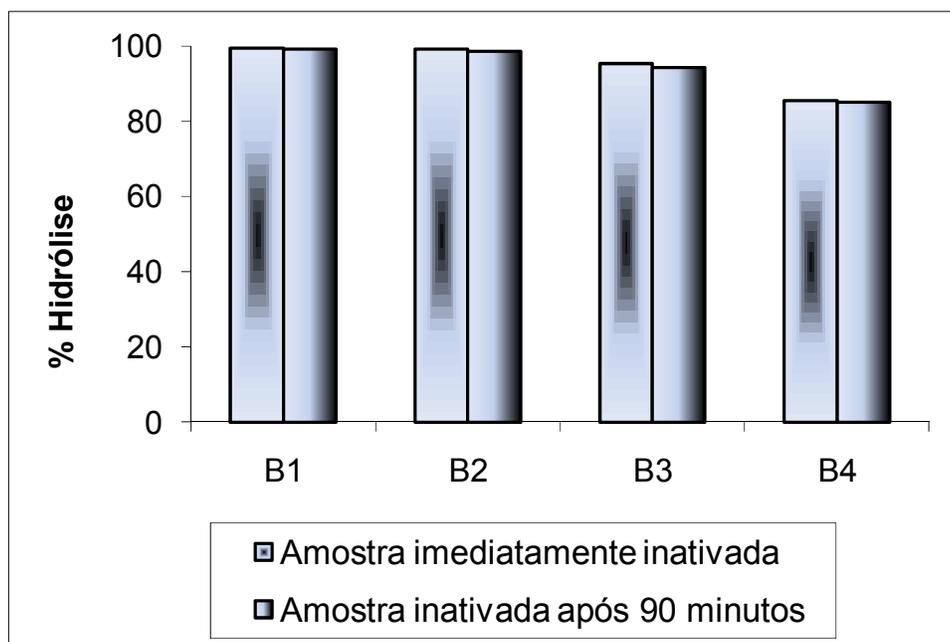


Figura 5.15 – Percentual de hidrólise da lactose na amostra imediatamente inativada e na amostra inativada após 90 minutos (temperatura de 35°C, pH 6,8, concentração de enzima 0,2 g.L⁻¹).

Este justamente é o princípio deste reator a membrana, onde se pode hidrolisar maior quantidade de substrato utilizando-se uma mesma quantidade de enzima. Isto se traduz em desempenho do sistema e interessante do ponto de vista econômico, principalmente pelo elevado preço das enzimas comercialmente disponíveis.

5.11 Atividade da enzima adsorvida na membrana

Como as enzimas normalmente apresentam interações com superfícies hidrofóbicas, característica de muitas membranas poliméricas, é necessário pesquisar

se esta interação pode levar a uma perda de atividade catalítica da enzima adsorvida. Isto pode ocorrer devido à possibilidade da enzima utilizar o seu radical ativo (sítio ativo) nesta interação e perder parte importante de sua atividade. Além disto, é necessário verificar se esta imobilização não resultará também na restrição de sua atividade catalítica.

Na Figura 5.16 são apresentados os percentuais de hidrólise da lactose no filtrado e no retentado e, também, a hidrólise nestas mesmas soluções após limpeza da membrana.

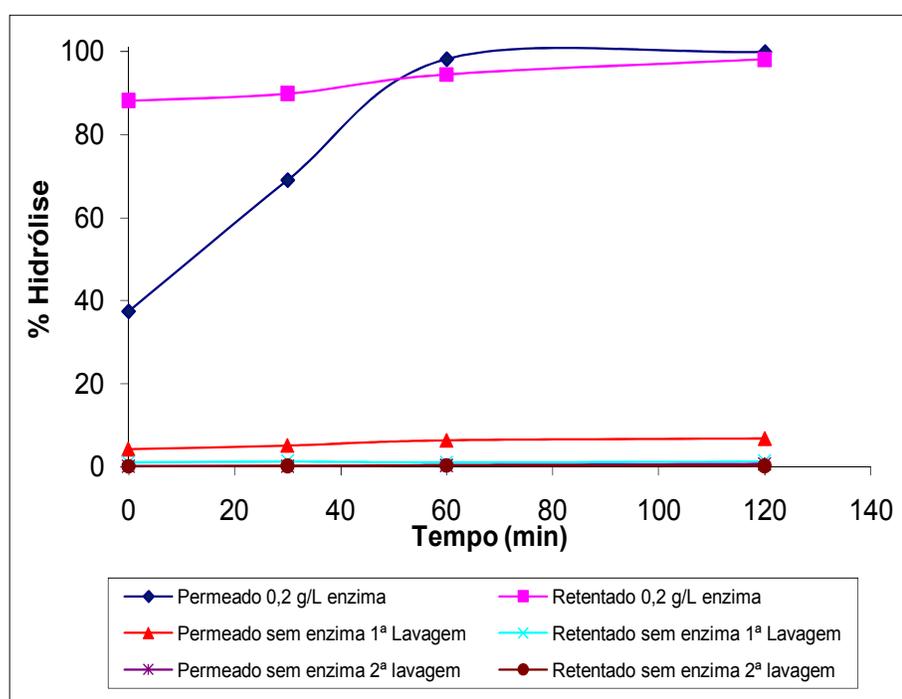


Figura 5.16 – Percentuais de hidrólise da lactose no filtrado e no retentado, utilizando-se uma concentração de enzima de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, temperatura de 35°C , pH 6,8 e 200 min^{-1} .

5.12 Utilização do equipamento piloto com fluxo tangencial

5.12.1 Influência da pressão

Para verificar se a pressão, temperatura, velocidade tangencial e a concentração de enzima influenciam no fluxo médio permeado do reator com fluxo tangencial foram realizados alguns ensaios preliminares com água destilada, conforme Tabela 4.5.

A Figura 5.17 mostra a influência da pressão no fluxo médio permeado da água utilizando-se o equipamento piloto com fluxo tangencial.

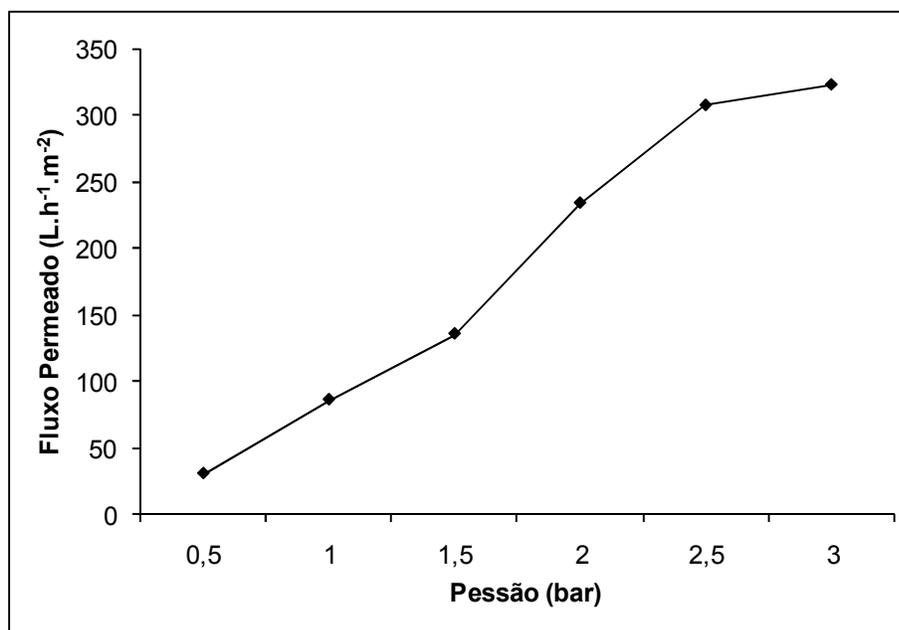


Figura 5.17 – Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada (temperatura de 20°C e velocidade tangencial de 0,9 m.s⁻¹).

A Figura 5.17 nos mostra que a partir da pressão de 2,5 bar o fluxo médio permeado começa a estabilizar.

O comportamento da curva de fluxo é característica de um sistema de filtração com membranas para água pura. Num primeiro momento o fluxo é proporcional à pressão. A partir de uma determinada pressão, ocorre uma estabilização do fluxo por razões diversas. As principais são o limite de permeabilidade característico de cada membrana e a compactação que é inerente às membranas poliméricas. A compactação reduz artificialmente a sua porosidade, levando, inevitavelmente a uma redução de fluxo permeado.

Butylina et al. (2006), estudaram a influência da pressão no fluxo permeado com água utilizando membrana de ultrafiltração de celulose, com ponto de corte de 10 kDa, velocidade tangencial de 2 m.s^{-1} e temperatura de 50°C . Estes autores obtiveram um fluxo permeado máximo, de $161 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, na pressão de 3 bar.

5.12.2 Influência da temperatura

A Figura 5.18 mostra a influência da temperatura no fluxo permeado médio no reator com fluxo tangencial.

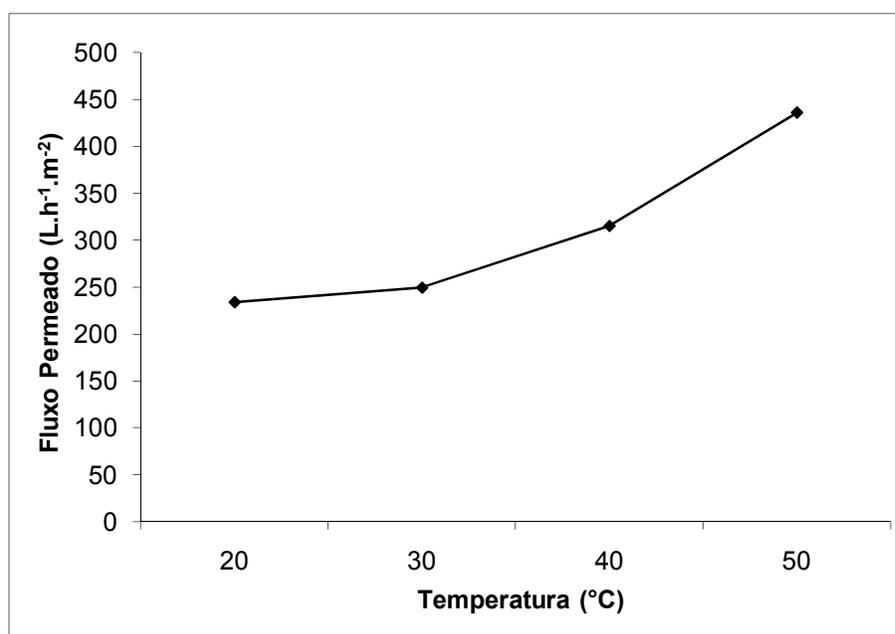


Figura 5.18 – Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada, em função da temperatura (pressão de 2 bar e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$).

O resultado mostra uma proporcionalidade direta entre a temperatura e o fluxo permeado. O aumento da temperatura, além de reduzir a viscosidade de uma solução, aumenta a sua difusividade, neste caso através da membrana. É preciso o estabelecimento de temperaturas adequadas, considerando, principalmente, a termosensibilidade dos compostos presentes na solução, os limites de resistência da membrana ao calor, principalmente as poliméricas e, finalmente, o aspecto econômico.

5.12.3 Influência da velocidade tangencial

A velocidade tangencial também foi variada conforme Tabela 4.5. Na Figura 5.19 podem ser vistos os valores do fluxo permeado para diferentes velocidades tangenciais.

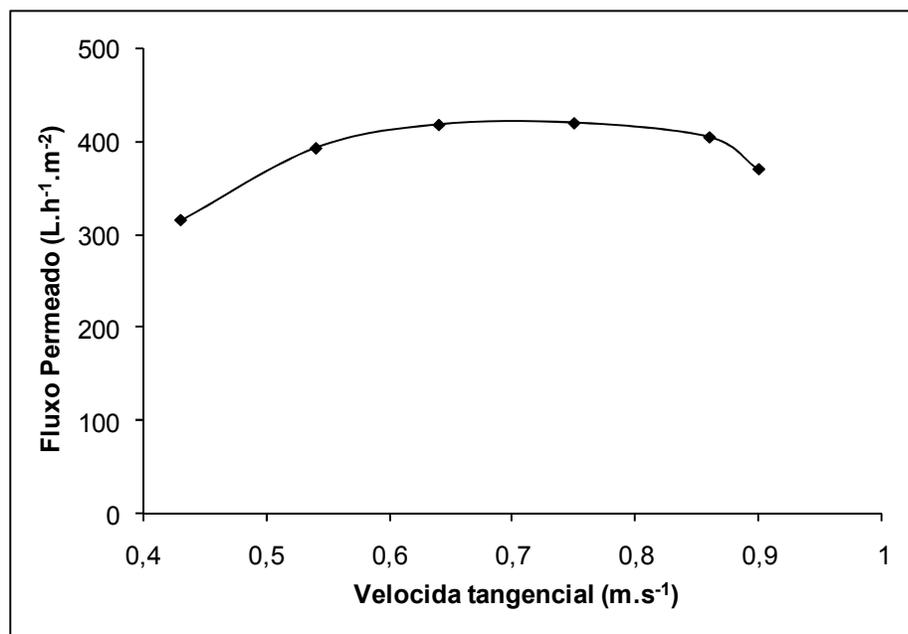


Figura 5.19 – Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água, em função da velocidade tangencial (temperatura de 40°C e pressão de 2 bar).

A velocidade tangencial de uma solução na superfície de uma membrana pode aumentar consideravelmente o fluxo permeado quando há solutos em suspensão ou trata-se de uma solução ou emulsão complexa. Altas velocidades tangenciais reduzem o efeito da camada de polarização e evita o acúmulo de partículas na superfície das membranas, evitando o entupimento. Neste caso, não houve diferenças importantes no fluxo permeado em função da velocidade tangencial, e por ter-se filtrado água destilada.

5.12.4 Influência da concentração de enzima

Soluções aquosas com diferentes concentrações de enzima, conforme informado na Tabela 4.5, foram filtradas no reator de fluxo tangencial. Os resultados são apresentados na Figura 5.20.

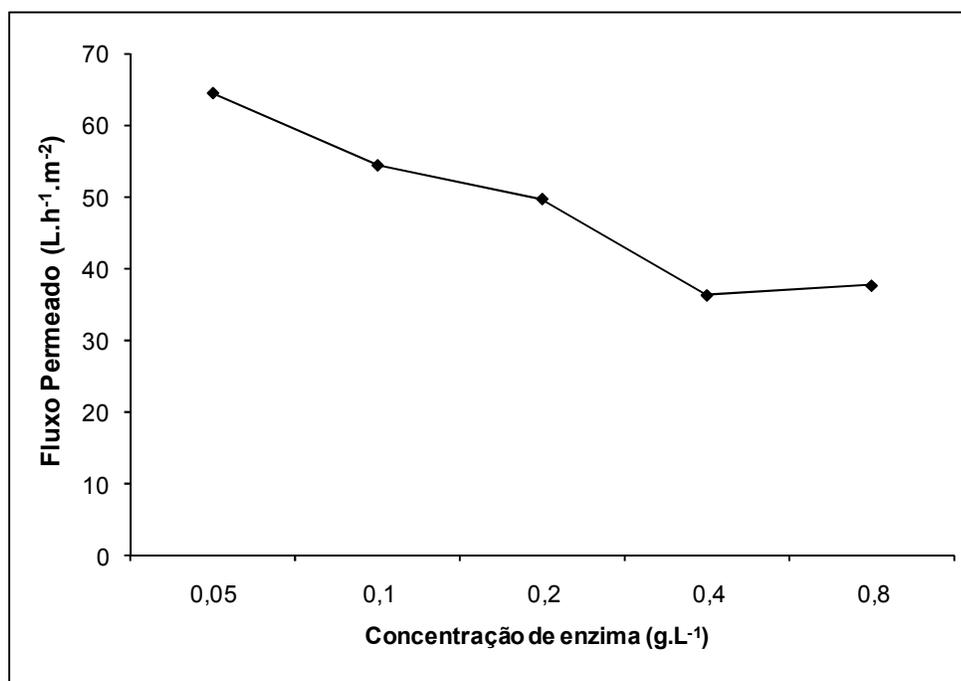


Figura 5.20 – Fluxo permeado médio no reator de fluxo tangencial com água destilada com diferentes concentrações de enzima (temperatura de 35°C, pressão de 2 bar e velocidade tangencial de 0,9 m.s⁻¹).

Pode-se verificar que maiores concentrações de enzima em solução, levam a uma redução importante no fluxo permeado. Como discutido anteriormente, o fluxo permeado é um dos parâmetros mais importantes para se verificar o desempenho de um sistema de filtração. Esta queda de fluxo, certamente está relacionada à retenção da enzima na superfície da membrana, pela formação de um filme que aumenta a força motriz necessária à filtração. Como a pressão, que é a força motriz neste caso específico, foi mantida constante, é natural que houvesse uma queda mais acentuada do fluxo permeado. Num sistema industrial é importante que se estabeleçam condições operacionais adequadas – pressão, temperatura e velocidade tangencial, além da escolha correta da membrana, para se evitar redução de fluxo que levará, inevitavelmente, a uma redução no desempenho global do reator.

5.12.5 Influência da pressão na filtração do permeado com peptona

A Figura 5.21 mostra a influência da pressão sobre o fluxo permeado durante filtração no reator a membrana com fluxo tangencial.

Quando se compara as curvas de fluxo das Figuras 5.21 e 5.17, fica evidente um menor fluxo para o permeado com peptona que contém ainda outros componentes do soro de queijo que ajudam a polarizar a membrana, com conseqüente redução de fluxo. Verifica-se, ainda, que não há uma proporcionalidade direta no fluxo permeado como acontece com a filtração da água (Figura 5.17). Uma maior pressão pode aumentar a colmatagem da membrana, ou seja, moléculas/partículas que não permeariam a menores pressões podem permear a maiores pressões. E dependendo do tamanho destas moléculas/partículas, em relação ao tamanho médio dos poros superficiais da membrana, elas podem colmatá-la rapidamente.

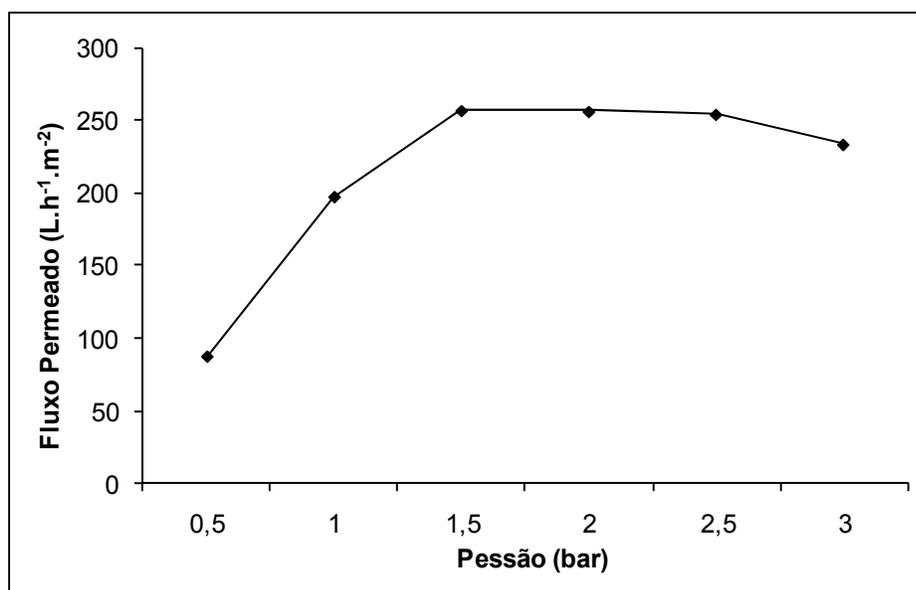


Figura 5.21 – Fluxo médio no reator de fluxo tangencial para o permeado com peptona a diferentes pressões (temperatura de 35°C e velocidade tangencial de 0,9 m.s⁻¹).

5.13 Índice de colmatagem

Para verificar o índice de colmatagem da membrana, filtrou-se água destilada antes e após a realização dos experimentos com permeado ou com solução de enzima. Através da equação 4.6 calculou-se o índice de colmatagem para cada experimento.

Índice de colmatagem do permeado

$$IC = 1 - \left(\frac{F_f}{F_i} \right)$$

$$IC = 1 - \left(\frac{81,83}{135,48} \right)$$

$$IC = 1 - (0,60)$$

$$IC \text{ permeado} = 0,4$$

Índice de colmatagem da enzima

$$IC = 1 - \left(\frac{F_f}{F_i} \right)$$

$$IC = 1 - \left(\frac{35,21}{234,07} \right)$$

$$IC = 1 - (0,15)$$

$$IC \text{ enzima} = 0,85$$

A colmatagem é caracterizada pela penetração, de pequenas moléculas ou partículas em suspensão, nos poros das membranas, ou seja, é o entupimento dos poros. Os mesmos podem ser completamente bloqueados ou efetivamente reduzidos em seus diâmetros.

Estes resultados demonstram que houve colmatagem, que é o “entupimento” dos poros da membrana, e nem formação da camada de gel, que normalmente prejudicam a eficiência das membranas, em relação ao fluxo permeado. Pelo menos isto não ocorreu no tempo de filtração utilizado.

5.14 Hidrólise em equipamento piloto de fluxo tangencial

Na figura 5.22 as curvas B, C e D, representam o grau de hidrólise em amostras retiradas, em intervalos regulares de tempo, da solução parcialmente hidrolisada após sua permeação pela membrana, onde não se verifica nenhuma atividade enzimática, mesmo mantendo-se estas amostras a 35°C, temperatura ótima para a atividade da enzima. A curva A, representa o grau de hidrólise da solução no reator de fluxo tangencial após a permeação pela membrana.

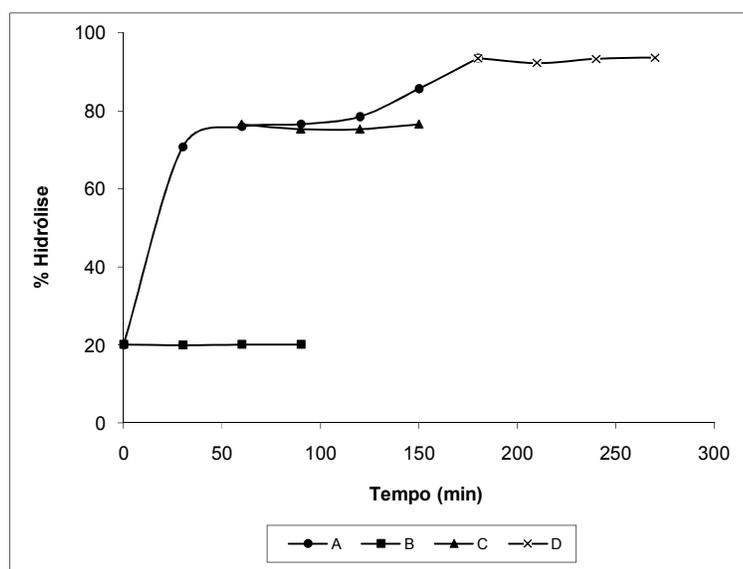


Figura 5.22 - Valores de hidrólise para o permeado sem peptona (PSP), com uma concentração de enzima de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, temperatura de 35°C , pH 6,8 e velocidade tangencial de $0,9 \text{ m.s}^{-1}$ em reator com fluxo tangencial.

1. Os resultados obtidos mostram que todas as membranas preparadas em laboratório foram capazes de reter, em percentuais distintos, a lactase, com considerável fluxo permeado com água destilada. À exceção da membrana V2 (16% PVDF), todas apresentaram valores importantes de retenção da enzima (88 a 96%). A membrana V5 (12% PES) apresentou o melhor desempenho, quando considerado, conjuntamente, fluxo permeado e a retenção da enzima.
2. Pela análise do espectro FTIR foi possível observar que ocorreu uma ligação em nível estrutural entre os polímeros formadores da membrana e a enzima quando utilizou-se ultrafiltração da solução enzimática. Este fato caracteriza a diminuição da permeabilidade da membrana.
3. Dentre os valores testados (37°C, 40°C e 43°C) a temperatura de 40°C teve maior influência na hidrólise da lactose. Em temperaturas menores, a hidrólise manteve-se praticamente constante, mas em temperaturas superiores a 40°C, a atividade da enzima foi fortemente reduzida, com conseqüente queda na taxa de hidrólise.
4. Para os valores testados, a concentração ótima de enzima para hidrólise da lactose do permeado foi de 0,4 g.L⁻¹ para a enzima Lactozym e 0,2 g.L⁻¹ para a enzima Maxilact.
5. Para hidrólise enzimática da lactose fora do reator (em *shaker*), utilizando-se a enzima Lactozym, o maior percentual de hidrólise foi de aproximadamente 100%, com as seguintes condições de operação: temperatura de 40°C, concentração de enzima de 0,4 g.L⁻¹ e pH 6,8. Para a enzima Maxilact, o maior percentual de hidrólise também foi de aproximadamente 100%, porém, com uma temperatura de 35°C e uma concentração de enzima de 0,2 g.L⁻¹ e pH 6,8.

6. A hidrólise enzimática realizada no reator a membrana com fluxo perpendicular foi de aproximadamente 100%, nas mesmas condições operacionais utilizadas para hidrólise fora do reator.
7. A eliminação das peptonas do soro fez aumentar o fluxo médio calculado em até 150%.
8. Os resultados mostraram que a membrana reteve totalmente a enzima no reator, alcançando-se até 95% de hidrólise da lactose em 90 minutos de processo, a temperatura de 35°C e pH 6,8. Também foi possível hidrolisar uma maior quantidade de lactose presente no permeado com a mesma quantidade de enzima.
9. Ficou evidenciado que a enzima adsorvida na superfície da membrana não apresentou atividade hidrolítica quando da filtração de substrato sem adição de enzima.
10. No estudo do equipamento piloto com fluxo tangencial, verificou-se que a concentração de enzima, pressão, velocidade tangencial e temperatura de processo apresentam grande influência no fluxo permeado.
11. Para os experimentos realizados em reator de fluxo tangencial, na temperatura de 35°C, concentração de enzima de 0,2 g.L⁻¹ e pH 6,8 foi obtido uma conversão de hidrólise de 95%.

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Investigar com maior profundidade a interferência das peptonas sobre a hidrólise da lactose e no método de quantificação da glicose.
2. Investigar as condições para imobilização da enzima em membrana, verificando a possibilidade de recuperar, simultaneamente, as proteínas do soro e hidrolisar a lactose.

REFERÊNCIAS

ALESSI, M. C. M. **Avaliação da hidrólise alcalina da gordura sobre a biodegradação anaerébia de soro de queijo.** (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005. 83p.

ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase *Saccharomyces cerevisiae*.** (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005. 110p.

BAILEY, J.E. e OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals.** 2 ed. New York, 1986.

BASSETTI, F.J. **Caracterização da invertase imobilizada em sílica de porosidade controlada e sua aplicação em reator de leito fixo e fluidizado.** (Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1995. 188p.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; MÉNDEZ, J.B.; SISO, M.I.G. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells **Enzyme and Microbial Technology.** v. 29, n. 8-9, p. 506-512. 2001.

BOWEN, W.R.; DONEVA, T.A.; YIN, H.B.; Atomic force microscopy studies of membrane—solute interactions (fouling). **Desalination.** v.146 n.1-3, p. 97-102. 2002.

BRINCK, J.; JÖNSSON, A. -S.; JÖNSSON, B.; LINDAU, J. Influence of pH on the adsorptive fouling of ultrafiltration membranes by fatty acid. **Journal of Membrane Science.** v. 164, n. 1-2, p. 187-194. 2000.

BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos alimentos.** 2 ed. rev. e atual. São Paulo: Livraria Varela, 1989. 223p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. In: _____. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**. v. 280, p. 418-426. 2006.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 66p.

CARRARA, C.R. e RUBIOLO, A.C. Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**. v. 31, n.3, p.243-248. 1996.

CAVILLE, D. e COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology applied Biochemistry**, v.22, p.55-64. 1995.

CAVALLIERI, A. L. F., **Influência da desnaturação térmica e do pH sobre as propriedades reológicas de proteínas do soro e sua compatibilidade termodinâmica com a xantana**. (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. 130 p.

COSTA, E.L. **Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados de soro de leite com atividade anti-hipertensiva**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. 115 p.

CURCIO, S.; CALABR`O, V.; IORIO G. A theoretical and experimental analysis of a membrane bioreactor performance in recycle configuration. **Journal of Membrane Science**. v. 273, n. 1-2, p. 129-142. 2006.

DEKKER, M.; MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. **Food Process Design**. New York, Cap. 10. 2003.

DUARTE, P. M. T. **Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos**. Braga. Dissertação (Mestrado) Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos, Universidade do Minho, 2005. 118p.

FARIZOGLU, B.; KESKINLER, B.; YILDIZ, E.; NUHOGLU, A. Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 2283-2291. 2004.

FINOCCHIARO, T.; OLSSON, N.F. RICHARDSON, T. Use of immobilized lactase in milk systems. **Adv Bioch Engineering Biotechnology**. v. 15, p.71-88. 1980.

FOGLER, H.S. **Elements of chemical reaction engineering**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 838p.

FURTADO, M.M.; KARDEL, G.; NETO, J.P.M.L. Lactase na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 50, n. 294, p. 15-17. 1995.

GEKAS, V. E LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of Lactose – A Literature Review. **Process Biochemistry**. v.20, p.2–12. 1985.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de separação pó membranas**. Escola Piloto em Engenharia Química – COPPE/UFRJ. E-papers Serviços Editoriais. 2006. 180p.

HATZINIKOLAOU, D.G. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**. v.24, n.2, p. 161-172. 2005.

HENG, M.H. e GLATZ, C.E. Ion exchange immobilization of charged of β -galactosidase fusions for lactose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.6, p.745-752. 1994.

JULIANO, L.N. **Síntese e caracterização de membranas para clarificação de suco de frutas**. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. 85p.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 300-309. 2002.

KLEWICKI, R. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β -galactosidase. **Food Chemistry**. v.100, n.3,p.1196-1201. 2005.

LEITE, M. T. **Otimização da produção de ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006. 96p.

LINDAU, J. e JONSSON, A.S. Adsorptive fouling of modified and unmodified commercial polymeric ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**. v. 160, n. 1, p. 65-76. 1999.

LÓPEZ-LEIVA, M.H. e GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**. v.30, n.8, p.757-762. 1995.

LÓPEZ-LEIVA, M., FODA, M.I. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. **Process Biochemistry**. v.35, p.581-587. 1999.

MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic modification. In: Lactose, water, salts and vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. v. 3, p. 77-125. 1997.

MAHONEY, R.R. e WHITAKER, J.R. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, p.327-350. 1977.

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

MULDER, M.; **Basic principles of membrane technology, center for membrane science and technology**. University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000. 564p.

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

NOVALIN, S., NEUHAUS, W., KULBE, K.D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**. v.119 n.2, p.212-218. 2005.

OBÓN ,J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J. L.; MANJÓN, A. β -Galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modelling study of batch and continuous reactors. **Biochemical Education**. v. 28, n. 3, p. 164-168. 2000.

OGRODOWSKI, R. **Produção de biomassa a partir do soro de queijo para obtenção de ribonucleotídeos**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. 122 p.

OLIVEIRA, E.H.P. **Preparação de Membranas Microporosas para Tratamento de Efluentes da Indústria de Alimentos**. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. 122p.

ÖZBEK, B.; SENER, N.; APAR, D.K. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1493–1500. 2006.

PANESAR, R.; PANESAR P.S.; SINGH, R.S.; KENNEDY, J.F.; BERA, M.B. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. **Food Chemistry**. V. 101, n. 2, p. 786-790. 2007.

PETERSON, R.S.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Effects of temperature on the hydrolysis of lactose by immobilized Beta-Galactosidase in a capillary bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, n.4, p.429-437. 1989.

PETRUS, J.C.C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de suco de frutas**. (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. 139 p.

PORTACCIO, M.; STELLATO, S.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; MOHY ELDIN, M.S.; GAETA, F.S.; MITA, D.G. Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and Nylon supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n.1-2, p.101-106. 1998.

ROY, I. e GUPTA, M.N. Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes **Process Biochemistry**. v. 39, n. 3, p. 325-332. 2003.

SANTIAGO, P.A. **Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*.** (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2002.

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.24, n.4. 2004.

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

SCHNEIDER, R.P. e TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso.** São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001. p. 234

SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração.** (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005. 116p.

SORENSEN, R. e NOVAK, N. The use of Michaelis-Menten kinetics in cell biology and physiology teaching laboratories. **Biochemical Education**. v.24, n.1, p.26-28. 1996.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.10, n.6, p.631-637. 2000.

THOMET, A.; REHBERGER, B.; WYSS, B.; BISIG, W. Obtention de sirop de sucre à partir de lactosérum. **Revue suisse Agric.** v.37, n.1, p. 25-30. 2005.

WATTIAUX. Disponível em: <http://www.babcock.wisc.edu/downloads/de/19.pt.pdf>
Acesso em: 03 de janeiro de 2006.

YANG, S. e OKOS, M.R. Effects of temperature on lactose hydrolysis by immobilized beta-galactosidase in plug-flow reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, n.7, p.873-885. 1989.

ZADOW, J.G. Lactose – Properties and uses. **Journal of Dairy Science**. v.67, n.11, p.2654-2679. 1984.

ZHOU, Q.Z.K. e CHEN, X.D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* **Biochemical Engineering Journal**. v. 9, n. 1, p. 33-40. 2001.

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