

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

João Henrique Barca Lupino

**SIMULAÇÃO DE UM REATOR BATELADA PARA A PRODUÇÃO DE LEITE
SEM LACTOSE UTILIZANDO ENZIMA β -GALACTOSIDASE LIVRE E
IMOBILIZADA.**

ARARAQUARA

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

João Henrique Barcha Lupino

**SIMULAÇÃO DE UM REATOR BATELADA PARA A PRODUÇÃO DE LEITE
SEM LACTOSE UTILIZANDO ENZIMA β -GALACTOSIDASE LIVRE E
IMOBILIZADA.**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Engenharia
Química da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho –
Instituto de Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Nakamura
Alves Vieira**

ARARAQUARA

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

João Henrique Barcha Lupino

**SIMULAÇÃO DE UM REATOR BATELADA PARA A PRODUÇÃO DE LEITE
SEM LACTOSE UTILIZANDO ENZIMA β -GALACTOSIDASE LIVRE E
IMOBILIZADA.**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Engenharia
Química da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho –
Instituto de Química.**

Araraquara, 21 de janeiro de 2022

BANCA EXAMINADORA



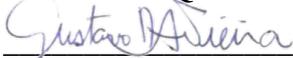
Profa. Dra. Fernanda Zanelli Freitas

Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho

Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Gustavo Nakamura Alves Vieira

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

RESUMO

A produção brasileira de leite desempenha importante papel tanto na economia quanto na nutrição no Brasil. Entretanto, cerca de metade da população mundial possui intolerância à lactose, uma das desordens genéticas mais comuns, sendo este o principal motivo para o não consumo de leite. Neste sentido, a procura por processos viáveis, seguros, limpos e econômicos para a produção de leite sem lactose se intensificaram, necessitando de modelagens matemáticas e de simulações desse processo. Assim, o presente trabalho possui como objetivo a simulação e a modelagem matemática de uma rotina computacional para o processo de hidrólise enzimática da lactose, a fim de investigar a relação das variáveis envolvidas no processo da reação sem e com inibição da enzima β -galactosidase e o desempenho desse processo, com o desenvolvimento de diferentes cenários simulados. Em um primeiro momento, simulou-se, por meio do *software* Scilab, o tempo de batelada para a obtenção do leite sem lactose utilizando a enzima livre, com e sem inibição, para um reator batelada. Logo após, realizou-se o mesmo procedimento utilizando a enzima imobilizada. Os parâmetros cinéticos da reação, necessários para as simulações, foram obtidos de artigos da literatura. Por fim, foi possível observar que a variação de concentração de enzima β -galactosidase altera o tempo de batelada de produção de leite sem lactose e de que diferentes protocolos de imobilização podem alterar a estrutura conformacional da enzima e conseqüentemente sua atividade, porém proporcionando vantagens, como estabilidade e capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas no processo, viabilizando-o economicamente.

Palavras-chave: enzima, simulação, leite sem lactose.

ABSTRACT

Brazilian milk production performs an important role in the economy and nutrition in Brazil. However, half of the world population has lactose intolerance, one of the most common genetic disorders, which is the main reason to people do not consume milk. In this sense, the search for viable, safe, clean and economical processes for the production of lactose-free milk has intensified, requiring mathematical modeling and simulations of this process. Thus, the present work aims to simulate and mathematically model a computational routine for the enzymatic hydrolysis process of lactose, in order to investigate the relation among the variables involved in the reaction process without and with inhibition of the enzyme β -galactosidase and the performance of this process, with the development of different simulated scenarios. At first, the batch time for obtaining lactose-free milk using the free enzyme, with and without inhibition, for a batch reactor was simulated using the Scilab Software. Afterwards, the same procedure was performed using the immobilized enzyme. Kinetic parameters required for the simulations were obtained in papers in scientific literature. Finally, it was possible to observe that the variation of β -galactosidase enzyme concentration changes the batch time of lactose-free milk production and also that different immobilization protocols can change the conformational structure of the enzyme and consequently its activity, but providing advantages, as stability and reusability of the enzymes immobilized in the process, making it economically viable.

Keywords: enzyme, simulation, lactose-free milk.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão aqui a todos que foram de suma importância nos últimos cinco anos e, principalmente, para a elaboração do presente trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado forças e manter o foco para continuar e conquistar meus objetivos, principalmente em tempos de desafios e aprendizados.

Agradeço, também, aos meus pais, José e Valéria, e à minha irmã, Isabelle, por todo o apoio durante minha vida, especialmente nesses últimos cinco anos.

Ao meu amor e melhor amiga, Isabele, por fazer parte da minha vida e por toda a paciência, carinho, compreensão e apoio, não só durante a elaboração deste trabalho, mas também em diversos outros momentos em nossa trajetória.

Aos meus amigos que considero como uma nova família, especialmente ao Arthur, Luca, Renato e Guilherme, pelos momentos, conselhos, festas e risadas inesquecíveis.

Ao Professor Doutor Gustavo Nakamura Alves Vieira, por ter aceito orientar o presente estudo e o ter engrandecido com o seu conhecimento e dedicação.

Por fim, aos professores do corpo docente do curso de Engenharia Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Química, por todos os ensinamentos e conversas, bem como aos funcionários pela assistência e suporte durante a graduação.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as questões certas.

Carl Sagan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Hidrólise da lactose	14
2.1.1	Método enzimático	14
2.2	Enzima β-galactosidase	15
2.3	Imobilização de enzimas	16
2.4	Mecanismo da reação	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Hidrólise da lactose pela enzima livre e sem inibição	27
4.2	Hidrólise da lactose pela enzima livre e com inibição	29
4.3	Hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e sem inibição	32
4.4	Hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e com inibição.....	33
5	CONCLUSÃO	37
6	PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
7	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A - ROTINAS DESENVOLVIDAS EM SCILAB	43
A.1	Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima livre e sem inibição .	43
A.2	Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima livre e com inibição .	44
A.3	Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e sem inibição	45
A.4	Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e com inibição	47

1 INTRODUÇÃO

Segundo os dados da Pesquisa da Pecuária Municipal, divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), em 2019, a produção brasileira de leite atingiu 34,8 bilhões de litros produzidos, desempenhando importante papel tanto para a economia brasileira quanto para a nutrição.

O leite, segundo a definição físico-química, é um sistema em equilíbrio, constituindo-se de uma emulsão estável e complexa de gordura, proteínas, lactose, vitaminas e outros componentes suspensos na água (LEITE, 2009). Dentre os componentes citados, a lactose corresponde de 40 a 50% do teor de sólidos do leite, sendo seu único carboidrato (PORTO, 2001). Quimicamente, a lactose é formada pela junção de dois monossacarídeos, sendo uma molécula de galactose e outra de glicose, possuindo a mesma massa molar da sacarose diferindo na configuração molecular, solubilidade, e nos poderes edulcorante e redutor (FAEDO et al., 2013).

Entretanto, o motivo para o não consumo do leite está principalmente na intolerância à lactose, uma das desordens genéticas mais comuns, atingindo aproximadamente metade da população mundial (PROZYN, 2010). Isso ocorre devido a uma diminuição da atividade enzimática da β -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose na mucosa do intestino delgado (FAEDO et al., 2013). Assim, diante desse cenário, é imprescindível o desenvolvimento e estudo da produção de leite de baixa lactose, a fim de beneficiar aqueles que não podem consumir a bebida láctea e expandir o mercado das indústrias produtoras de laticínios.

O leite com baixo teor de lactose pode ser preparado por hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima livre ou imobilizada, liberando-se os monossacarídeos glicose e galactose. Tal processo é considerado promissor para a indústria de alimentos, pois oferece vantagens econômicas e tecnológicas, já que reduz os riscos de cristalização nos derivados e aumenta o poder adoçante, além de empregar condições amenas de pH e temperatura, produzindo-se diversos novos produtos com baixo teor de lactose em suas composições (FAEDO et al., 2013).

Nesse contexto, a procura por processos viáveis, seguros, limpos e econômicos, procedida pela necessidade de sistematizar o projeto na Engenharia Química, passou a demandar conhecimentos mais específicos sobre os Fenômenos de Transporte, Termodinâmica, Cinética e os diversos equipamentos e até mesmos métodos de cálculos e possibilidades de como conceber esses processos (PERLINGEIRO, 2005). Assim, pela execução de procedimentos simples e as vezes até lúdicos, simular um projeto tornou-se uma

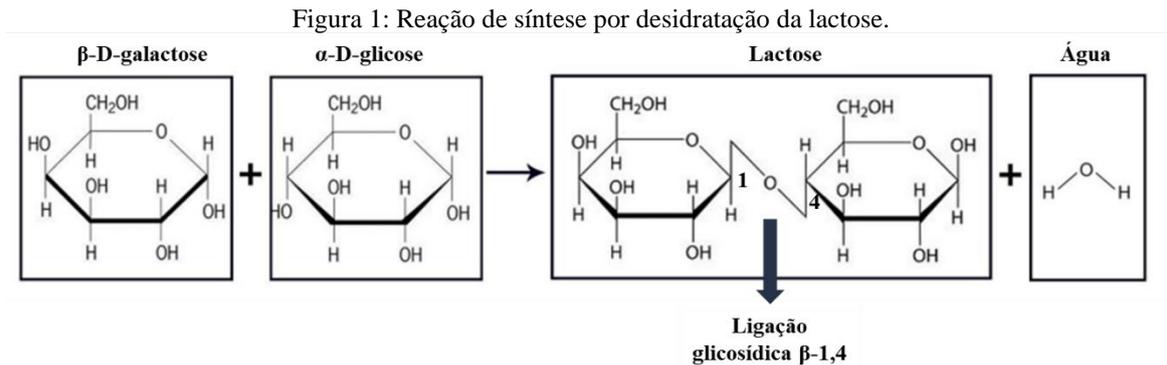
atividade complexa e sofisticada, porém de suma importância nos dias atuais, pois resultam em processos mais econômicos, seguros e ambientalmente integrados (PERLINGEIRO, 2005).

Assim, o presente trabalho possui como objetivo a simulação e a modelagem matemática de uma rotina computacional para o processo de hidrólise enzimática da lactose, a fim de investigar a relação das variáveis envolvidas no processo da reação sem e com inibição da enzima β -galactosidase e o desempenho desse processo, com o desenvolvimento de diferentes cenários simulados.

Este trabalho está dividido da seguinte forma: primeiramente, é apresentada uma análise superficial sobre a lactose, hidrólise da lactose, o método enzimático, a enzima β -galactosidase e os métodos de imobilização de enzima. Posteriormente, os modelos utilizados para representar o processo. Após, a ferramenta computacional utilizada para realizar as simulações e suas rotinas de execução. Por último, os resultados destas simulações e as implicações destes resultados sobre o processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), ou ainda 4-O- β -D-galacto-piranosil- α -D-glucopiranoose, está presente no leite dos mamíferos, definida como um dissacarídeo formado pela reação de desidratação entre um resíduo β -D-galactose e outro radical α -D-glicose, ambos ligados por uma ligação glicosídica β -1,4, liberando uma molécula de água (FISHER, 2010; CAMPBELL, 2000; SANTOS et. al, 2019). A Figura 1 ilustra essa reação:



Fonte: Adaptado de UZUNIAN; BIRNER, 2004.

Como pode-se observar pela Figura 1, a lactose é um açúcar redutor, pois o grupo do resíduo de α -D-glicose da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, reagindo como agente oxidante quando livre, podendo reduzir metais divalente (CAMPBELL, 2000). Ademais, é cerca de dez vezes menos solúvel em comparação com a sacarose, o que pode gerar problemas nos processos industriais na indústria de laticínios, devido a probabilidade de cristalização; além disso, possui forte tendência de absorver odores e sabores e, por ser higroscópica, pode causar o endurecimento de produtos lácteos em pó (FISHER, 2010). Outra característica importante da lactose é seu baixo poder edulcorante em relação à sacarose (índice 100), possuindo apenas índice 16 (LONGO, 2006; ZADOW, 1984).

Tais características, como comentado, podem ser consideradas como desvantagens da lactose no processo industrial, tendo sua utilização bastante limitada. Aliado a isso, grande parte da população mundial possui intolerância a esse dissacarídeo, devido a uma diminuição da atividade enzimática da β -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose na mucosa do intestino delgado (FAEDO et al., 2013). Assim, diante desse cenário, é imprescindível o desenvolvimento e estudo da produção de leite de baixa lactose, a fim de beneficiar aqueles que não podem consumir a bebida láctea, além de expandir o mercado das indústrias produtoras de laticínios, diminuir a cristalização desse carboidrato em derivados lácteos e aumentar o poder adoçante (FISHER, 2010).

Portanto, para os laticínios, a hidrólise da lactose mostra-se como alternativa para ampliar as possibilidades de uso comercial de produtos lácteos, além de contribuir com a redução dos impactos ambientais causados pelo soro do leite, também possível de sofrer a hidrólise (MUKHOPADHYAY et al., 2003).

2.1 Hidrólise da lactose

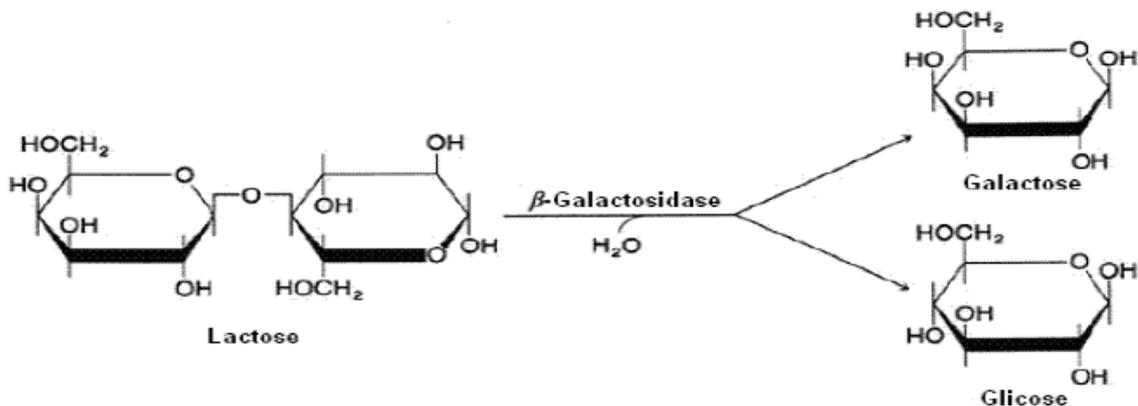
Com o passar dos anos e o desenvolvimento de novas tecnologias, a hidrólise da lactose passou a ser um processo promissor industrialmente, pois, como mencionado previamente, possibilita o consumo de produtos lácteos daqueles intolerantes ao carboidrato, além de oferecer vantagens ao processo como diminuição da cristalização e o aumento do poder adoçante (FISHER, 2010).

Existem dois métodos principais na hidrólise da lactose: o ácido e o enzimático. No primeiro, a reação ocorre de maneira rápida utilizando soluções diluídas de ácidos fortes (sulfúrico e clorídrico) em condições severas de temperatura (entre 100 e 150°C) e pH (entre 1 e 2), motivo pelo qual possui pouca viabilidade para aplicação industrial, pois pode ocasionar a desnaturação de proteínas presentes no leite e alteração de sabor (FISHER, 2010). Já o método enzimático oferece diversas vantagens, principalmente por poder ser utilizado no leite ou soro sem tratamento prévio. Para isso, faz-se uso da enzima β -galactosidase em condições amenas de temperatura (entre 30 e 40°C) e pH, reduzindo as possibilidades de alterações dos compostos termo sensíveis, além de reduzir as necessidades energéticas e a formação de produtos indesejáveis (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

2.1.1 Método enzimático

Como dito anteriormente, a hidrólise enzimática é a mais vantajosa industrialmente. A enzima utilizada, β -galactosidase, hidrolisa a ligação β -(1,4) da molécula de lactose, produzindo glicose e galactose, o que acarreta no aumento do valor agregado do processo, pois tais produtos são de grande interesse para a indústria de alimentos (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). Além disso, a lactose hidrolisada, por possuir aproximadamente 70% da doçura da sacarose, resulta em uma economia no processo, pois os produtos lácteos fabricados com baixo teor de lactose não necessitam da adição do adoçante (FISHER, 2010). A Figura 2 ilustra a reação de hidrólise da lactose.

Figura 2: Hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase.



Fonte: FISHER, 2010.

Ademais, a lactose hidrolisada confere cremosidade para produção de sorvetes, além de diminuir o tempo de maturação de queijos, como o Cheddar, podendo aumentar aproximadamente 10% a produção dos queijos Cottage e Quark, por exemplo (KARDEL, FURTADO e NETO, 1995). Assim, para a compreensão da hidrólise da lactose, é imprescindível o entendimento sobre as enzimas, sobretudo da beta-galactosidase.

2.2 Enzima β -galactosidase

As enzimas são biocatalisadores de natureza proteica ou glicoproteica, possuindo atividade extracelular ou intracelular, além de propriedades como especificidade do substrato e a dependência da temperatura e pH (CHIBATA, 1978; FABER, 2004). Elas atuam diminuindo a energia de ativação necessária para converter o substrato em produto em uma reação bioquímica, sem alterar o equilíbrio e aumentando a velocidade da reação (CHIBATA, 1978; FABER, 2004).

Diferentemente de catalisadores químicos, os quais possuem baixa especificidade e são pouco versáteis, além de exigirem elevadas temperaturas para atingir razoáveis velocidades de reação, as enzimas realizam a catálise em condições brandas de temperatura e pressão, dependendo da fonte e organismo (KRAJEWSKA, 2004; MOFFAT et al., 1994). Ainda, as enzimas possuem a vantagem de serem mais estereoespecíficas em comparação aos catalisadores químicos, aumentando o rendimento da reação e sintetizando um produto mais limpo (MOFFAT et al., 1994). Portanto, as enzimas possuem diversas aplicações, como indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, como é o caso da produção de produtos de baixo teor de lactose.

Entretanto, mesmo com as vantagens apresentadas em relação aos catalisadores químicos, a enzima pode ser imobilizada para sua utilização, pois possibilita a sua reutilização, viabilizando o custo, além de promover significativo aumento em sua estabilização (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). Esta é de suma importância para a enzima, pois, durante a utilização da mesma, alterações em temperatura, pressão, pH e atrito podem diminuir sua estabilidade (ALEKSANYAN e MARKOSYAN, 1986).

Especificamente, a enzima β -galactosidase, chamada comumente de lactase, é classificada como uma hidrolase que catalisa a reação de hidrólise entre β -D-galactose e α -D-glicose (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). Durante alguns anos, seu uso para a produção de leite de baixo teor de lactose foi feito em clínicas médicas para pacientes com intolerância ao carboidrato (FISHER, 2010). Somente após alguns anos que o interesse comercial no produto foi estimulado, principalmente pela oportunidade de vender-se mais leite e das novas aplicações para o soro do leite (MAHONEY, 1997).

As fontes de obtenção dessa enzima são diversas, desde a encontrada em plantas como amêndoas, pêssegos e peras, até órgãos de animais ou produzidas por micro-organismos (MAHONEY, 1997). Para aplicações biotecnológicas, a fonte mais utilizada é a microbiana, principalmente dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* ou *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*, por serem considerados seguros e não apresentarem toxicidade (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). Assim, essa enzima possui importância comercial relevante, pois, ao catalisar a hidrólise da lactose, acarreta a diminuição da cristalização da lactose em derivados lácteos e o aumento do poder adoçante, além de melhorar a textura em produtos como leite condensado (FISHER, 2010).

A enzima β -galactosidase pode ser utilizada em sua forma solúvel para processos batelada e ainda em sua forma imobilizada, em operações contínuas. Como dito anteriormente, a forma imobilizada viabiliza o custo da enzima, pois possibilita sua reutilização no processo e conferem maior estabilidade para a mesma (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005).

2.3 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas oferece diversas vantagens e essa prática vem se expandindo nos últimos 30 anos, conforme seus benefícios são reconhecidos e empregados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas ou para a produção de outros produtos biotecnológicos (MATEO et al., 2007).

A enzima imobilizada pode ser compreendida como aquela física ou quimicamente associada a uma matriz ou suporte não essencial para sua atividade, que pode ser insolúvel ou inerte (CHIBATA, 1978). O principal interesse nessa prática é obter um biocatalisador que mantenha sua atividade e estabilidade conforme seu uso no processo, sendo, portanto, de grande valia para a indústria, principalmente devido a propriedade de reutilização das enzimas ou uso contínuo (FISHER, 2010; VIEIRA, 2009).

Apesar da imobilização enzimática possuir custo elevado, ela pode ser viável economicamente, por ser possível a sua reutilização em reações batelada ou contínuas (UHLIG, 1991). Algumas vantagens da enzima imobilizada são descritas abaixo (ALBAYRAK; YANG, 2002; GÓMEZ et al., 2005; SZYMANSKA et al., 2007).

- Maior estabilidade para ser utilizada em processos contínuos;
- Permite processar grandes quantidades de substrato;
- Possibilidade de reutilização;
- Reutilização com pouco decréscimo da atividade;
- Maior controle no processo catalítico;
- Diminui o volume da reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um reator de menor volume;
- Melhora o controle operacional;
- Possibilita a flexibilização no projeto do reator;
- Não há contaminação por parte da enzima nos produtos.

Porém, após a imobilização, a enzima pode sofrer alterações em suas propriedades químicas e físicas, sendo que os efeitos desse processo sobre propriedades cinéticas, especificidade e produtividade da enzima devem ser levados em consideração (FISHER, 2010). Alguns fatores que podem causar essas modificações são relatados abaixo (KENNEDY; CABRAL, 1987; SHELDON, 2007).

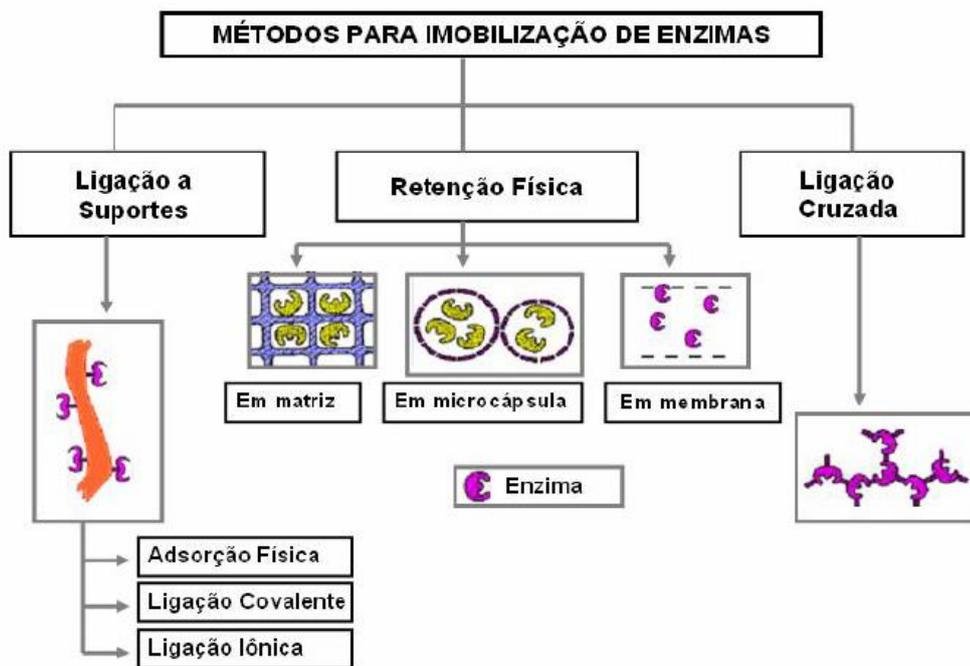
- Efeitos conformacionais, ou seja, alterações na estrutura terciária da proteína, causando modificação conformacional no sítio ativo da molécula da enzima;
- Efeitos de partição, ocasionados por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a molécula da enzima e a matriz ou suporte;
- Efeitos estereoquímicos, já que é possível que uma parte da enzima é imobilizada em uma posição que torna o sítio ativo inacessível;

- Efeitos difusionais ou transferência de massa, devido a uma resistência de difusão de solução do substrato para os sítios catalíticos e difusão de produtos.

Todavia, os problemas citados acima podem ser diminuídos de acordo com a escolha do método de imobilização e suporte adequado (FISHER, 2010). Cada método possui vantagens e desvantagens, devendo-se investigar a escolha para cada tipo de biocatalisador. Em geral, é necessário escolher o método mais barato e simples, com uma boa retenção da atividade da enzima e alta estabilidade operacional (SCOUTEN, 1987).

Superficialmente, dentre os métodos de imobilização de enzima estão o de retenção física, imobilizando a enzima em uma matriz polimérica, membrana ou microcápsula; uso de reagente multifuncional por ligações cruzadas e pelo método de imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel (HAIDER; HUSAIN, 2008). A Figura 3 ilustra esses métodos.

Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado DALLA-VECCHIA et al., 2004.

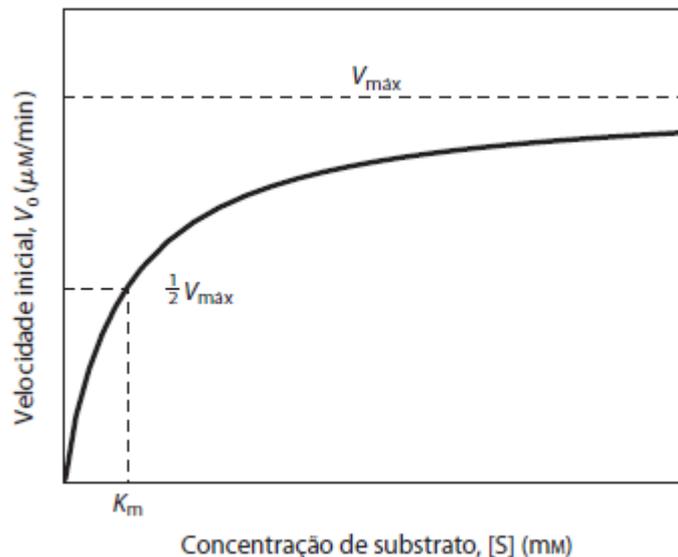
Diferentes protocolos de imobilização geram diferentes biocatalisadores com distintos mecanismos de reação. O próximo tópico descreverá os mecanismos de reação enzimática para a hidrólise da lactose, imobilizada ou não.

2.4 Mecanismo da reação

Nas reações enzimáticas ou cinética enzimática, o estudo da velocidade envolve informações indiretas sobre o mecanismo da reação e a especificidade das enzimas, além de demais fatores que podem influenciar a velocidade das reações (MOTTA, 2011). Assim, para a compreensão dos mecanismos enzimáticos, uma vez que a abordagem mais utilizada é a determinação da velocidade da reação, deve-se atentar que o estudo da concentração do substrato, [S], ao longo do curso da reação é complicado e, portanto, mede-se a velocidade inicial, V_0 (NELSON; COX, 2014).

Quando a concentração de substrato é baixa, V_0 aumenta quase linearmente com o aumento de [S]; porém em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta de maneira hiperbólica até se aproximar de uma velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$, na qual toda enzima está na forma de complexo com o substrato (NELSON; COX, 2014). A Figura 4 a seguir ilustra esse comportamento.

Figura 4: Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.



Fonte: NELSON; COX, 2014, p. 201.

Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913, postularam que a enzima (E) combina-se rapidamente com o substrato, formando o complexo enzima-substrato, ES, em etapa reversível (MOTTA, 2011). Logo após, o complexo ES é rompido em uma segunda etapa mais lenta, originando a enzima livre e o produto P, sendo que, no início da reação, a concentração de produto P é mínima, podendo-se desprezar a reação inversa $P \rightarrow S$ (NELSON; COX, 2014).

Assim a reação total é mostrada na Equação 01 (NELSON; COX, 2014).



Assim, a velocidade da reação, sem inibição, é apresentada na Equação 02 (NELSON; COX, 2014).

$$V_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 02}$$

Onde $[E_t]$ é a concentração total da enzima, ou seja, a somatória da enzima livre com a ligada ao substrato, K_m é definido como a constante de Michaelis (descreve afinidade enzima-substrato), $[S]$ a concentração do substrato e k_2 a constante cinética da reação apresentada na Equação 01.

De acordo com Zhou et al., a mesma Equação 02 provinda da cinética de Michaelis-Menten pode ser usada para descrever a hidrólise da lactose sem inibição do produto. A Equação 03 apresenta a reação total da hidrólise da lactose.



Onde E, S, P e G são, respectivamente, a enzima, lactose, galactose e glucose. Já ES é o complexo enzima-lactose.

Entretanto, existem moléculas capazes de interferir nas reações enzimáticas, chamadas de inibidores, que por sua vez reduzem a atividade das enzimas (MOTTA, 2011). O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece rica informação sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a desvendar algumas vias metabólicas (NELSON; COX, 2014).

A inibição pode ser classificada em reversível e irreversível (NELSON; COX, 2014). Na primeira, os inibidores podem ser competitivos, ou seja, irão competir com o substrato para realizarem uma ligação reversível ao sítio ativo e possuem estruturas semelhantes ao substrato; não competitivos, os quais ligam-se apenas ao complexo enzima-substrato em outro sítio; mistos, que se ligam tanto a enzima quanto ao complexo em um sítio distinto ao ativo (NELSON; COX, 2014; MOTTA, 2011). Já na inibição irreversível, o inibidor liga-se ininterruptamente ao sítio ativo por meio de uma ligação covalente ou interação não covalente estável, ou seja, ocorrem modificações químicas na enzima, ocasionando a inativação definitiva (NELSON; COX, 2014; MOTTA 2011).

Zhou et al. (2003) descreveram em seu trabalho o modelo utilizado para cinética enzimática com inibição do produto pela galactose, no qual os produtos são formados simultaneamente sob o efeito do complexo enzima-substrato. As Equações 04, 05 e 06 descrevem os passos da reação e a velocidade da mesma, onde EP é o complexo enzima-galactose.



$$v = \frac{dS}{dt} = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_i}\right) + [S]} \quad \text{Eq. 06}$$

Onde, na Equação 06, $[E_0]$ é a concentração inicial de enzima e K_i é a constante de inibição dada por k_3/k_{-3} , K_m é definido como a constante de Michaelis, $[S]$ a concentração do substrato, k_2 a constante cinética da reação apresentada na Equação 04 e $[P]$ a concentração de produto formada, neste caso, galactose.

Portanto, utilizando tais modelos apresentados, no próximo item serão mostrados os materiais e métodos utilizados para a posterior simulação da hidrólise da lactose, com ou sem inibição, em um reator batelada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo de caso será um reator batelada no qual ocorre uma reação de hidrólise catalisada por uma enzima, cujo mecanismo de reação foi descrito anteriormente. Para o caso de não se considerarem efeitos inibitórios, resulta-se em uma única equação diferencial ordinária (EDO) de primeira ordem; por outro lado, quando eles são considerados, é necessário incluir mais equações de balanço em regime transiente, resultando em sistemas de EDOs. Assim, o modelo físico-matemático é baseado em um balanço de massa dos reagentes e produtos da reação em um reator de mistura em batelada, assumindo as hipóteses de mistura perfeita e de meio reacional com massa específica constante.

Conhecidas as concentrações iniciais de cada substância envolvida na reação bioquímica, têm-se as condições iniciais do sistema. Em ambas as situações (com inibição ou sem inibição), obtém-se um conjunto de EDOs de primeira ordem, com condições iniciais conhecidas, ou seja, um problema de valor inicial (PVI). A Tabela 1 a seguir apresenta os parâmetros cinéticos, para a enzima livre, da hidrólise da lactose pelo microrganismo *K. fragilis*, necessários para a simulação do problema, para os casos sem e com inibição:

Tabela 1: Parâmetros cinéticos utilizados na simulação, com e sem inibição, à 40°C.

Parâmetro cinéticos	Sem inibição	Inibição pelo produto
k [mol/(mg enzima min)]	$4,9 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$
K_M (mol/L)	$7,7 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-3}$
K_i (mol/L)	-	$4,2 \times 10^{-3}$

Fonte: SANTOS et al., 1998.

A Tabela 2 também apresenta os parâmetros cinéticos da hidrólise da lactose pelo fungo *K. fragilis*, porém considerando a imobilização da enzima, para ambos os casos sem e com inibição:

Tabela 2: Parâmetros cinéticos utilizados na simulação considerando a enzima imobilizada, com e sem inibição, à 37 °C.

Parâmetro cinéticos	Sem inibição	Inibição pelo produto
$k \times C_{enz}$ [mol/(L min)]	$1,081 \times 10^{-2}$	$1,839 \times 10^{-2}$
K_M (mol/L)	$1,7297 \times 10^{-1}$	$1,7495 \times 10^{-1}$
K_i (mol/L)	-	$1,7329 \times 10^{-1}$

Fonte: ZHOU et al., 2002.

Para execução dessa simulação, optou-se pelo uso do Scilab para a resolução dos problemas de valor inicial (PVI). O uso do Scilab é motivado por ser um software livre com vários métodos numéricos realizados por funções já prontas no próprio pacote. Este trabalho utilizou a função “ode” do software para realizar a resolução numérica do sistema de EDOs que serão apresentadas à frente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguindo as normas de boas práticas em programação, as rotinas utilizadas foram separadas em blocos, permitindo a melhor visualização computacional e conceitual do processo tratado.

Além disso, a vantagem em se utilizar essa separação é de torna mais fácil a modificação da rotina para simular situações distintas ou para corrigir erros. Os blocos de utilizados podem ser encontrados no Apêndice deste trabalho. O processo simulado é o descrito anteriormente, utilizando os modelos apresentados na Seção 3.

O balanço de massa de lactose (indicada pelo subscripto A) no reator batelada é dada por: taxa de acúmulo de lactose no reator igual à taxa de consumo, causado pela reação bioquímica (FOGLER, 2018). Assumindo as hipóteses explicitadas na Seção 4, obtemos a Equação 07, típica para um reator de mistura em batelada:

$$\frac{dC_A}{dt} = -r_A \quad \text{Eq. 07}$$

Nesta equação, C_A é a concentração de lactose, t é o tempo de batelada e r_A é a velocidade específica de reação.

Por se tratar de uma reação enzimática, na qual os mecanismos da reação são os mesmos citados na Seção 3, para o caso sem inibição, partindo-se da Equação 02, pode-se obter a Equação 08 a seguir, substituindo-se o balanço de massa do reator batelada:

$$r_A = \frac{kC_{enz}C_A}{K_m + C_A} \quad \text{Eq. 08}$$

Onde C_{enz} é a concentração de enzima β -galactosidase, K_m é definido como a constante de Michaelis, C_A é a concentração de lactose e k a constante cinética da reação.

Portanto, neste caso sem inibição, tem-se uma equação diferencial ordinária de primeira ordem. Conhecendo-se a concentração de lactose no início do processo, tem-se um problema de valor inicial:

$$\begin{cases} \frac{dC_A}{dt} = -\frac{kC_{enz}C_A}{K_m + C_A} \\ C_A(t = 0) = C_{A0} \end{cases} \quad \text{Eq. 09}$$

Especificamente para a β -galactosidase do microorganismo *Kluyveromyces fragilis*, foi descrito na literatura que a galactose, um dos produtos da reação, tem afinidade com o sítio ativo da enzima, podendo ocupá-lo reversivelmente (SANTOS et al, 1998). Ou seja, a

galactose compete com a lactose pelo sítio ativo da enzima, impedindo que a reação de hidrólise da lactose ocorra enquanto a galactose ocupar o sítio ativo. Este mecanismo de reação é conhecido como inibição competitiva pelo produto e foi apresentado nas Equações 04 e 05, na Seção 3.

A taxa global de reação é descrita pela Equação 09, apenas substituindo-se a taxa da reação do reator em batelada na Equação 06:

$$r_A = \frac{kC_{enz}C_A}{K_m \left(1 + \frac{C_P}{K_i}\right) + C_A} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde C_{enz} é a concentração de enzima β -galactosidase, K_m é definido como a constante de Michaelis, C_A é a concentração de lactose e k a constante cinética da reação, K_i é a constante de inibição e C_P a concentração de produto formada, neste caso, galactose.

Portanto, considerando a inibição competitiva pela galactose, tem-se um PVI composto de duas EDOs, uma para a taxa de reação referente ao consumo de lactose e outra à produção de galactose, sendo as concentrações iniciais de lactose e galactose conhecidas:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC_A}{dt} = - \frac{kC_{enz}C_A}{K_m \left(1 + \frac{C_P}{K_i}\right) + C_A} \\ \frac{dC_P}{dt} = + \frac{kC_{enz}C_A}{K_m \left(1 + \frac{C_P}{K_i}\right) + C_A} \\ C_A(t = 0) = C_{A0} \\ C_P(t = 0) = C_{P0} \end{array} \right. \quad \text{Eq. 11}$$

As variáveis necessárias para as rotinas são: parâmetros de projeto, como volume do reator (V), em m^3 , conversão desejada (X), concentrações de β -galactosidase, lactose inicial, lactose desejada e lactose (C_{enz} , C_{A0} , C_d , C , respectivamente), sendo C_{enz} em mg/L e C_{A0} , C_d e C em mol/L , tempo (t), em minutos; parâmetros do meio reacional como fração mássica de lactose (x_{A0}), massa específica do leite (ρ), em g/L , massa molar da lactose (MM_A), em g/mol ; e por fim, os parâmetros cinéticos já citados, k , em $mol/(mg \text{ min})$, K_m , em mol/L , e K_i , em mol/L também.

Também foi utilizado o conceito de variáveis definidas e variáveis monitoradas do modelo. Estas variáveis englobam as variáveis descritas acima. As variáveis definidas são aquelas fixadas antes do início da simulação: C_{enz} , C_{A0} , C_d , X , V , ρ , MM_A , k , K_m e K_i ; estas variáveis constituem um cenário de operação. As variáveis monitoradas são aquelas que tem

o valor definido após a simulação: C e t ; estas variáveis são o resultado do cenário constituído por um conjunto de variáveis definidas.

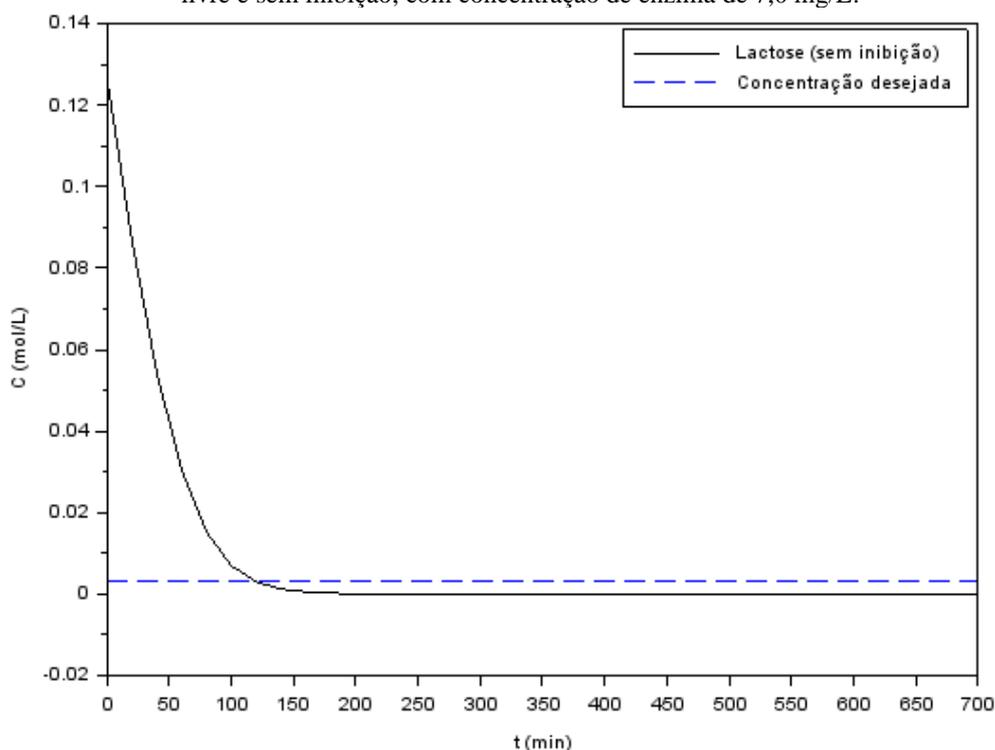
4.1 Hidrólise da lactose pela enzima livre e sem inibição

Para este caso, como explicitado anteriormente, igualaram-se as Equações 07 e 08 e gerou-se uma equação diferencial ordinária de primeira ordem. Conhecendo-se a concentração de lactose no início do processo, tem-se um problema de valor inicial.

Portanto, para essa simulação, utilizou-se a rotina apresentada no Apêndice A.1, considerando-se tais valores para as variáveis: reator com volume (V) igual a 300 L; conversão desejada de lactose (X) de 97,6%, para que a concentração desejada de lactose (C_d) seja igual a 0,003 mol/L, sendo assim o produto considerando isento de lactose (BRASIL, 2020); concentrações de β -galactosidase (C_{enz}) e lactose inicial (C_{A0}) iguais a 7 mg/L (SANTOS et al., 1998) e 0,126 mol/L (VENTURINI et al, 2007) respectivamente; fração mássica de lactose (x_{A0}) igual a 0,042; massa específica do leite (ρ) 1030 g/L (VENTURINI et al, 2007); molar da lactose (MM_A), 342,3 g/mol; e por fim, os parâmetros cinéticos k igual a $4,9 \cdot 10^{-4}$ mol/(mg min) (SANTOS et al., 1998) e K_m sendo $7,7 \cdot 10^{-2}$ mol/L (SANTOS et al., 1998).

A Figura 5 apresenta o resultado da simulação:

Figura 5: Concentração de lactose em função do tempo após simulação da hidrólise da lactose com enzima livre e sem inibição, com concentração de enzima de 7,0 mg/L.

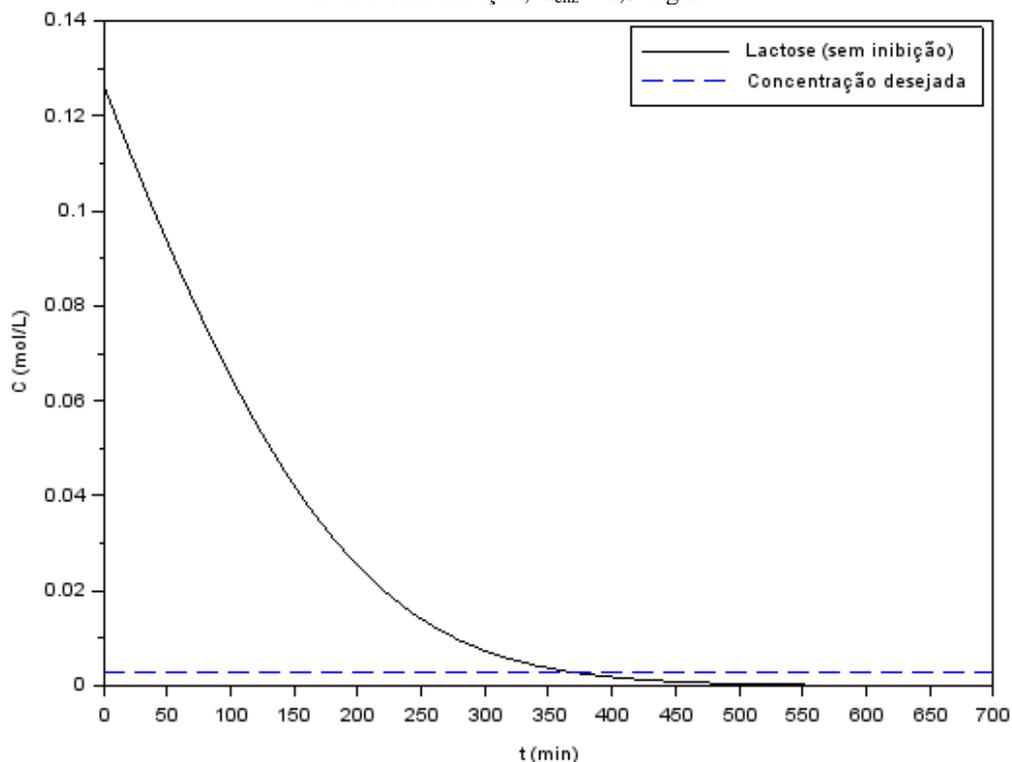


Fonte: Próprio autor, 2021.

Assim, pelo resultado apresentado anteriormente, o tempo de batelada para essa concentração de enzima utilizada (7 mg/L) foi de aproximadamente 120 minutos. Portanto, seriam necessárias aproximadamente 2 horas, dentro das hipóteses já assumidas neste trabalho, para que a conversão de lactose seja 97,6%, obtendo-se a concentração desejada final do açúcar em torno de 100 mg/mL ou 0,003 mol/L, sendo considerado um produto isento de lactose, de acordo com a legislação vigente no país (BRASIL, 2020). Observa-se também que a concentração (C) de lactose diminui ao longo do tempo de maneira quase linear até os 100 minutos, indicando a rápida conversão do substrato, em grande quantidade, pela enzima do microorganismo *Kluyveromyces fragilis*.

Já as Figuras 6 e 7 ilustram o novo tempo de batelada para a obtenção do leite isento de lactose alterando-se a concentração de enzima utilizada para 2,3 mg/L e 5,7 mg/L, respectivamente (SANTOS et al, 1998).

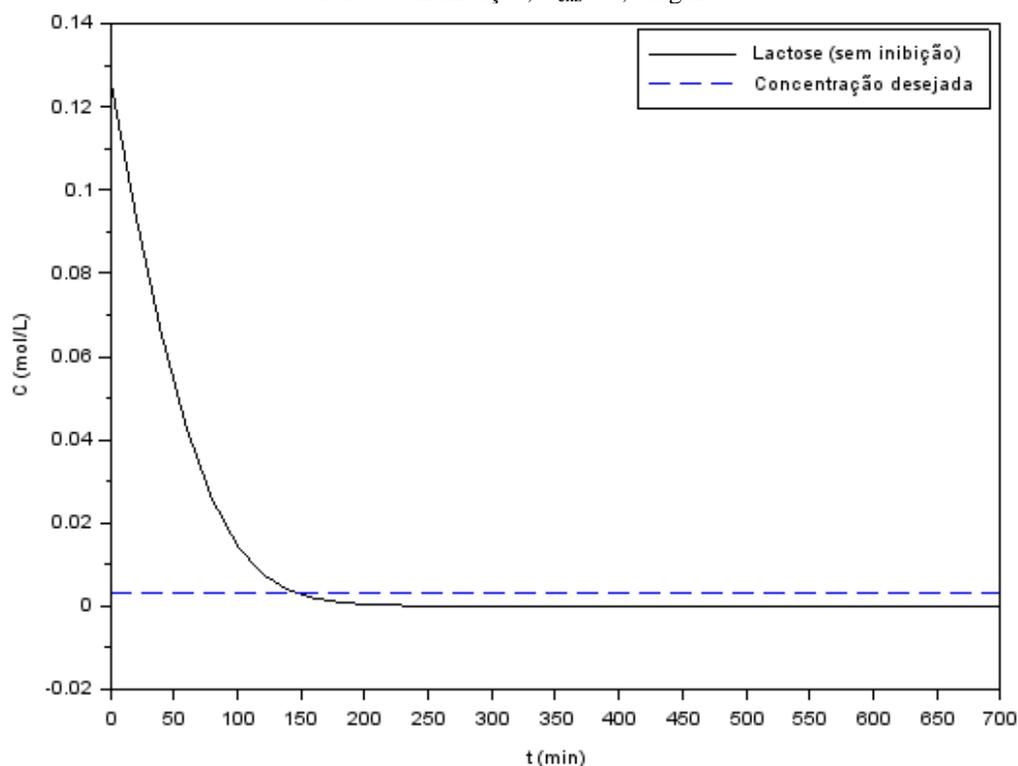
Figura 6: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima livre e sem inibição, $C_{enz} = 2,3$ mg/L.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Diferentemente do resultado apresentado na Figura 5, as Figuras 6 e 7 apresentam tempos de batelada diferentes para cada concentração, sendo que para a concentração de enzima igual a 2,3 mg/L, esse tempo foi em torno de 365 minutos, e para concentração de enzima de 5,7 mg/L foi de aproximadamente 150 minutos.

Figura 7: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima livre e sem inibição, $C_{enz} = 5,7$ mg/L.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Portanto, infere-se que a concentração de enzima utilizada no processo é de suma importância, devendo ser alvo de análises econômicas para cada tipo de planta, considerando-se paradas, manutenção e programação da produção para que seja escolhida a concentração mais adequada e vantajosa. Observa-se, novamente, que a concentração (C) de lactose diminui ao longo do tempo de maneira quase linear nos minutos iniciais da reação, relacionado à rápida conversão do substrato pela enzima do microorganismo *Kluyveromyces fragilis*.

4.2 Hidrólise da lactose pela enzima livre e com inibição

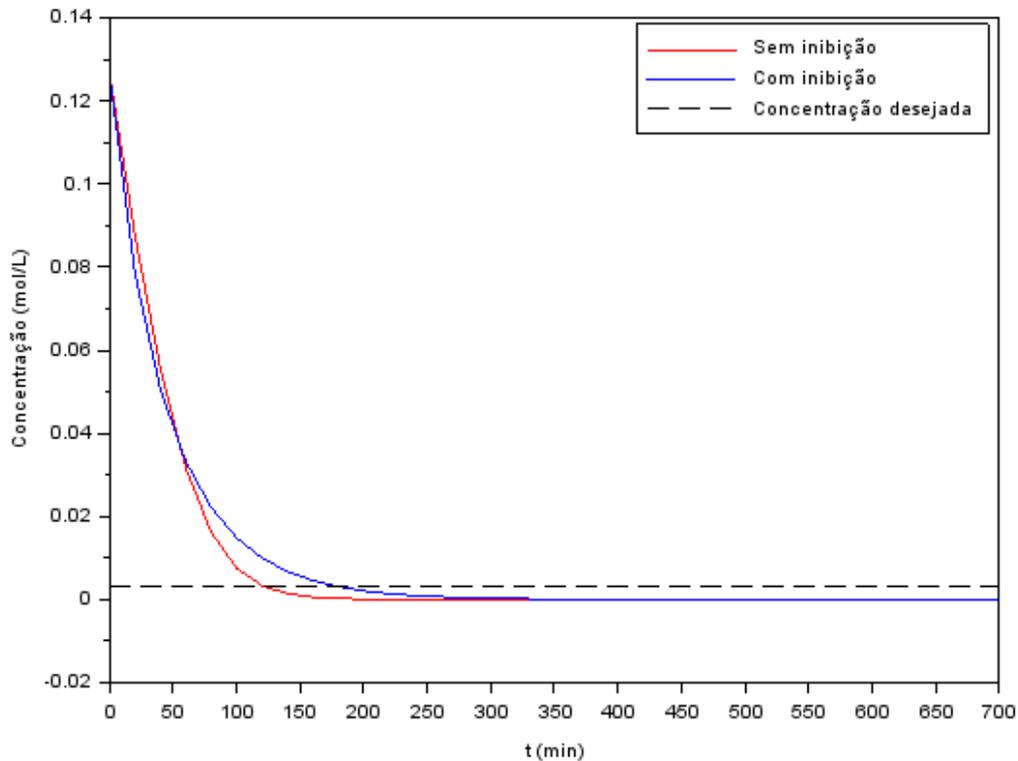
Considerando-se a inibição para a enzima livre, gerou-se um PVI composto de duas EDOs, uma para a taxa de reação referente ao consumo de lactose e outra à produção de galactose.

Portanto, para essa simulação, utilizou-se a rotina apresentada no Apêndice A.2, considerando-se tais valores para as variáveis: reator com volume (V) igual a 300 L; conversão desejada de lactose (X) de 97,6%, para que a concentração desejada de lactose (C_d) seja igual a 0,003 mol/L, sendo assim o produto considerando isento de lactose (BRASIL, 2020); concentrações de β-galactosidase (C_{enz}) e lactose inicial (C_{A0}) iguais a 7 mg/L (SANTOS et al., 1998) e 0,126 mol/L (VENTURINI et al, 2007) respectivamente;

fração mássica de lactose (x_{A0}) igual a 0,042; massa específica do leite (ρ) 1030 g/L (VENTURINI et al, 2007); molar da lactose (M_{MA}), 342,3 g/mol; e por fim, os parâmetros cinéticos k igual a $4,8 \cdot 10^{-4}$ mol/(mg min) (SANTOS et al., 1998), K_m sendo $5,6 \cdot 10^{-3}$ mol/L (SANTOS et al., 1998) e K_i igual a $4,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L (SANTOS et al., 1998).

A Figura 8 apresenta o resultado da simulação em comparação com a Figura 5:

Figura 8: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima livre, sem inibição e com inibição, $C_{enz} = 7,0$ mg/L.



Fonte: Próprio autor, 2021.

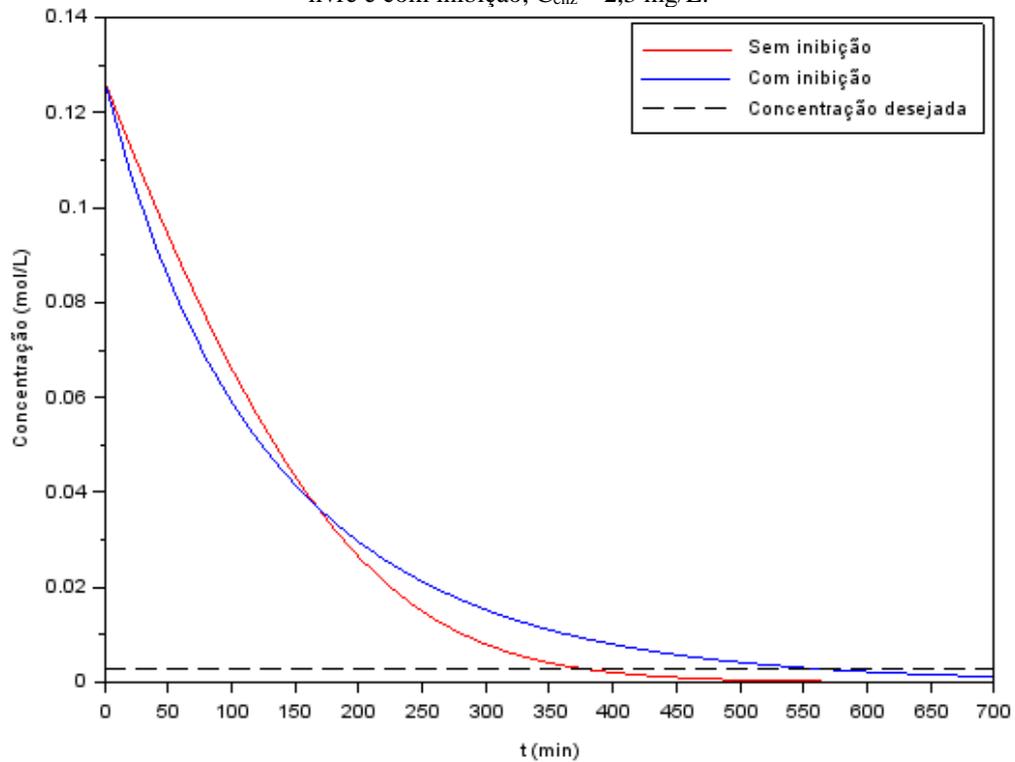
Assim, pelo resultado apresentado anteriormente, percebe-se que o tempo de batelada para essa concentração de enzima utilizada (7 mg/L) foi de aproximadamente 182 minutos comparados aos 120 minutos sem inibição. Portanto, seriam necessárias aproximadamente 3 horas, dentro das hipóteses já assumidas neste trabalho, para que a conversão de lactose seja 97,6% com inibição pelo produto, obtendo-se a concentração desejada final do açúcar em torno de 100 mg/mL ou 0,003 mol/L, sendo considerado um produto isento de lactose, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2020).

Já as Figuras 9 e 10 ilustram o novo tempo de batelada para a obtenção do leite isento de lactose alterando-se a concentração de enzima utilizada para 2,3 mg/L e 5,7 mg/L, respectivamente, com inibição (SANTOS et al, 1998).

Diferentemente do resultado apresentado na Figura 8, as Figuras 9 e 10 apresentam tempos de batelada diferentes para cada concentração, sendo que para a concentração de

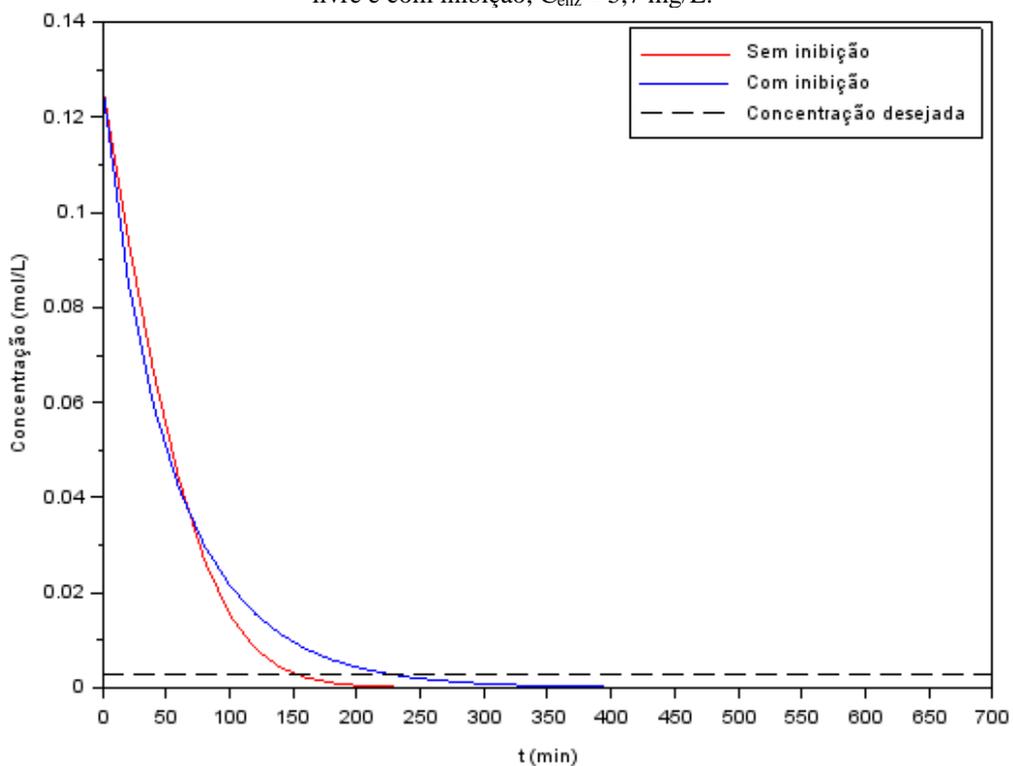
enzima igual a 2,3 mg/L, esse tempo foi em torno de 550 minutos, e para concentração de enzima de 5,7 mg/L foi de aproximadamente 225 minutos.

Figura 9: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima livre e com inibição, $C_{enz} = 2,3$ mg/L.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 10: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima livre e com inibição, $C_{enz} = 5,7$ mg/L.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Portanto, infere-se mais uma vez que a concentração de enzima utilizada no processo é de suma importância, devendo ser alvo de análises econômicas para cada tipo de planta, considerando-se paradas, manutenção e programação da produção para que seja escolhida a concentração mais adequada e vantajosa. Observa-se que, em comparação com os resultados obtidos para o caso sem inibição, os tempos de batelada considerando-se a inibição são maiores, o que era esperando teoricamente, já que galactose e lactose disputam pelo menos sítio ativo, tornando a conversão mais lenta.

A Tabela 3 resume os resultados obtidos dos tempos de batelada para a enzima livre sem inibição e com inibição.

Tabela 3: Tempo de batelada dos diferentes cenários simulados para a enzima livre.

Concentração da enzima (mg/L)	Tempo de batelada enzima livre sem inibição (min)	Tempo de batelada enzima livre com inibição (min)
2,3	365	550
5,7	150	225
7,0	120	182

Fonte: Próprio autor, 2021.

4.3 Hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e sem inibição

Para a enzima imobilizada sem inibição, o procedimento foi análogo ao feito para a enzima livre sem inibição, porém com alterações nos parâmetros cinéticos.

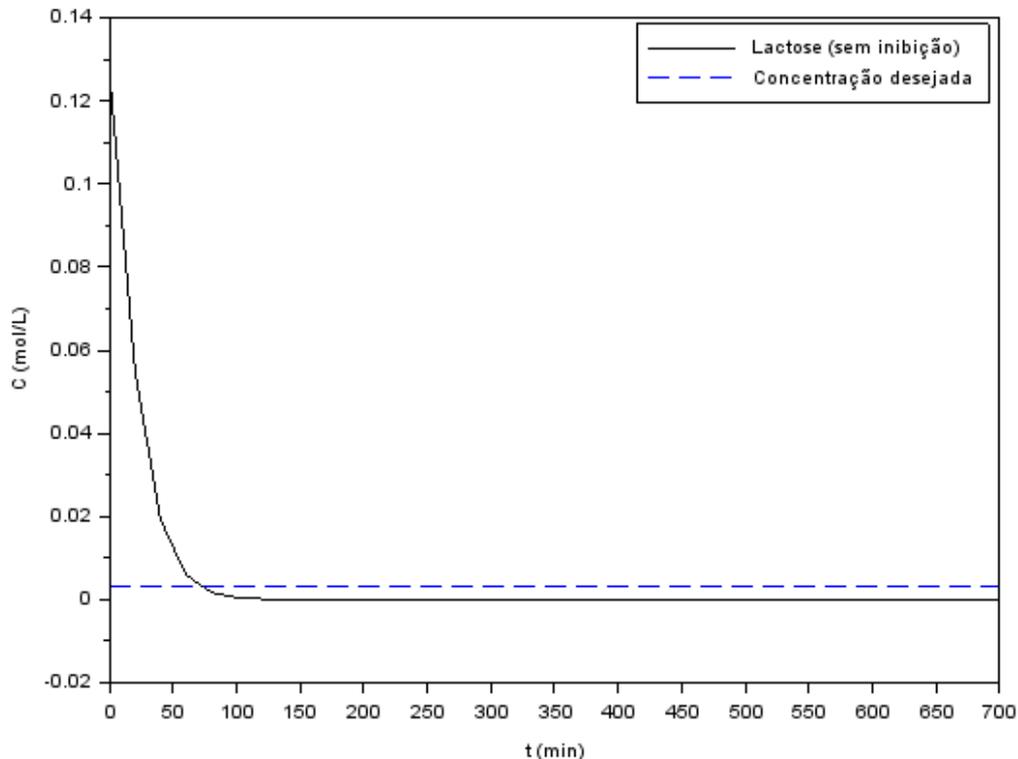
Portanto, para essa simulação, utilizou-se a rotina apresentada no Apêndice A.3, considerando-se tais valores para as variáveis: reator com volume (V) igual a 300 L; conversão desejada de lactose (X) de 97,6%, para que a concentração desejada de lactose (Cd) seja igual a 0,003 mol/L, sendo assim o produto considerando isento de lactose (BRASIL, 2020); concentração de lactose inicial (C_{A0}) igual a 0,126 mol/L (VENTURINI et al, 2007) respectivamente; fração mássica de lactose (x_{A0}) igual a 0,042; massa específica do leite (ρ) 1030 g/L (VENTURINI et al, 2007); molar da lactose (MM_A), 342,3 g/mol; e por fim, os parâmetros cinéticos $k.C_{enz}$ igual a $1,081.10^{-2}$ mol/(L min) (ZHOU et al., 2002), K_m sendo $1,7297.10^{-1}$ mol/L (ZHOU et al., 2002).

A Figura 11 apresenta o resultado da simulação, na qual, pelo resultado apresentado, percebe-se que o tempo de batelada para esses parâmetros foi de aproximadamente 75 minutos. Portanto, seriam necessárias aproximadamente 1 hora e 15 minutos, dentro das hipóteses já assumidas neste trabalho, para que a conversão de lactose seja 97,6% com inibição pelo produto, obtendo-se a concentração desejada final do açúcar em torno de 100

mg/mL ou 0,003 mol/L, sendo considerado um produto isento de lactose de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2020).

Observa-se, novamente, que a concentração (C) de lactose diminui ao longo do tempo de maneira quase linear nos minutos iniciais da reação, relacionado à rápida conversão do substrato pela enzima do microorganismo *Kluyveromyces fragilis*.

Figura 11: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima imobilizada e sem inibição.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.4 Hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e com inibição

Por fim, para a enzima imobilizada com inibição, o procedimento foi análogo ao feito para a enzima livre com inibição, porém com alterações nos parâmetros cinéticos.

Portanto, para essa simulação, utilizou-se a rotina apresentada no Apêndice A.4, considerando-se tais valores para as variáveis: reator com volume (V) igual a 300 L; conversão desejada de lactose (X) de 97,6%, para que a concentração desejada de lactose (C_d) seja igual a 0,003 mol/L, sendo assim o produto considerando isento de lactose (BRASIL, 2020); concentração de lactose inicial (C_{A0}) igual a 0,126 mol/L (VENTURINI et al, 2007) respectivamente; fração mássica de lactose (x_{A0}) igual a 0,042; massa específica do leite (ρ) 1030 g/L (VENTURINI et al, 2007); molar da lactose (M_{M_A}), 342,3 g/mol; e por fim, os parâmetros cinéticos k.C_{enz} igual a 1,839.10⁻² mol/(L min) (ZHOU et al., 2002), K_m

sendo $1,7495 \cdot 10^{-1}$ mol/L (ZHOU et al., 2002) e K_i igual a $1,7329 \cdot 10^{-1}$ mol/L (ZHOU et al., 2002).

A Figura 12 apresenta o resultado da simulação, na qual, pelo resultado apresentado, percebe-se que o tempo de batelada para esses parâmetros foi de aproximadamente 60 minutos, comparados aos 75 minutos anteriormente. Portanto, seria necessária aproximadamente 1 hora, dentro das hipóteses já assumidas neste trabalho, para que a conversão de lactose seja 97,6% com inibição pelo produto, obtendo-se a concentração desejada final do açúcar em torno de 100 mg/mL ou 0,003 mol/L, sendo considerado um produto isento de lactose (BRASIL, 2020).

Assim, observa-se também que, diferentemente da enzima livre, a inibição reduziu o tempo de batelada do processo para a enzima imobilizada. Como comentado brevemente no Capítulo 2 do presente trabalho, diferentes protocolos de imobilização geram diferentes biocatalisadores com diferentes mecanismos de reação. Neste caso, segundo Zhou et al. (2002), o método utilizado para imobilizar a enzima foi o de ligação a suportes (tecido de algodão).

Neste caso, as ligações covalentes formadas entre a enzima e a superfície do tecido de algodão no biocatalisador produzido pelos autores podem ter alterado a estrutura conformacional da enzima e seu sítio ativo, acarretando uma possível diminuição da atividade ou a mudança da especificidade em relação ao substrato. No entanto, este protocolo de imobilização possui a vantagem de gerar uma enzima imobilizada estável, visto que a ligação covalente é forte (CHIBATA, 1978; KENNEDY; CABRAL, 1978).

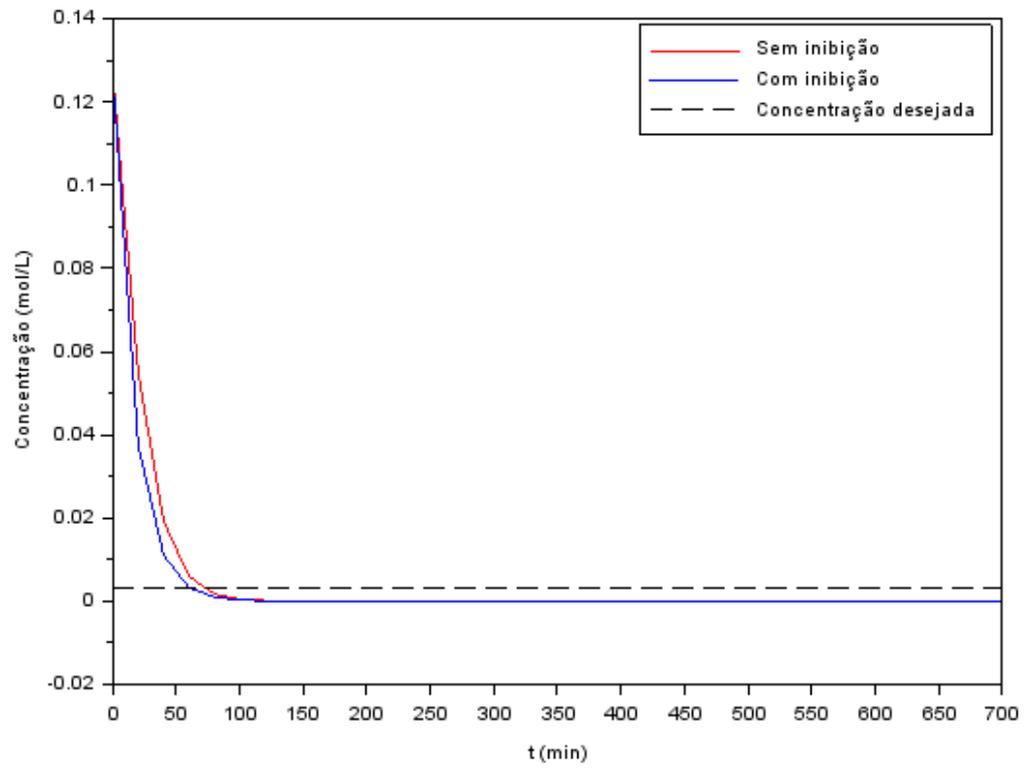
A Tabela 4 resume os resultados obtidos dos tempos de batelada para a enzima imobilizada sem inibição e com inibição.

Tabela 4: Tempo de batelada dos diferentes cenários simulados para a enzima imobilizada.

Tempo de batelada enzima imobilizada sem inibição (min)	Tempo de batelada enzima imobilizada com inibição (min)
75	60

Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 12: Concentração de lactose em função do tempo após a simulação da hidrólise da lactose com enzima imobilizada e com inibição.



Fonte: Próprio autor, 2021.

5 CONCLUSÃO

Portanto, infere-se que a simulação de processos é de suma importância nos dias atuais, pois resultam em processos mais econômicos, seguros e ambientalmente integrados. Com as simulações, foi possível observar que a variação de concentração de enzima β - galactosidase altera o tempo de batelada de produção de leite sem lactose, o que permite a escolha da concentração mais adequada para o cronograma da planta industrial, aliado a uma análise econômica mais aprofundada.

Além disso, conclui-se que os diferentes protocolos de imobilização podem alterar a estrutura conformacional da enzima e conseqüentemente sua atividade, porém proporcionando vantagens, como estabilidade e capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas no processo, viabilizando-o economicamente.

6 PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectiva para trabalhos futuros, faz-se necessário realizar novamente a metodologia empregada para a determinação dos parâmetros cinéticos utilizados nas simulações, utilizando-se métodos mais recentes e precisos. Além disso, diferentes cenários podem ser simulados, utilizando outros protocolos de imobilização de enzimas para avaliar qual seria o mais vantajoso industrialmente, avaliando-se o tempo de batelada e outros fatores, como economia.

7 REFERÊNCIAS

- ALBAYRAK, N.; YANG, S. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on Tosylated Cotton Cloth. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 371-383, 2002.
- ALEKSANYAN, E. R.; MARKOSYAN, L. S. Microbial β -fructofuranosidase (survey). **Appl Biochem Microbiol**. v. 22, p. 133-145, 1986.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1986, 928 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 460, de 21 de dezembro de 2020. Dispõe sobre os requisitos sanitários das fórmulas dietoterápicas para erros inatos do metabolismo. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-460-de-21-de-dezembro-de-2020-295779608>>. Acesso em: 30 set. 2021.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000, 751p.
- CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes – Research and Development**. New York: John Wiley & Sons, 1979, p. 292.
- DALLA-VECCHIA, R. *et al.* Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5. ed. Berlin: Springer, 2004, 454p.
- FAEDO, R.; BRIÃO, V.B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtaining of milk with low lactose process for separation membranes by associated with enzymatic hydrolysis. **Revista CIATEC – UPF**, 3, 44-54, 2013.
- FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- FOGLER, H. S., Elementos de engenharia das reações químicas, Rio de Janeiro: LTC, 4ª ed. 2009, 853p.
- GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process. Biochem**, v. 20, p. 2-12, 1985.
- GÓMEZ, L. *et al.* Immobilization of Chitosan-modified Invertase on Alginate-coated Chitin Support via Polyelectrolyte Complex Formation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 22-27, 2005.
- HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of Milk/whey Lactose by β -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 576-580, 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da pecuária municipal**, 2019. Disponível em:

<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?t=destaques>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

KARDEL, G.; FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. L. Lactase na Indústria de Laticínios: Parte 1. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. Juiz de Fora, v. 50, n. 294, p. 15-17, 1995.

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

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

LEITE, J. L. B.; SIQUEIRA, K. B.; CARVALHO, G. R. **Comércio Internacional de Lácteos**, 2. ed. rev. e ampl. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, 350 p.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurte**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006, 109p.

LÓPEZ-GALLEGO, L. *et al.* Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2005.

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

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.** v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MOFFAT, G. *et al.* Selective Separations in Environmental and Industrial Processes Using Magnetic Carrier Technology. **Minerals Engineering**. p. 1039–1056, 1994.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2 ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2011. 488 p.

MUKHOPADHYAY, R. *et al.* Whey processing with chitosan and isolation of lactose. **Process. Biochem**, v. 39, p. 381-385, 2003.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. ARTMED Editora S.A, 2014, 1312 p.

PERLINGEIRO, C. A. G. **Engenharia de processos: análise, simulação, otimização e síntese de processos químicos**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2005.

PROZYN. Produtos com baixa lactose. Informação técnica. São Paulo, 2010.

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

SANTOS, J. C. *et al.* **Determinação de açúcares redutores presentes em amostras do**

leite comercializadas no município de Itaperuna – RJ. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Técnico Integrado em Química) - Instituto Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2019.

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

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Adv. Synth. Catal.** v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SZYMANSKA K. *et al.* Application and Properties of Siliceous Mesostructured Cellular Foams as Enzymes Carriers to Obtain Efficient Biocatalystis. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 99, p. 167-175, 2007.

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

UZUNIAN, A; BIRNER, E. **Biologia**. 2. ed. São Paulo: Harba, 2004.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. da. **Características do leite**. Boletim Técnico, PIE-UFES, n. 01007, Ed. 26 ago. 2007. Disponível em: <http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf>. Acesso em: 8 set. 2021.

VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ZADOW, J. G. Lactose: properties and uses. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 11, p. 2654-2679, 1984.

ZHOU, Q. Z.; CHEN, X. D.; LI, X. Kinetics of Lactose Hydrolysis by β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* Immobilized on Cotton Fabric. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 127-133, 2003.

APÊNDICE A - ROTINAS DESENVOLVIDAS EM SCILAB

A.1 Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima livre e sem inibição

```

clear
clc

function df=bmreator(t,C)
    df = -k*Cenz*C/(Km+C);           //BM de lactose sem inibição
endfunction

// Parâmetros cinéticos
k = 4.9e-4;           // Constante cinética [mol/(mg min)]
Km = 7.7e-2;        // Constante saturação sem inibição [mol/L]

// Propriedades do meio reacional
xA0 = 0.042;        // Fração mássica lactose inicial [-]
ro = 1.03e3;        // Massa específica do leite [g/L]
MMlac = 342.3;      // Massa molar lactose [g/mol]
CA0 = xA0*ro/MMlac; // Concentração inicial lactose
[mol/L]

// Dados do reator
V = 300;            // Volume do tanque [L]
X = 0.976;          // Conversão desejada
Cd = CA0*(1-X);     //Concentração lactose desejada
[mol/L]de acordo com "Isento de lactose" - RDC N° 460)
Cenz = 7;           // Conc enzima [mg/L]

// Resolvendo o PVI
t = 0:20:700;      // Tempo de batelada [min]
C = ode (CA0,0,t,bmreator); // Resolve o PVI

//Plotar gráficos
plot (t,C,'-k',[0 t($)],[Cd Cd],'--b')
```

```

xlabel ('t (min)')
ylabel ('C (mol/L)')
legend ('Lactose (sem inibição)', 'Concentração
desejada', 1)

```

A.2 Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima livre e com inibição

```

clear
clc

function df=bmreator(t,f)
    CLs = f(1);
    CLc = f(2);
    CG = f(3);
    dLs = -k*Cenz*CLs/(Km+CLs);           //BM de lactose sem
inibição
    dLc = -k*Cenz*CLc/(Kmi*(1+CG/Ki)+CLc); //BM de lactose
com inibição
    dG = k*Cenz*CLc/(Kmi*(1+CG/Ki)+CLc); //BM de galactose
com inibição
    df = [dLs dLc dG];
endfunction

// Parâmetros cinéticos
k = 4.8e-4;           // Constante cinética [mol/(mg min)]
Km = 7.7e-2;        // Constante saturação sem inibição [mol/L]
Kmi = 5.6e-3;       // Constante de M-M, considerando a
inibição [mol/L]
Ki = 4.2e-3;        // Constante de inibição pela galactose
[mol/L]

// Propriedades do meio reacional
xA0 = 0.042;        // Fração mássica lactose inicial [-]
ro = 1.03e3;        // Massa específica do leite [g/L]
MMLac = 342.2;      // Massa molar lactose [g/mol]

```

```

CA0 = xA0*ro/Mmlac;          // Conc inicial lactose [mol/L]

// Dados do reator
V = 300;                      // Volume do tanque [L]
X = 0.976                      // Conversão desejada (Isento de lactose
- RDC N° 460) [-])
Cenz = 7;                      // Concentração enzima [mg/L]

// Resolvendo o PVI
t = 0:20:700;                 // Tempo de batelada [min]
y0 = [CA0;CA0;0]              // Vetor de condições iniciais, de
acordo com a function
y = ode (y0,0,t,bmreator);     // Resolve o PVI
CLs = y(1,:);                 // Primeira linha: conc. de lactose para a
cinética sem inibição
CLc = y(2,:);                 // Segunda linha: conc. de lactose para a
cinética com inibição
CG = y(3,:);                  // Terceira linha: conc. de galactose para
a cinética com inibição
Xs = (CA0-CLs)/CA0;           //Conversão para o caso sem inibição
Xc = (CA0-CLc)/CA0;           //Conversão para o caso com inibição

//Plotar gráficos
plot (t,CLs,'-r',t,CLc,'-b',[0 t($)], [0.003 0.003],'--k')
xlabel ('t (min)')
ylabel ('Concentração (mol/L)')
legend ('Sem inibição','Com inibição','Concentração
desejada',4)

```

A.3 Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e sem inibição

```

clear
clc

```

```

function df=bmreator(t,C)
    df = -kCenz*C/(Km+C);           // BM de lactose sem inibição
endfunction

// Parâmetros cinéticos
    kCenz = 1.081e-2;               // Constante cinética [mol/(L
min)]
    Km = 1.7297e-1;                // Constante saturação sem inibição
[mol/L]

// Propriedades do meio reacional
    xA0 = 0.042;                   // Fração mássica lactose inicial [-]
    ro = 1.03e3;                   // Massa específica do leite [g/L]
    MMLac = 342.3;                 // Massa molar lactose [g/mol]
    CA0 = xA0*ro/MMLac;            // Conc inicial lactose [mol/L]

// Dados do reator
    V = 300;                        // Volume do tanque [L]
    X = 0.976;                      // Conversão desejada
    Cd = CA0*(1-X);                // Concentração lactose
desejada [mol/L] (Isento de lactose - RDC N° 460)

// Resolvendo o PVI
    t = 0:20:700;                  // Tempo de batelada [min]
    C = ode (CA0,0,t,bmreator);    // Resolve o PVI

//Plotar gráficos
    plot (t,C,'-k',[0 t($)],[Cd Cd],'--b')
    xlabel ('t (min)')
    ylabel ('C (mol/L)')
    legend ('Lactose (sem inibição)', 'Concentração
desejada',1)

```

A.4 Rotina para simulação da hidrólise da lactose pela enzima imobilizada e com inibição

```

clear
clc

function df=bmreactor(t,f)
    CLs = f(1);
    CLc = f(2);
    CG = f(3);
    dLs = -kCenz*CLs/(Km+CLs);           // BM de lactose
sem inibição
    dLc = -kCenzi*CLc/(Kmi*(1+CG/Ki)+CLc); //BM de lactose
com inibição
    dG = kCenzi*CLc/(Kmi*(1+CG/Ki)+CLc); // BM de galactose
com inibição
    df = [dLs dLc dG];
endfunction

// Parâmetros cinéticos
    kCenz = 1.081e-2;           // Constante cinética sem
inibição[mol/(L min)]
    kCenzi = 1.839e-2;        // Constante cinética com
inibição[mol/(L min)]
    Km = 1.7297e-1;           // Constante saturação sem
inibição [mol/L]
    Kmi = 1.7495e-1;          // Constante de M-M, considerando
a inibição [mol/L]
    Ki = 1.7329e-1;           // Constante de inibição pela
galactose [mol/L]

// Propriedades do meio reacional
    xA0 = 0.042;              // Fração mássica lactose inicial [-]
    ro = 1.03e3;              // Massa específica do leite [g/L]
    MMLac = 342.2;           // Massa molar lactose [g/mol]

```

```

CA0 = xA0*ro/MMLac;           // Conc inicial lactose [mol/L]

// Dados do reator
V = 300;                       // Volume do tanque [L]
X = 0.976                       // Conversão desejada (Isento de
lactose - RDC N° 460) [-])

// Resolvendo o PVI
t = 0:20:700;                  // Tempo de batelada [min]
y0 = [CA0;CA0;0]              // Vetor de condições iniciais, de
acordo com a function
y = ode (y0,0,t,bmreator);     // Resolve o PVI
CLs = y(1,:);                  // Primeira linha: conc. de
lactose para a cinética sem inibição
CLc = y(2,:);                  // Segunda linha: conc. de
lactose para a cinética com inibição
CG = y(3,:);                   // Terceira linha: conc. de
galactose para a cinética com inibição
Xs = (CA0-CLs)/CA0;           //Conversão para o caso sem
inibição
Xc = (CA0-CLc)/CA0;           //Conversão para o caso com
inibição

//Plotar gráficos
plot (t,CLs,'-r',t,CLc,'-b',[0 t($)], [0.003 0.003],'--k')
xlabel ('t (min)')
ylabel ('Concentração (mol/L)')
legend ('Sem inibição','Com inibição','Concentração
desejada',1)

```