

## CINÉTICA DE INIBIÇÃO POR GALACTOSE E GLICOSE NA HIDRÓLISE DE LACTOSE POR $\beta$ -GALACTOSIDASE EM MASSA DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

### Galactose and glucose inhibition kinetics of lactose hydrolysis by $\beta$ -galactosidase in permeabilized cell mass of *kluveromyces lactis*

Edimar A. F. Fontes<sup>1</sup>  
Flávia M. L. Passos<sup>2</sup>  
Frederico J. V. Passos<sup>3</sup>  
Paulo Rogério Fontes<sup>1</sup>

#### RESUMO

O efeito de diferentes concentrações de galactose, glicose e de mistura de galactose e glicose na cinética de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase utilizando células permeabilizadas de *Kluveromyces lactis* como biocatalisador foi realizado. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C), utilizando uma suspensão de 1mg/ml de células permeabilizadas em tampão fosfato na mistura de reação. Para o efeito de galactose na atividade da enzima, foram combinadas diferentes concentrações de lactose (0, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 mM) com diferentes concentrações de galactose (0, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 mM). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro DU em 510 nm pela medida de glicose liberada. As unidades de absorvâncias foram transformadas em mM de glicose, através de uma curva de calibração apropriada. Durante os estudos do efeito de galactose sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase, foi utilizado um programa estatístico de computador que auxiliou no cálculo dos coeficientes cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ ) de forma precisa e correta e também ajudou na escolha e definição de um modelo matemático mecanístico aplicável no entendimento do processo de hidrólise de lactose levando em consideração a forma de inibição causado pela presença de galactose. O tipo de inibição competitiva ou não-competitiva foi definido pelo menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo pelo programa SAS-NILN. Os coeficientes cinéticos  $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$  também estimadas pelo mesmo programa, corresponderam respectivamente a  $0,291 \pm 0,01$  mM/min;  $2,536 \pm 0,412$  mM e  $10,88 \pm 8,86$  mM no intervalo de confiança de 95%. O tipo de inibição causado pela presença de galactose foi competitiva para  $\beta$ -galactosidase de *Kluveromyces lactis*.

**Palavras-chave:** Cinética de inibição; galactose; hidrólise de lactose

#### 1 INTRODUÇÃO

Lactases microbianas têm sido intensamente aplicadas na hidrólise de lactose do leite e do soro de queijo. Lactases neutras (atividade ótima em pH 6,0 a 7,0) originam-se de leveduras, principalmente *Kluveromyces fragilis* e *Kluveromyces lactis*, que são mais adequadas para hidrólise da lactose do leite e de soros neutros segundo Holsinger et al., 1991 citados por VOGET et al. (1994). A hidrólise enzimática de lactose em glicose e galactose pela  $\beta$ -galactosidase tem várias vantagens: i) nutricionais - no preparo de

leite com lactose hidrolisada, sem alterar as características físicas e nutricionais do leite para ser consumido por pessoas que são incapazes de digerir a lactose; ii) tecnológicas - no processamento de derivados de leite concentrado ou congelado. A glicose e a galactose são mais solúveis que a lactose e o poder adoçante da mistura dos dois açúcares obtido pela hidrólise da lactose corresponde a 70% do poder adoçante da sacarose, contra 40% da lactose, fazendo os produtos concentrados mais aceitáveis e o soro de leite um adoçante que pode ser usado em sorvetes, iogurtes, e outros produtos; iii) ecológico - no

1 Professores DS, Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Rio Pomba-MG;  
2 Professora PhD, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG;  
3 Professor PhD - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

aproveitamento do soro de leite, um subproduto da fabricação de queijos, cujo o efluente constitui um grande problema de poluição ambiental (DBO de 30.000 - 50.000 ppm). Comercialmente importante é o fato de poucos microrganismos crescerem em lactose, enquanto que a grande maioria utiliza de preferência os açúcares da hidrólise e consequentemente aumentam a produção de álcool e ácido em produtos fermentados (SISO et al., 1994). A eficiência do processo de hidrólise de lactose depende da cinética de reação e esta pode ser influenciada por vários fatores químicos e físicos tais como a concentração de substratos, produtos, enzimas, cofatores, pH, temperatura, e cisalhamento. Um ativador ou *modulador* positivo que pode combinar com a enzima alterando sua atividade catalítica. Um *inibidor* ou um modulador negativo diminui a atividade da enzima (LEE, 1992). Dependendo de como o inibidor se liga à enzima, dos complexos formados e das constantes das etapas das reações, o modelo de inibição pode ser classificado como: competitivo, não-competitivo e misto (BAILEY e OLLIS, 1986). Os inibidores competitivos têm uma forte semelhança estrutural com o substrato, e ambos inibidor e substrato competem pelo sítio ativo da enzima. A formação de um complexo inibidor-enzima reduz a quantidade da enzima disponível para interação com o substrato, e como resultado, a velocidade da reação diminui. Um inibidor competitivo, normalmente combina reversivelmente com a enzima. Portanto, o efeito do inibidor pode ser minimizado pelo aumento da concentração de substrato, a não ser que o próprio aumento da concentração de substrato iniba a reação. Inibidores não-competitivos interagem com enzima em várias maneiras diferentes. Eles podem se ligar reversivelmente e irreversivelmente no sítio ativo ou em algumas outras regiões na enzima. Em qualquer caso, o complexo resultante é inativo. Variações no mecanismo de inibição não-competitiva são possíveis. Um dos casos é quando complexo substrato-inibidor-enzima pode ser decomposto para produzir um produto e um complexo inibidor-enzima. Nesse caso, é conhecido como inibição parcialmente competitiva (LEE, 1992). Há evidências de que a  $\beta$ -galactosidase seja uma enzima alostérica, regulada por um processo de retroinibição, ou seja, o produto final da reação inibe a enzima catalizadora. Assim, à medida que a concentração dos produtos finais da reação aumenta, a atividade dessa enzima diminui (FONTES, 1998; FONTES, 2001). O modelo cinético que tem sido mais usado para descrever a hidrólise enzimática da lactose é o modelo da inibição competitiva por galactose (SCOOT et al., 1985):

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

No presente trabalho foi estudado o efeito de diferentes concentrações de galactose, glicose bem como os efeitos combinados de galactose e glicose sobre a velocidade de hidrólise da lactose. Uma equação matemática mecanística foi proposta para hidrólise de lactose utilizando células de *Kluyveromyces lactis* permeabilizadas como biocatalisador.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Microbiologia (DMB), instalados no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Computação do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1 Nomenclatura

Os seguintes termos foram usados:

[S] = concentração de lactose em milimolar (mM);

[I] = concentração do inibidor (galactose) em milimolar (mM);

V = velocidade de reação em milimolar de glicose/minuto;

Os seguintes coeficientes foram usados:

$V_{\max}$  = velocidade máxima de reação em milimolar de glicose/minuto;

$K_m$  = constante de Michaelis-Menten em milimolar (mM);

$K_i$  = constante de inibição em milimolar (mM);

### 2.2 Células permeabilizadas

Aliquotas de 3 ml da cultura pré-ativada foram transferidas para *fernabacks* de 2800 ml contendo 1 litro de soro estéril UF. Após aproximadamente 16-18 horas de crescimento a 30 °C sob agitação a 150 rpm, que correspondeu ao início da fase estacionária, fase de máxima atividade de enzima por célula, obteve-se as células de *Kluyveromyces lactis* com Densidade Óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) da cultura nessa fase que correspondeu a 3,45. As células de *Kluyveromyces lactis* foram centrifugadas a 4060 x g por 10 minutos (RC5C Sorvall Instruments) sob refrigeração (5-7°C). O precipitado foi ressuscitado em 100ml de etanol 50 % (Merck) e agitado por 15 minutos em agitador magnético (Wheaton Biostir 4) para permitir um maior contato das células com o etanol. Novamente, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada para retirada do excesso de álcool. O precipitado obtido foi submetido à secagem a uma temperatura de aproximadamente 30 °C, por cerca de 1 hora, sob ventilação, até se obter uma massa de células secas. Esta massa de células permeabilizadas,

após ser macerada, foi colocada dentro de um frasco de vidro e armazenada sob refrigeração (4 °C).

### 2.3 Efeito da Galactose na atividade de $\beta$ -Galactosidase

Preparou-se uma suspensão estoque de 6mg/ml de células permeabilizadas em tampão fosfato. Soluções de lactose (Sigma) e galactose (Sigma), a partir das soluções estoques de 480 mM, foram preparadas de forma que as concentrações no volume final da reação fossem iguais à 0; 1; 5; 10; 20; 30; 40 mM de lactose ou galactose em todas as combinações possíveis dessa. Como reator, foi utilizado a própria cubeta do espectrofotômetro, onde o volume final da reação foi de 3,0 ml: 0,5 ml da solução de célula permeabilizada; 0,25 ml de lactose; 0,25 ml de galactose; 2ml do reagente GOD-PAP®. As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro Beckman DU®. Um gráfico da absorvância a 510nm com o tempo, para cada combinação, foi obtido. A inclinação da reta apresentada por cada curva correspondia as velocidades iniciais para cada combinação de lactose e galactose. Partindo da curva de calibração de glicose as unidades de absorvâncias foram transformadas em mM de glicose.

### 2.4 Estimativas dos Coeficientes Cinéticos

Para análise e estimativa dos coeficientes cinéticos ( $V_{\max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ ) os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS ( Statistical Analysis System), através do procedimento NLIN ( Regressão Não-Linear) utilizando o método iterativo Marquart. As seguintes equações foram utilizadas no programa : Michaelis-Menten (1) e suas equações derivadas para inibição competitiva (2) e inibição não-competitiva (3):

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{\max} S}{S + K_m \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (2)$$

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)} \quad (3)$$

A melhor estimativa dos coeficientes cinéticos e do tipo de inibição causado pela

presença de galactose foi definida pelo menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo da regressão.

### 2.5 Efeito de Glicose na Atividade de $\beta$ -Galactosidase.

Foram testados ausência e presença de 3 níveis de glicose (0; 10; 30 e 50mM), totalizando 4 reatores com uma concentração fixa de lactose de 100 mM. Os volumes de lactose e glicose para o preparo dessas reações foram retiradas de uma solução estoque de 300 mM de lactose e 300 mM de glicose diluídos em tampão fosfato. Adicionou-se em cada reator 30 mg de massa de células permeabilizadas, com uma concentração no volume final de reação de 1mg/ml. Completou-se o volume de reação com tampão fosfato. Foram utilizados 4 frascos erlenmeyers de 50 ml como reatores contendo cada um 30 ml de mistura de reação. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente (25°C), sob agitação. Foram retiradas 500µl de amostra de cada reator a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com 500µl de TCA (ácido tricloroacético) 4,5%. As amostras foram armazenadas sob congelamento para posterior análise. No momento da análise, as amostras foram descongeladas, centrifugadas (Marathon micro A) a 9000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante diluído em água ultrapura. As concentrações de glicose, lactose e galactose foram Cromatografia Líquida de Alto Desempenho no equipamento HP 1050M (Hewlett Packard) utilizando coluna HPX 87 H(Bio Rad) e detector de índice de refração. Os carboidratos foram eluídos da coluna com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M num fluxo de 0,7 ml/min e temperatura de 60 °C.

### 2.5 Efeito combinado de Galactose e Glicose na Atividade da $\beta$ -Galactosidase

Foram testados 3 níveis de glicose e de galactose (10; 30 e 50mM), totalizando 9 combinações. A concentração de lactose de 100 mM foi a mesma em todas as combinações. Os volumes de lactose, glicose e galactose para o preparo dessas reações, foram retirados de uma solução estoque de 300 mM de cada açúcar diluídos em tampão fosfato. Adicionou-se em cada reator 30mg de massa de células permeabilizadas, com uma concentração no volume final de reação de 1mg/ml. Completou-se o volume de reação com tampão fosfato. Foram utilizados 9 frascos erlenmeyers de 50 ml como reatores contendo cada um 30 ml de mistura de reação sob agitação. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente

(25°C). Foram retiradas 500µl de amostra de cada reator a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com adição de 500µl de TCA 4,5% e pH = 1,0. As amostras foram armazenadas sob congelamento para posterior análise. Para a análise dos conteúdos de lactose, glicose e galactose, foi utilizado o procedimento descrito no item 2.4.

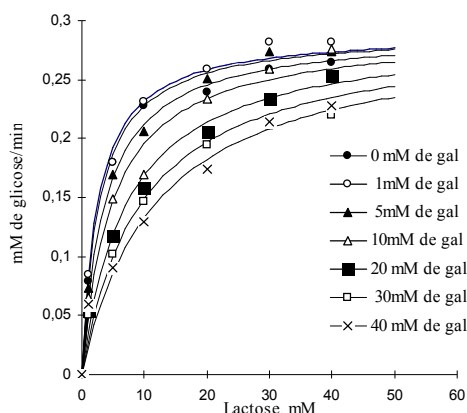
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito da Galactose na atividade de β-Galactosidase

O efeito de diferentes concentrações de galactose na atividade de β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* está representado na Figura 1. Os símbolos representam as velocidades iniciais para cada combinação lactose e galactose e as linhas foram calculadas a partir do modelo de inibição competitiva

(Figura 1). Os valores dos coeficientes cinéticos estimados  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ , estão apresentados na Tabela 1. Foi verificado que a presença de galactose no meio afetou a atividade de β-galactosidase na hidrólise da lactose. A definição do tipo de inibição causada pela galactose foi baseada no menor valor apresentado pela soma de quadrados do resíduo da regressão. A galactose foi um inibidor competitivo da reação como verificado por outros autores. Segundo BORGLUN e STERNBERG (1972), 20,8 mM de galactose reduziu em 37% a atividade hidrolítica da lactase de *Aspergillus foetidus*. GREENBERG e MAHONEY (1982) verificaram que a atividade da β-galactosidase de *Streptococcus thermophilus* foi afetada pela galactose de forma competitiva e o valor de  $K_i$  foi igual a 60 mM. O método utilizado para estimar os coeficientes cinéticos foi a linearização da equação cinética originando o gráfico de Lineweaver-Burk de 1/v versus 1/s.

Segundo DICKSON et al. (1979) o valor de



**Figura 1** - Efeito da concentração de substrato na Cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase na presença de diferentes níveis de galactose. Dados experimentais (●) e ajuste (¼) ao modelo de Inibição Competitiva (Regressão não-linear SAS).

**Tabela 1** - Valores estimados dos coeficientes cinéticos pelas equações de linearização dos modelos tradicionais e regressão não-linear pelo procedimento NLIN do Sistema SAS (método iterativo Marquardt).

	$V_{m\acute{a}x}$ . (mM/min)	$K_m$ , mM	$K_i$ , mM	SQ do Resíduo da regressão
Modelo de Michaelis-Menten				
Lineawear-Burk	0,278	2,525	-	0,0081
Langmuir	0,281	2,721	-	0,0074
Eadie-Hosftee	0,275	2,551	-	0,0079
Regressão não-linear	0,280	2,609	-	0,0006
Competitiva	0,291	2,536	10,88	0,0256
Não-Competitiva	0,320	4,538	91,393	0,0479

$K_m$  para *Kluyveromyces lactis* foi 1,6 mM quando o substrato foi ONPG e 16,8 mM quando o substrato foi lactose. Segundo OHMIYA et al. (1977) os coeficientes cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  foram 0,33mM/min e 30mM respectivamente estimados pelo gráfico de Lineweaver-Burk e o tipo de inibição causado pela galactose sobre a enzima de *Kluyveromyces lactis* foi competitiva. CHAMPLUVIER et al. (1988) estimaram os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  para lactase de *K. lactis* em  $4,2 \pm 0,2$  mM e  $3,8 \pm 0,1$  U<sub>ONP</sub>.mg<sup>-1</sup> peso seco respectivamente pelo gráfico de Eadie-Hofstee. Através do método iterativo, de um procedimento de regressão não-linear descrito por Barlow (1983) os mesmos autores estimaram  $K_m$  em  $4,2 \pm 0,1$  mM e  $V_{max}$  em  $3,71 \pm 0,02$  U<sub>ONP</sub>.mg<sup>-1</sup> peso seco. SAITO et al., 1994 utilizando um mutante de *Escherichia coli* com uma enzima termoestável, estimaram o valor de  $K_m$  em 2mM e  $K_i$  em 14,7 mM (pH 6,0 e 78°C) pelo gráfico de Dixon e o mesmo tipo de inibição competitiva, causado pela galactose. Também foi observado no trabalho de HENG et al. (1994) esse tipo de inibição causado pela galactose sobre a enzima imobilizada de *Escherichia coli* e os coeficientes cinéticos foram determinados pela equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva. Os valores variam entre 0,309 a 0,263 μmol/min para  $V_{max}$ ; 4,34 a 2,98 μmol/ml para  $K_m$  e 34 a 82 μmol/ml para  $K_i$ . De acordo com os resultados reportados, verifica-se a ampla faixa de variações dos coeficientes. No presente trabalho, nas condições descritas, foram estimados valores de 0,291mM/min; 2,536 mM e 10,88mM para  $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ , respectivamente. A vantagem da utilização de programas de computadores tem sido vista como uma melhor forma na estimativa dos coeficientes cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ ) em comparação com os métodos tradicionais de linearização propostos para a equação de Michaelis-Menten e suas equações derivadas (FONTES, 2001 e 1998). Com o uso de programas estatísticos, como SAS, podemos determinar os valores mais prováveis e precisos das constantes de reação e ao mesmo tempo definir o modelo que mais se ajusta aos dados experimentais. Segundo SHUKLA et al. (1993) no planejamento de reatores de enzimas, o tipo de inibição por produto deve ser levado em consideração. No caso de modelos baseados em inibição competitiva, o aumento na concentração de substrato pela pré-concentração ou adição de substrato fresco nos reatores de bateladas ou contínuo poderá aumentar a hidrólise da lactose. Conforme representado na Figura 2, a atividade da enzima não foi afetada pela glicose nas concentrações testadas.

### 3. 3 Efeito combinado de Galactose e Glicose na Atividade da β-Galactosidase.

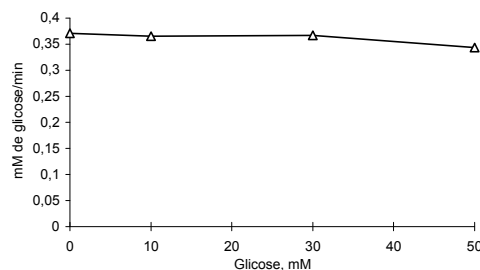
A Tabela 2, mostra a influência da presença da mistura de galactose com glicose em várias

concentrações, na velocidade de hidrólise de lactose. Assumindo,

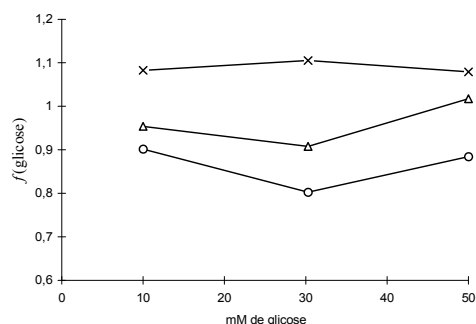
$$V = f \text{ Galactose} + f \text{ Glicose}$$

e o modelo proposto no presente trabalho para estimar o efeito da presença de galactose na velocidade da reação ( $f$ (galactose)), é possível estimar o efeito independente da glicose:

$$f \text{ Glicose} = \frac{V_{ob}}{f \text{ Galactose}}$$



**Figura 2** - Efeito da concentração de glicose na cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase (Concentração de lactose de 100mM).



**Figura 3** - Efeito dos valores de  $f$ (glicose) para as diferentes condições iniciais de reação na presença de galactose. (x) galactose = 10 mM, (Δ) galactose = 30 mM e (o) galactose = 50 mM.

A Figura 3 apresenta os valores  $f$ (glicose) para as diferentes condições iniciais de reações. Não é possível se observar nenhuma tendência de efeito inibidor na velocidade da reação devido a presença de glicose. A presença de galactose na mistura de reação afeta a velocidade de hidrólise da lactose.

Estes resultados comprovaram os resultados anteriores, no qual concentrações de glicose na faixa de 10 a 50 Mm não tem efeito inibidor.

**4 CONCLUSÃO**

A influência dos produtos (glicose e galactose) sobre a velocidade de hidrólise de lactose por uma massa de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* e as estimativas dos coeficientes cinéticos  $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$  utilizando um programa estatístico foram realizados. O efeito de inibição competitiva por galactose foi observado e a glicose não afetou a velocidade de hidrólise da lactose nas concentrações testadas. Com o objetivo de definir uma equação matemática mecanística capaz de descrever a hidrólise de lactose, sugerimos que:

$$\frac{d \text{ Lactose}}{dt} = f \text{ Galactose}, \text{ ou seja}$$

$$\frac{d \text{ Lactose}}{dt} = \frac{V_{max} S}{S + K_m + I \frac{K_m}{K_i}}$$

Os valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$  utilizados para esse modelo foram respectivamente  $0,291 \pm 0,01$  mM/min;  $2,536 \pm 0,412$  mM e  $10,88 \pm 8,86$  mM.

**ABSTRACT**

The effect of different galactose concentrations, glucose and of galactose mixture and glucose in the kinetics of lactose hydrolysis for  $\beta$ -galactosidase using permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis* as biocatalisador was accomplished. The experiments were accomplished in room temperature (25°C), using a suspension of 1mg/ml of permeabilized cell mass in phosphate buffer in the reaction mixture. For the galactose effect in the activity of the enzyme, they were different combined lactose concentrations (0, 1, 5,

10, 20, 30 and 40 mM) with different galactose concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 30 and 40 mM). The reaction was accompanied in spectrophotometer DU in 510 nm for the measure of liberated glucose. The units of absorbance were transformed in glucose (mM), through a curve of appropriate calibration. During the studies of the galactose effect about the activity of the  $\beta$ -galactosidase, was used a statistical program of computer that aided in the calculation of the kinetic coefficients ( $V_{max}$ ,  $K_m$  and  $K_i$ ) in a necessary and correct way and it also helped in the choice and definition of a model mechanistical mathematical applicable in the understanding of the process of lactose hydrolysis taking into consideration the inhibition form caused by the galactose presence. The inhibition competitive or no-competitive was defined by the smallest value presented by the residual sum of squares using the Marquardt iterative method of non-linear regression (NLIN) program of the statistical analysis system (SAS). The kinetic coefficients  $V_{max}$ ,  $K_m$  and  $K_i$  also dear for the same program, corresponded respectively to  $0,291 \pm 0,01$  mM/min;  $2,536 \pm 0,412$  mM and  $10,88 \pm 8,86$  mM in the interval of trust of 95%. The inhibition type caused by the galactose presence was competitive for  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces lactis*.

**Keywords:** Inhibition kinetics; galactose, lactose hydrolysis.

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAILEY, J.E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw, 1986. 567p.

BORGLUM, G. B., STERNBERG, M. Z. Properties of a fungal lactase. **Journal of Food Science**. 1972. 37:619-622.

**Tabela 2** - Influência das concentrações de glicose e galactose na velocidade de hidrólise de lactose.

glicose,mM	galactose, mM	$V_{ob}$ (mM/min)	f (galactose)*	f (glicose)**
10	10	0,3005	0,2775	1,083
30	10	0,3066	0,2775	1,105
50	10	0,2994	0,2775	1,079
10	30	0,2534	0,2656	0,954
30	30	0,2411	0,2656	0,908
50	30	0,2702	0,2656	1,017
10	50	0,2298	0,2548	0,9019
30	50	0,2044	0,2548	0,8022
50	50	0,2253	0,2548	0,8843

\*  $f \text{ Galactose} = \frac{V_{max} S}{S + K_m + K_i \frac{I}{K_m}}$  Assumiu-se os valores dos coeficientes cinéticos para inibição competitiva da Tabela 1 e  $S = 100$ mM.

\*\*  $f \text{ Glicose} = \frac{V_{ob}}{f \text{ Galactose}}$

- CHEN, K-C., J-H HOUNG, LING, A. C. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. **Enzyme Microb. Technol.** 1985. 7: 510- 514.
- CLAMPLUVIER, B., KAMP, B., ROUXHET, P.G. Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10:611-617.
- DICKSON, R.C., DICKSON, L. R., MARKIN, J. S. Purification and properties of inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1979. Volume 137, No 1. 51-61.
- FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J.V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.
- FONTES, E. A. F. **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998.79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- GREENBERG, N. A., MAHONEY, R. R. Production and Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Journal Food Science**. 1982. 47:1824-1835.
- HENG, M. H., GLATZ, C. E. Ion Exchange Immobilization of Charged  $\beta$ -galactosidase Fusions for Lactose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 44. 745-752. 1994.
- LEE, J.M., 1992. Enzyme Kinetics. Chapter 2. In: Simple Enzyme Kinetics. Simon & Schuster Company. Englewood Cliffs, New Jersey 07632. p51
- OHMIYA K., OHASHI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 1977.33:137-145.
- POMERANZ, Y. Lactase (  $\beta$ -D-galactosidase). I. Occurrence and properties. **Food Technology**. 1964. 88-92.
- SAITO, T. Y. Y., KAWASHIMA, K., LIN, et al. Immobilization and Characterization of thermostable  $\beta$ -galactosidase from thermophilic anaerobe on a porous ceramic support. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1994. 40: 618- 621.
- SAS Institute Inc. *SAS/STAT*™ User's Guide, Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1988. 1028 p.
- SCOTT, T.C., JR., HILL C.G., AMUNDSON, C.H. Determination of steady-state behavior of immobilized  $\beta$ -galactosidase utilizing an integral reactor scheme. **Biotechnology and Bioengineering**. 15:432-445.
- SISO, M. I. G., FREIRE, A., RAMIL, E., et al., Covalent Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on Corn Grits. A System for Lactose Hydrolysis Without Diffusional Resistance. **Process Biochemistry**. 29 (1994) 7-12.
- VOGET, C. E., FLORES, M. V., FALOCI, M. M., ERTOLA, R. J. J. Effects of the Ionic Environment on the Stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. 1994. **Lebensm-Wiss. u.-Technol.** 27. 324-330.