



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS:
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA

André Rosa Martins

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS:
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E TEÓRICA

André Rosa Martins

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

Ficha Catalográfica

--

Tese defendida por André Rosa Martins e aprovada em 10 de março de 2014 pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert (orientador) – FURG

Prof^a. Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares – FURG

Prof. Dr. Luis Antonio de Almeida Pinto – FURG

Prof^a. Dr^a. Daniele Colebergue da Cunha Vanzin – IFRS

Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn – UFSM

Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert – FURG

**“Patrón, esa sombra que tiritita tras sus reses.
Huella y harapo, comiendo a veces.
Patrón, por sus intereses, ese es su peón.
Patrón, esa sombra que levanta sus galpones.
Sudor trezado con otros peones.
Patrón, por sus ambiciones, ese es su peón.”**

Aníbal Sampayo

Para todos os que sonham e lutam por um mundo sem patrões.

Agradecimentos à Chr Hansen e à Prozyn pelo apoio material e ao CNPq e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

Um afetuoso agradecimento a quem mais me incentivou e ajudou na caminhada nesse período de doutorado, minha companheira Maria Ceci. Obrigado pelo apoio e compreensão quando de minhas ausências.

Agradeço imensamente aos colegas do IFRS, em especial aos que ajudaram quando de meus deslocamentos à Rio Grande e contribuíram com leituras e sugestões que aportaram qualidade ao meu trabalho e, muito especialmente, a Cristina Costa, a Sabrina Couto e a Aline De Bona.

Muito obrigado aos professores do PPGECA pelos ensinamentos e anos de convívio, em especial pela paciência dos últimos tempos com alguém que virou um “doutorando à distância” e, muito especialmente, ao meu orientador, Prof. Carlos André, a Prof^a. Janaína, ao Prof. Pinto, a Prof^a. Leonor e a Prof^a. Eliana.

Um detido agradecimento aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, com os quais tive o privilégio de conviver nos anos de mestrado e doutorado, e, em especial, à amiga e colega Elisane.

Agradeço imensamente a Universidade Federal do Rio Grande, tanto pela acolhida quanto pela oportunidade desses anos de aprendizado e desenvolvimento profissional, em especial aos alunos de graduação que tiveram paciência para com esse aprendiz de professor nas disciplinas de estágio docência, e a todos os colegas servidores federais, docentes e técnico-administrativos, com quem convivi nesses anos de mestrado e doutorado.

Um agradecimento detido a todos que sonham e lutam para construir um mundo melhor em todos os rincões do planeta, em especial aos habitantes de uma pequena ilha que, estando sitiada e isolada a poucas milhas da costa do maior império da atualidade, teima em nos ensinar como resistir há mais de 55 anos, e, muito especialmente, ao autor da frase a seguir.

“... sean capaces de sentir en lo más hondo cualquier injusticia cometida contra cualquiera, en cualquier parte del mundo.”

Ernesto “Che” Guevara

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	14
1.1 Premissas do trabalho	15
1.2 Objetivos	18
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Oligossacarídeos	20
2.2 Oligossacarídeos no leite	21
2.3 Galacto-oligossacarídeos (GOS)	22
2.4 Intolerância à lactose	25
2.5 Processos de conversão da lactose	26
2.6 Bioprocesso simultâneo defasado (BSD)	27
2.7 Cinética da conversão enzimática da lactose e síntese de GOS	28
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	31
3.1 Artigo 1	33
3.2 Artigo 2	47
3.3 Artigo 3	65
3.4 Artigo 4	84
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS E APÊNDICES	101
Referências	102
Apêndice 1. Rotina para solução de EDOs via função ODE45 do Matlab®	108
Apêndice 2. Rotina para solução de EDOs via Runge-Kutta de ordem 4	109
Apêndice 3. Sub-rotina complementar para SME	114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - Revisão da literatura

Tabela 1: Quantidade de lactose e oligossacarídeos em leites de diferentes origens __ 22

Tabela 2: Processos para obtenção de fermentado lácteo com baixo teor de lactose __ 28

CAPÍTULO III - Desenvolvimento do trabalho

3.1 Artigo 1: Aplicação de bioprocessamento simultâneo defasado (BSD) na obtenção de galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos na conversão da lactose.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental _____ 37

Tabela 2: Análise de variância para lactose final e galacto-oligossacarídeos _____ 37

Tabela 3: Análise de variância para glicose e galactose _____ 40

3.4 Artigo 4: Modelo matemático aplicado à conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS).

Tabela 1: Condições experimentais para conversão da lactose e síntese de GOS ____ 88

Tabela 2: Valores das constantes cinéticas para ajuste as condições experimentais __ 94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - Revisão da literatura

Figura 1: Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase _____	24
Figura 2: Representação da estrutura da enzima β -galactosidase obtida de <i>K. lactis</i> _	25
Figura 3: Processo convencional de conversão da lactose em fermentados lácteos __	27
Figura 4: Representação esquemática da resposta do modelo de Michaelis-Menten__	30

CAPÍTULO III - Desenvolvimento do trabalho

3.1 Artigo 1: Aplicação de bioprocessos simultâneos defasados (BSD) na obtenção de galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos na conversão da lactose.

Figura 1: Superfície de resposta e curva de contorno para GOS _____	38
Figura 2: Superfície de resposta e curva de contorno para lactose _____	39
Figura 3: Superfície de resposta e curva de contorno para glicose _____	41
Figura 4: Superfície de resposta e curva de contorno para galactose _____	42
Figura 5: Cinéticas dos ensaios experimentais _____	43

3.2 Artigo 2: Proposta de inibição para o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten no estado transiente e sua aplicação ao processo enzimático de hidrólise de dissacarídeos.

Figura 1: Resposta para o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten _____	50
Figura 2: Resposta ao mecanismo genérico de inibição _____	53
Figura 3: Modelo de Van Boekel (2009) com inibição pelo produto _____	54
Figura 4: Modelo de Johnson (2013) para hidrólise da sacarose _____	56
Figura 5: Resposta do processo genérico para a hidrólise de dissacarídeo _____	59
Figura 6: Resposta do modelo para a variação do substrato e dos produtos _____	60
Figura 7: Resposta do processo de hidrólise com incremento no tempo _____	61
Figura 8: Resposta do modelo para hidrólise com conversão total _____	62

3.3 Artigo 3: Modelo matemático para a cinética de conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) com inibição pela glicose e pela galactose.

Figura 1: Resposta do modelo sem inibição de Kim et al. (2004)	68
Figura 2: Resposta do modelo adaptado de Rodríguez-Fernández et al. (2011)	70
Figura 3: Resposta do modelo de Palai e Bhattacharya (2013)	71
Figura 4: Resposta do modelo do presente trabalho	73
Figura 5: Resposta do modelo ($L = 100$; $E = 10$; $t = 20$ e constantes unitárias)	75
Figura 6: Resposta do modelo ($L = 100$; $E = 10$; $t = 100$ e constantes unitárias)	76
Figura 7: Resposta com conservação de massa	77

3.4 Artigo 4: Modelo matemático aplicado à conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS).

Figura 1: Resultado do modelo para ajuste aos valores experimentais (condição 1)	88
Figura 2: Resultado do modelo para a variação da enzima e seus complexos	89
Figura 3: Resultado do modelo para ajuste aos valores experimentais (condição 2)	90
Figura 4: Comparação entre as respostas do modelo para as condições 1 e 2	91
Figura 5: Resultado do modelo para ajuste aos valores experimentais (condição 3)	92
Figura 6: Resultado do modelo para ajuste aos valores experimentais (condição 4)	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BSD* : bioprocesso simultâneo defasado;
- CM_{modelo} : conservação de massa para o modelo;
- DI* : dissacarídeo galactosil galactose;
- E* : enzima livre;
- EDOs* : equações diferenciais ordinárias;
- EF* : complexo formado por enzima e frutose;
- EGa* : complexo formado por enzima e galactose;
- EGOS* : complexo formado por enzima e galacto-oligossacarídeos;
- EGu* : complexo formado por enzima e glicose;
- EI* : complexo de inibição;
- EL* : complexo formado por enzima e lactose;
- EP* : complexo formado por enzima e produto;
- ES* : complexo formado por enzima e substrato ou sacarose;
- ESI* : complexo intermediário de inibição do substrato;
- E_f (%) : erro percentual da conservação de massa, medido ao final do processamento;
- F* : frutose;
- FOS* : fruto-oligossacarídeos;
- Ga* : galactose;
- GOS* : galacto-oligossacarídeos;
- Gu* : glicose;
- HMO* : oligossacarídeos do leite humano;
- I* : substância inibidora;
- L* : lactose;
- L_f : lactose final;
- NDO* : oligossacarídeos não digeríveis;
- S* : designação genérica de substrato ou designação específica para o substrato sacarose;
- SME* : média do somatório dos erros quadráticos;
- TRI* : trissacarídeos formados por transgalactosilação;

RESUMO

O presente trabalho avaliou, na etapa experimental, um processo simultâneo de catálise e fermentação láctica visando obter um iogurte com potenciais características nutracêuticas e, na sua etapa teórica, estabeleceu uma interlocução entre a vivência experimentalista e a teoria da cinética enzimática, no que se refere à conversão da lactose e à síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS). Na abordagem experimental, para um substrato específico, avaliou-se biocatálise conduzida simultaneamente à fermentação, defasando a adição da enzima em relação ao início do processo fermentativo. A fermentação foi realizada a partir de cultura láctica liofilizada comercial contendo dois micro-organismos probióticos, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, associados aos micro-organismos característicos do iogurte, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Foi utilizado um preparado enzimático contendo β -galactosidases obtidas de duas origens distintas: *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger*. Foram avaliados os efeitos da concentração da enzima e do tempo de adição da enzima em um planejamento experimental 2². As respostas foram às concentrações, ao final do processo, de lactose, de GOS, de glicose e de galactose e a hidrólise dos galacto-oligossacarídeos ao longo do tempo. No que se refere à abordagem teórica, o presente trabalho considerou modelos matemáticos de hidrólise de dissacarídeos e conversão da lactose, em que a inibição foi representada a partir do incremento da concentração dos produtos da reação. No que se refere à conversão da lactose e síntese de GOS, o presente trabalho buscou estabelecer um modelo matemático em que a inibição ocorreu por efeito do incremento das concentrações de glicose e de galactose, comparando-o com os modelos conhecidos na literatura. Verificou-se que o desempenho do modelo obtido no presente trabalho foi robusto em relação às premissas estabelecidas. Na comparação com resultados experimentais de conversão enzimática, o modelo mostrou-se capaz de minimizar o erro e de ajustar-se aos dados experimentais.

Palavras-chave: galacto-oligossacarídeos (GOS), prebiótico, probiótico, modelagem matemática.

ABSTRACT

Lactose conversion and galactooligosaccharides synthesis: an experimental and theoretical approach

This study evaluated in the experimental stage, a simultaneous process of catalysis and lactic fermentation in order to obtain a yogurt with potential nutraceutical characteristics and, in its theoretical stage, established a dialogue between the living and the experimentalist theory of enzyme kinetics, regarding the conversion of the synthesis of lactose and galactooligosaccharides (GOS). In the experimental approach to a specific substrate, it was assessed bio-catalysis conducted simultaneously with the fermentation lagged the addition of the enzyme relative to the beginning of the fermentation process. The fermentation was performed using commercial lyophilized lactic culture containing two probiotic microorganisms, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*, associated with characteristic yogurt microorganisms, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. It was used an enzyme preparation containing β -galactosidase obtained from two different sources: *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus niger*. The effect of enzyme concentration and the time of adding the enzyme to an experimental design of 2^2 were evaluated. The responses were to the concentrations, at the end of the process, lactose, GOS, glucose and galactose, and the hydrolysis of galactooligosaccharides over time. Regarding the theoretical approach this study considered mathematical models of hydrolysis of disaccharides, as well as conversion of lactose in the inhibition was represented in the increase of the concentration of reaction products. With regard to the conversion of lactose and GOS synthesis, this study aimed to establish a mathematical model in which the inhibition occurred as a result of glucose and galactose increase, comparing it with models from the literature. It was found that the performance of the model obtained in this study was robust in relation to the premises established. In comparison with experimental results of enzymatic conversion, the model proved to be able to minimize the error and to adjust to experimental data.

Keywords: galactooligosaccharides (GOS), prebiotics, probiotics, mathematical modelling.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Premissas do trabalho

Esse trabalho de pesquisa, desenvolvido junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), avaliou a conversão da lactose e a formação de galacto-oligossacarídeos (GOS), tanto em abordagem experimental, realizada a partir de bioprocessos simultâneos de catálise e fermentação láctica, com aplicação da enzima defasada em relação ao processo fermentativo, quanto no aspecto teórico, elaborando e aplicando novo modelo matemático para representar a catálise enzimática.

O apelo por produtos com características de qualidade que apóiem ganhos fisiológicos aos consumidores, além das exigidas vantagens nutricionais, é a nova fronteira de expansão no mercado de alimentos processados. A crescente demanda por alimentos funcionais tem impulsionado o mercado de produtos lácteos no Brasil, em especial no que diz respeito a leites fermentados. A diversidade de bebidas lácteas e iogurtes, desde produtos adicionados de fibras ou elaborados a partir de culturas probióticas, têm aquecido o mercado desse segmento e impulsionado importantes esforços em pesquisa, desenvolvimento e *marketing*, em especial junto às principais empresas deste segmento em nosso país. A variedade e as alternativas de iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas com características prebióticas e probióticas, presentes nas gôndolas refrigeradas das redes de varejo no Brasil, indica o potencial de crescimento deste mercado.

As pesquisas em processos para conversão da lactose usando tecnologia enzimática sempre tiveram como objetivo o desenvolvimento de produtos com baixo teor deste dissacarídeo, seja para consumo de indivíduos intolerantes à lactose ou para evitar características tecnológicas indesejáveis, como a cristalização deste carboidrato (JURADO et al., 2002).

A intolerância à lactose atinge cerca de 70% da população adulta da América Latina, com um impacto expressivo nas comunidades originárias do continente e nos

afrodescendentes, onde esses patamares podem ser superiores a 90% (PEREIRA FILHO e FURLAN, 2004; SCHAAFSMA, 2008; SWALLOW, 2003).

A opção por desenvolver, na etapa experimental do presente trabalho, um processo para elaboração de fermentado lácteo com reduzido teor de lactose e com eventuais características simbióticas, que propicie um consórcio entre prebióticos – no presente caso, os GOS – e as culturas probióticas, está associada a essa nova realidade no mercado de alimentos, vinculada a obtenção de biomoléculas de interesse nutracêutico.

Na etapa experimental do presente trabalho foi aplicado o conceito de Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD), desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, que procurou conjugar fermentação láctica e catálise enzimática, defasando a aplicação da enzima no tempo em relação ao início da fermentação (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

A etapa teórica do presente trabalho buscou desenvolver modelos matemáticos de cinética enzimática com ênfase na identificação e representação do efeito de inibição, partindo da proposta da cinética clássica de Michaelis-Menten.

Um modelo matemático é uma representação abstrata que usa a linguagem matemática para descrever o comportamento de um sistema real. Os modelos matemáticos são usados especialmente nas ciências naturais e nas engenharias, mas também nas ciências sociais (tais como economia, sociologia e ciência política). Modelos matemáticos podem assumir muitas formas, incluindo sistemas dinâmicos, modelos estatísticos, equações diferenciais, entre outros (SEBORG, 1989).

Na modelagem matemática para conversão da lactose, em um processo de hidrólise e transgalactosilação conduzido a partir da enzima β -galactosidase, parte-se da cinética de Michaelis-Menten que descreve a velocidade de reação enzimática na condição em que a concentração de substrato é superior à concentração da enzima e a soma das concentrações da enzima e dos complexos enzimáticos formados se mantém constante ao longo do tempo de processamento (CHEN et al., 2003; KIM et al., 2004; JURADO et al., 2004; NERI et al., 2009).

Um traço comum entre a maioria dos trabalhos que apresentam modelos matemáticos para conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) é a omissão intencional da etapa de inibição para a solução do modelo. Alguns autores exibem uma etapa de inibição em seus modelos, mas retiram esta etapa na hora de comparar o modelo com valores

experimentais, argumentando que a etapa de inibição poderia ser negligenciada para a solução do processo no estado estacionário (NERI et al., 2009; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ et al., 2011).

As soluções para o problema geral da cinética enzimática no estado estacionário têm sido limitadas na ajuda aos pesquisadores, tendo em vista que os modelos gerados não se ajustam adequadamente às observações experimentais. Os inibidores são tradicionalmente caracterizados a partir do pressuposto de equilíbrio, no estado estacionário, entre o complexo enzimático de reação e o substrato. Segundo Fange e colaboradores (2011), o referido pressuposto seria válido apenas para enzimas muito ineficientes.

As soluções para os sistemas de equações diferenciais ordinárias (EDOs) representativos dos modelos cinéticos, quando da abordagem teórica do presente trabalho, serão apresentadas a partir de um processo genérico – também denominado processo pictórico.

O referido processo genérico, ou pictórico, objetiva comparar resultados de modelos distintos, sob a perspectiva de um comportamento que permita uma adequada visualização gráfica das respostas. Para tanto, parte do pressuposto da construção de uma figura composta por dois (2) gráficos: um gráfico superior, mostrando a variação da enzima livre e dos complexos enzimáticos; um gráfico inferior, mostrando a variação do substrato e do(s) produto(s).

O processo genérico fixa o valor numérico da concentração inicial do substrato como sendo superior em dez (10) vezes ao valor numérico da concentração da enzima, com a intenção de visualizar, na resposta ao final do tempo de processo, a existência de eventual convergência da soma dos valores do substrato e do(s) produto(s) ao valor de referência, ou seja, à concentração inicial do substrato. As constantes cinéticas assumem um valor unitário (1) e o tempo de processamento será o suficiente para uma adequada visualização de todo o processo.

A solução dos modelos, tanto na condição do processo genérico quanto na comparação com resultados experimentais, está descrita em rotinas e sub-rotinas elaboradas para aplicação no Matlab[®], mostradas no Apêndice do presente trabalho.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo o estudo da conversão da lactose e da síntese de galacto-oligossacarídeos usando bioprocessos simultâneos defasados, bem como a elaboração de um novo modelo matemático, baseado na cinética de Michaelis-Menten, que possa ser aplicado aos processos enzimáticos de conversão da lactose.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a conversão da lactose e a síntese de GOS em bioprocessos simultâneos defasados (BSD), a partir de leite em pó reconstituído e usando uma mistura de duas enzimas comerciais que atuam em diferentes faixas de pH.
- ✓ Propor um novo modelo matemático que descreva o processo de inibição reversível, baseado na cinética de Michaelis-Menten e aplicado à hidrólise de dissacarídeos.
- ✓ Propor um novo modelo matemático que descreva a cinética de conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos em processo enzimático.
- ✓ Construir a solução numérica dos modelos a partir de uma rotina computacional que estabeleça e apresente todos os parâmetros de avaliação do ajuste às respostas experimentais e que prescindam do uso de rotinas ou módulos computacionais que não possam ser checados.
- ✓ Aplicar o modelo elaborado às condições experimentais conhecidas, avaliando o ajuste do modelo aos resultados experimentais obtidos.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são definidos estritamente como sendo carboidratos que contêm entre 02 (dois) e 10 (dez) monossacarídeos, covalentemente ligados através de ligações glicosídicas (MEHRA e KELLY, 2006).

Os oligossacarídeos não digeríveis (NDO) ocorrem naturalmente em muitos alimentos e em tecidos vegetais, bem como são sintetizados no metabolismo de animais e micro-organismos. As propriedades biológicas e físico-químicas de seus componentes têm sido relatadas como equivalentes às fibras dietéticas, associando sua ação fisiológica com importantes aspectos da saúde humana (TUNGLAND e MEYER, 2002). Os oligossacarídeos podem ser obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catálise enzimática ou por reação química (MUSSATO e MANCILHA, 2007).

Dentre os oligossacarídeos destaca-se a inulina, cujo uso em alimentos e os efeitos fisiológicos associados aos seres humanos têm sido estudados nas últimas décadas. A inulina é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas. Atualmente é produzida via extração em raízes de chicória e de outros vegetais (RUPÉREZ, 1998).

A oligofrutose é um oligossacarídeo importante na indústria de alimentos funcionais, sendo formado por 2 a 4 unidades de frutose ligadas a um resíduo terminal de glicose (PASSOS e PARK, 2003). O termo fruto-oligossacarídeos (FOS) descreve moléculas formadas por adição enzimática de frutose à sacarose pela enzima β -frutosidase. São formados compostos como 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose, entre outros, em que as unidades de frutosil estão adicionadas à sacarose por ligação glicosídica tipo β -2,1 (TUNGLAND e MEYER, 2002).

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) são formados pela transgalactosilação da galactose por ação da enzima β -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose (MAHONEY, 1998). A rafinose (α -galacto-oligossacarídeo) é obtida de extração vegetal, em especial a partir da soja. Os xilo-oligossacarídeos são obtidos pela hidrólise parcial de polixilanos realizada pela β -xilânase. Os glico-oligossacarídeos são obtidos por transglicosilação da glicose via α -glicosidase (TUNGLAND e MEYER, 2002).

2.2. Oligossacarídeos no leite

Entre os oligossacarídeos presentes no leite destacam-se os que estão contidos no leite humano, chamados de HMO (da sigla em inglês, oligossacarídeos do leite humano). Desde os anos 50 do século passado os HMO têm sido estudados como fatores de promoção e crescimento da flora *Bifidus* em crianças. Estudos recentes associam os oligossacarídeos do leite humano à redução da adesão de leucócitos em paredes endoteliais, o que indicaria um efeito imuno regulador desses carboidratos (KUNZ e RUDLOFF, 2006). Esse efeito ocorre devido às semelhanças estruturais dos oligossacarídeos do leite humano com as glicoproteínas que formam a parede celular da mucosa (BENGMARK e ORTIZ DE URBINA, 2005).

O leite humano possui cerca de 7% de carboidratos em sua composição sendo a lactose responsável por aproximadamente 90% desse total. Uma variedade de 130 diferentes tipos de oligossacarídeos, derivados da lactose, forma uma complexa mistura de diferentes combinações, com uma concentração que varia entre 5 e 8 g/L.

Os três principais oligossacarídeos do leite humano são: β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 3'-galactosil lactose); β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (cujo nome usual é 4'-galactosil lactose) e β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose (chamado de 6'-galactosil lactose), cujas estruturas são diferenciadas pelo tipo de ligação glicosídica, respectivamente β -1,3, β -1,4 e β -1,6.

O efeito de barreira que os oligossacarídeos propiciariam junto à superfície da mucosa do intestino humano, contribuindo para minimizar a invasão e colonização de microorganismos indesejáveis a esse órgão vital, é citado como sua principal ação benéfica para a saúde humana (FOOKS e GIBSON, 2002).

Estudos feitos especificamente com oligossacarídeos do leite humano mostraram um efeito sistêmico de interação entre leucócitos e parede endotelial, o que indica que esses carboidratos contribuem para a redução de doenças inflamatórias em crianças que se alimentam do leite materno (KUNZ e RUDLOFF, 2006).

Um importante estudo indicou que oligossacarídeos associados a medicamentos “antiadesivos” foram usados de forma experimental em coelhos e ratos para reduzir os efeitos

da ação de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na mucosa do trato respiratório (RIVERO-URGELL e SANTAMARIA ORLEANS, 2001).

Em um estudo recente numa avaliação randomizada e duplo cego controlado com placebo, foi verificado que a aplicação de oligossacarídeos não reduziu a incidência de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* em 500 crianças saudáveis, indicando ser necessário avançar nos estudos sobre o efeito antiadesivo dos oligossacarídeos no trato respiratório humano (KUNZ e RUDLOFF, 2006).

A Tabela 1 apresenta a relação entre a quantidade de lactose e de oligossacarídeos em leites de diferentes origens.

Tabela 1. Quantidade de lactose e oligossacarídeos em leites de diferentes origens

Origem	Lactose (g/L)	Oligossacarídeos (g/L)
Caprino	45	0,25 – 0,30
Bovino	48	0,03 – 0,06
Ovino	48	0,02 – 0,04
Humano	68	5 – 8

Fonte: Martínez-Ferez et al. (2006)

2.3. Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Os GOS são produzidos a partir da lactose por atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase. A enzima β -D-galactosidase galactohidrolase (E.C.3.2.1.23), designada usualmente como β -galactosidase, é igualmente responsável pela reação de hidrólise da lactose, formando galactose e glicose. A β -galactosidase possui afinidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO et al., 2002).

A formação de GOS ocorre a partir de um substrato rico em lactose, notadamente o leite, o soro de leite ou uma mistura entre ambos. O acréscimo de soro de leite a uma base láctea que serve de substrato à ação da β -galactosidase implica no aumento da disponibilidade de lactose no meio, no incremento de proteína e na redução da atividade de água. A taxa de conversão da lactose aumenta com o incremento da concentração inicial do substrato, tendo em vista o efeito de redução da atividade de água na solução (PESSELA et al., 2003).

A lactose (4- α -D-galactopiranosil-D-glicose) possui duas formas em equilíbrio mutarrotacional, em decorrência do tipo de ligação glicosídica entre os seus monômeros de galactose e glicose. A β -lactose possui ligação do tipo β -1,4 e a α -lactose possui ligação do tipo α -1,4. As vantagens de obter um derivado lácteo com reduzido teor de lactose, segundo Jurado et al. (2002), são:

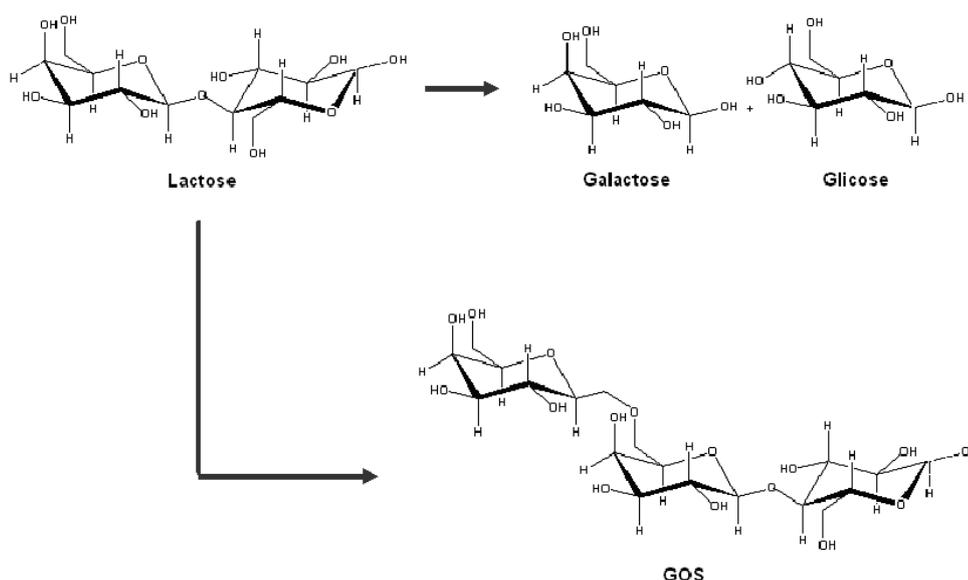
- ✓ Obtenção de produtos aptos ao consumo para grupos populacionais intolerantes à lactose;
- ✓ Formação de substâncias que favorecem o crescimento de microflora intestinal desejáveis à saúde humana, precisamente os galacto-oligossacarídeos;
- ✓ Obtenção de melhores características tecnológicas em derivados lácteos, tais como melhor solubilidade e redução de riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado;
- ✓ Obtenção de melhores características reológicas como a melhor textura e a maior cremosidade, em especial na redução do ponto de congelamento de sorvetes;
- ✓ Obtenção de melhores características sensoriais em derivados lácteos, tais como o incremento no poder dulçor, via ação dos monossacarídeos glicose e galactose;
- ✓ Formação de monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas;
- ✓ Redução da probabilidade de ocorrência da reação de Maillard, pois os galacto-oligossacarídeos obtidos não atuam como açúcares redutores;
- ✓ Maior biodegradabilidade dos efluentes da indústria láctea.

A ligação entre unidades de galactose, ou seja, a eficiência da transgalactosilação e os tipos de componentes gerados no produto final dependerão da enzima e das condições de reação (GU, 1999).

A mistura de GOS seria formada desde dissacarídeos até hexassacarídeos. A baixa efetividade da β -galactosidase em produzir oligossacarídeos de maior peso molecular é explicada pela competitividade da transgalactosilação da galactose com a hidrólise da lactose, quando da catálise enzimática em substratos ricos em lactose. A reação de transgalactosilação

será menos efetiva quanto maior o peso molecular do oligossacarídeo acceptor, o que explicaria a maior formação de di, tri e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores (MAHONEY, 1998). A Figura 1 sugere as rotas de conversão de lactose a partir da enzima β -galactosidase.

Figura 1 – Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase

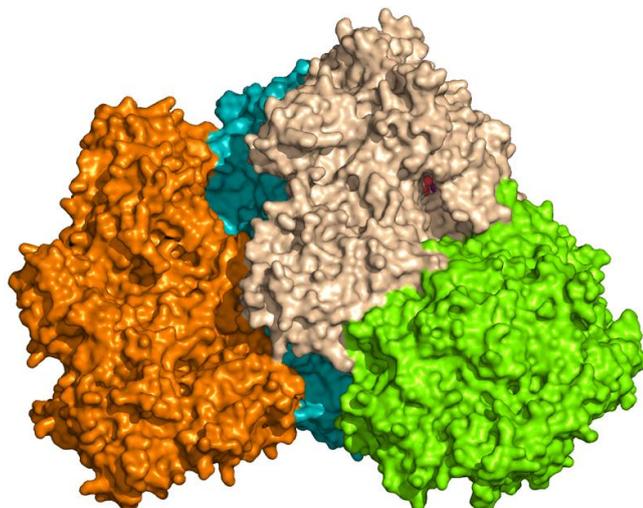


Fonte: Martins e Burkert (2009)

Preparados comerciais de galacto-oligossacarídeos são misturas de diferentes espécies de oligossacarídeos com aproximadamente 55% destes compostos em sua constituição, em torno de 20% de lactose e de 20% de glicose e uma pequena quantidade de galactose. Os GOS são muito estáveis a condições adversas de pH e temperatura. Resistem a 160°C por 10 min em pH neutro ou a 120°C por igual tempo em pH 3. Em pH 2 chegam a resistir até a 100°C por 10 min. Nesta condição a degradação da sacarose seria superior a 50% (SAKO et al., 1999).

Para Goulas et al. (2007), o incremento da concentração de glicose e galactose no meio reacional favoreceu a formação dos GOS a partir de enzima obtida de *Bifidobacterium bifidum*, desde o início da catálise até atingir-se um máximo, a partir do qual ocorreu um decréscimo na atividade de transgalactosilação. A Figura 2 representa a β -galactosidase obtida de *Kluyveromyces lactis*.

Figura 2 – Representação da estrutura da enzima β -galactosidase obtida de *K. lactis*



Fonte: Pereira-Rodríguez et al. (2010)

2.4. Intolerância à lactose

A lactose é hidrolisada em seus monômeros galactose e glicose no organismo humano por uma enzima chamada lactase. A lactase é uma enzima diretamente acoplada à mucosa intestinal humana e é também denominada lactase florizina hidrolase (E.C.3.2.1.108). Trata-se de uma molécula complexa que têm a habilidade de catalisar tanto as reações efetuadas pela E.C.3.2.1.23 (β -galactosidase) quanto às reações efetuadas pela E.C.3.2.1.62 (glicosilceramidase) (SWALLOW, 2003).

A lactase está ancorada na membrana intestinal por sua extremidade C-terminal, com a maior parte da molécula projetada para o lúmen do tubo digestivo humano. É uma grande glicoproteína com dois sítios ativos que podem catalisar a hidrólise de uma variedade de β -glicosídeos, incluindo florizina, glicosídeos flavonóides e β -galactosídeos, além da própria lactose (SWALLOW, 2003).

A atividade de lactase é maior e vital durante a primeira fase da infância dos mamíferos, quando o leite é a principal fonte nutricional do indivíduo. No homem, como em muitos mamíferos, a atividade de lactase reduz após a fase inicial da vida. Porém, em alguns grupos populacionais humanos que possuem o hábito alimentar continuado de consumo do leite, surge o que se denomina de “lactase persistente”. Pessoas que possuem essa capacidade podem usualmente digerir alto conteúdo de lactose, ao contrário dos indivíduos que são denominados intolerantes à lactose. As características que envolvem o declínio da atividade

da lactase nos humanos são estritamente genéticas (SWALLOW, 2003). A intolerância a lactose é pouco comum em crianças de origem caucasiana (brancos originários da Europa), ocorrendo em maior frequência em crianças de outras origens, como africanos, asiáticos, aborígenes da Oceania e ameríndios (ROBERFROID e DELZENNE, 1998).

Na população adulta humana os índices de intolerância a lactose são elevados, sendo estimados em 70% na América do Sul e África, podendo chegar a próximo de 100% em alguns países da Ásia, como na China e na Tailândia. Na Europa a intolerância a lactose é menor nos países escandinavos, em especial na Suécia e na Dinamarca, crescendo nas direções sul e leste do continente. Entre os suecos é de cerca de 2%, chegando a 70% nos italianos da Sicília. Nos EUA a intolerância a lactose prevalece nas comunidades afrodescendentes em cerca de 80% e chega a 53% em descendentes de latinos com origem pré-hispânica. Nos norte-americanos descendentes de caucasianos a intolerância atinge apenas 15% da população, enquanto que nos ameríndios descendentes das comunidades originais da América do Norte a incidência atinge quase 100% (SWALLOW, 2003).

Não existem dados oficiais sobre o percentual de brasileiros que sofrem desse problema, no entanto estima-se em mais de 58 milhões a população intolerante à lactose (CUNHA et al., 2007).

Pereira Filho e Furlan (2004) avaliaram a distribuição de indivíduos com intolerância à lactose na população de Joinville (SC), estudada a partir de distribuição de sexo e de faixa etária baseada no censo de 2000, a partir de um laboratório de referência do sistema de saúde do referido município. Os autores concluíram que 44,11% dos indivíduos avaliados eram intolerantes, 18,29% eram limítrofes, ou seja, mal absorvedores de lactose, e apenas 37,60% eram normais, ditos capazes de absorver 2 g de lactose por kg de massa corpórea ao dia, sem ultrapassar o limite máximo diário de 50 g de ingestão desse carboidrato. Considerando o somatório entre indivíduos intolerantes e limítrofes, têm-se 62,4% de incidência desse problema em uma cidade com indicadores sócio econômicos superiores à média do país.

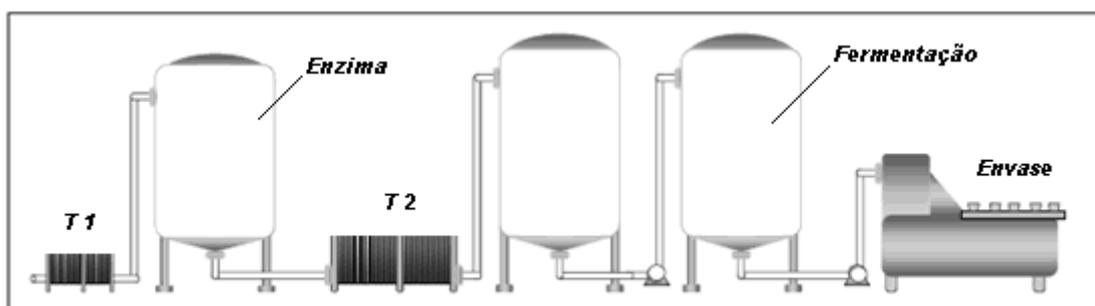
2.5. Processos de conversão da lactose

As enzimas comerciais disponíveis no mercado têm, em geral, seu intervalo de ação próximo ao pH neutro (7,0 – 6,5), sendo obtidas de leveduras *Kluyveromyces* spp., ou atuam no pH ácido (5,5 – 4,5), sendo obtidas de bolores *Aspergillus* spp. Sua aplicação na redução

da concentração de lactose em derivados lácteos é amplamente conhecida (ABU-REESH, 2000; JURADO et al., 2004).

A adição de β -galactosidase na fabricação de fermentados lácteos ocorre, usualmente, em diferentes estágios. A Figura 3 representa o processo convencional de elaboração de fermentado lácteo com reduzido teor de lactose, ocorrendo em processamento em dois estágios: em primeiro lugar, a catálise enzimática e, na sequência, a fermentação. Uma alternativa para reduzir o elevado tempo de contato da etapa enzimática nesse processo é usar sistemas que concentrem a lactose, em geral a partir de filtração em membranas (MARTINS et al., 2011).

Figura 3 – Processo convencional de conversão da lactose em fermentados lácteos



(T₁ = tratamento prévio do substrato; T₂ = tratamento final do substrato)

Fonte: Martins et al. (2011)

A concentração do substrato propicia uma maior agilidade na comparação com o processo tradicional, no entanto o investimento em imobilizado é uma importante restrição. Na prática, sistemas que operam por concentração prévia do substrato acontecem em três estágios: concentração; biocatálise e fermentação (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

2.6. Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD)

O principal resultado que se busca em um bioprocesso simultâneo defasado (BSD), onde biocatálise e fermentação se associam, é superar os inconvenientes do processo em dois ou mais estágios (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

A técnica de BSD foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, com o objetivo de avaliar a possibilidade de associação da fermentação e da catálise enzimática em uma única etapa de processamento.

A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os métodos de elaboração de fermentados lácticos com baixo teor de lactose.

Tabela 2. Processos para obtenção de fermentado lácteo com baixo teor de lactose

Processo	Estágios	Equipamento Extra	Tempo de Processo
Convencional	2	Nenhum	Catálise (30 h) + Fermentação
Substrato concentrado	3	Concentrador	Catálise (3 h) + Fermentação
BSD	1	Nenhum	Fermentação

Fonte: Martins et al. (2011)

Verifica-se na Tabela 2 que o limitante para o tempo de processo no BSD será apenas o tempo de fermentação. No processo convencional, onde ocorre inicialmente uma catálise enzimática tendo o leite fluido como substrato, o tempo de processamento tende a ser significativamente elevado. No processo em que o leite é previamente concentrado, antes da etapa de catálise, existe a necessidade de investimento em um concentrador.

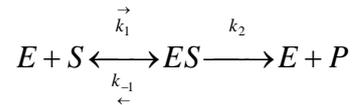
A ideia do Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD), para aplicação na elaboração de fermentados lácticos de baixo teor de lactose, foi desenvolver uma técnica de processamento em etapa única, com redução no tempo de processo e sem necessidade de investimentos em imobilizado (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

2.7. Cinética da conversão enzimática da lactose e síntese de GOS

Para proceder à avaliação das diferentes perspectivas de inibição, faz-se necessário, inicialmente, uma abordagem sobre a cinética clássica de Michaelis-Menten aplicada a um processo de catálise genérico, conforme descrito no Esquema 1, onde as constantes k_1 , k_{-1} e k_2 são as taxas de velocidade destas reações. Os demais componentes são: a concentração de

enzima, E ; a concentração de substrato, S ; a concentração do complexo enzima substrato, ES ; a concentração do produto, P .

Esquema 1 – Modelo cinético clássico de Michaelis-Menten



Na modelagem matemática das reações anteriores são obtidas as variações do substrato, da enzima, do produto e do complexo enzimático, conforme segue:

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) + k_2ES \quad (1)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1(E \cdot S) - k_{-1}ES - k_2ES \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2ES \quad (4)$$

Para a solução das equações diferenciais ordinárias (EDOs) do sistema não linear descrito acima, a principal exigência diz respeito à estrita observação à Lei de Conservação de Massas para a enzima e o complexo, através da expressão abaixo:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dES}{dt} = \frac{d}{dt}(E + ES) = 0 \quad (5)$$

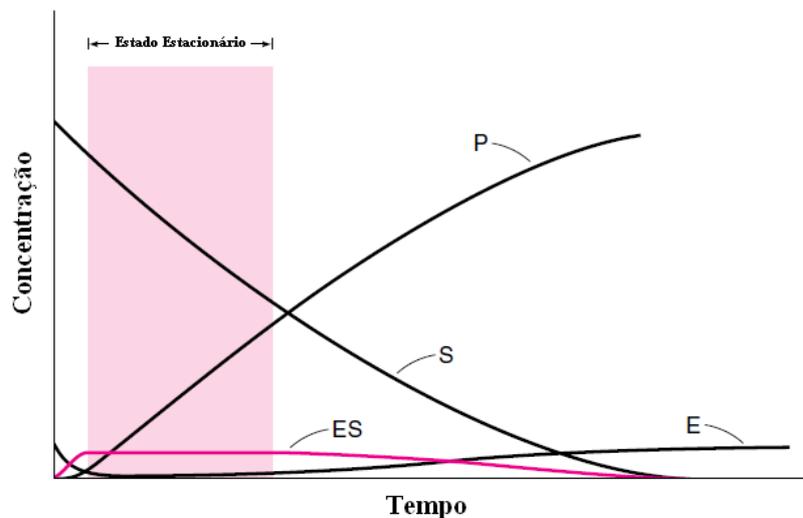
Na solução do modelo do Esquema 1, o complexo de reação ES é formado imediatamente no início da reação e, após, decresce desde um valor inicial muito próximo ao valor nominal da enzima até zero.

Numa parte expressiva do tempo de processo a variação da concentração desse complexo é pequena, indicando a possibilidade de considerar-se, nesse segmento do tempo de processo, o estado como estacionário ou ‘quase estacionário’, ou seja:

$$\frac{dES}{dt} \cong 0 \quad (6)$$

Na Figura 4 é mostrada uma resposta esquemática do modelo cinético de Michaelis-Menten com a representação do intervalo de processo onde se indica a existência do estado estacionário, especificamente na variação da enzima livre e do complexo enzimático de reação.

Figura 4 – Representação esquemática da resposta do modelo de Michaelis-Menten



Fonte: adaptado de Copeland (2000)

Os trabalhos disponíveis na literatura, via de regra, tratam a resolução da etapa de inibição a partir desse pressuposto do estado estacionário ou ‘quase estacionário’, apontando um presumido equilíbrio entre a formação e a dissociação do complexo enzima substrato (TZAFRIRI e EDELMAN, 2007; STOLERIU et al., 2004; RECHT et al., 2009; BAKALIS et al., 2012).

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

3. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido no formato de quatro (4) artigos, sendo o primeiro uma abordagem experimental a partir da aplicação de Bioprocesso Simultâneo Defasado e os demais referentes ao desenvolvimento e a aplicação de modelos matemáticos. Os títulos dos artigos são apresentados a seguir:

Artigo 1: APLICAÇÃO DE BIOPROCESSO SIMULTÂNEO DEFASADO (BSD) NA OBTENÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO DA LACTOSE.

Artigo 2: PROPOSTA DE INIBIÇÃO PARA O MODELO CINÉTICO CLÁSSICO DE MICHAELIS-MENTEN NO ESTADO TRANSIENTE E SUA APLICAÇÃO AO PROCESSO ENZIMÁTICO DE HIDRÓLISE DE DISSACARÍDEOS.

Artigo 3: MODELO MATEMÁTICO PARA A CINÉTICA DE CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) COM INIBIÇÃO PELA GLICOSE E PELA GALACTOSE.

Artigo 4: MODELO MATEMÁTICO APLICADO À CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS).

Artigo 1

APLICAÇÃO DE BIOPROCESSO SIMULTÂNEO DEFASADO (BSD) NA OBTENÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) E SEUS EFEITOS NA CONVERSÃO DA LACTOSE

Resumo: Em bioprocesso simultâneo conduzido a partir de micro-organismos probióticos e através da adição de enzimas β -galactosidasas, aplicadas com defasagem no tempo em relação ao início da fermentação, avaliou-se a conversão da lactose e a formação de galacto-oligossacarídeos (GOS). A fermentação foi conduzida a partir de cultura láctica contendo dois micro-organismos probióticos, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, associados aos micro-organismos característicos de um iogurte, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Foi utilizado um preparado enzimático contendo β -galactosidasas de origens distintas, obtidas de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus niger*. O bioprocesso simultâneo defasado (BSD) foi conduzido fixando a concentração inicial de lactose e variando a concentração de enzima e o seu tempo de adição em relação ao início da fermentação, caracterizando uma defasagem na aplicação da enzima com respeito à adição da cultura láctica. Os resultados indicaram um impacto positivo do BSD na obtenção de GOS, demonstrando que o aumento do tempo de defasagem na aplicação da enzima contribuiu para maximizar essa resposta, atingindo $4,9 \text{ g.L}^{-1}$, e para minimizar a tendência da β -galactosidase hidrolisar esses carboidratos ao longo do processo. Com respeito à concentração de lactose, o efeito do BSD foi negativo e indicou que a redução no tempo de contato da enzima implicou na menor redução do teor deste carboidrato (31,9%).

Palavras chave: catálise enzimática, conversão da lactose, fermentação láctica, GOS.

INTRODUÇÃO

As pesquisas em processos para conversão da lactose usando tecnologia enzimática sempre tiveram como objetivo o desenvolvimento de produtos com baixo teor deste dissacarídeo, seja para consumo de indivíduos intolerantes ou para evitar características tecnológicas indesejáveis, como a cristalização deste carboidrato (JURADO et al., 2002).

A intolerância à lactose atinge cerca de 70% da população mundial adulta, com um impacto expressivo nos povos originários da África, Ásia, América e Oceania, e seus respectivos descendentes, onde esses patamares podem ser superiores a 90% (SCHAAFSMA, 2008; SWALLOW, 2003).

As enzimas comerciais disponíveis no mercado têm, em geral, seu intervalo de ação próximo ao pH neutro (6,5 – 7,0), sendo obtidas de leveduras *Kluyveromyces* spp., ou atuam no pH ácido (4,5 – 5,5), sendo obtidas de bolores *Aspergillus* spp., com sua aplicação na redução do teor de lactose em derivados lácteos sendo amplamente conhecida (ABU-REESH, 2000; JURADO et al., 2004).

A adição de β -galactosidase na fabricação de fermentados lácticos de baixo teor de lactose ocorre, usualmente, em diferentes estágios. No processo convencional, ocorre inicialmente a catálise enzimática em um substrato mantido em pH entre 6,5 e 6,8. O substrato com reduzido teor de lactose vai, então, para a segunda etapa do processamento onde ocorre a aplicação da cultura láctica e o início da fermentação. Uma alternativa para reduzir o elevado tempo de contato da etapa enzimática nesse processo é usar sistemas que concentrem a lactose, em geral a partir de filtração em membranas (MARTINS et al., 2011).

O principal resultado que se busca em um processo simultâneo, onde catálise e fermentação se associam, é superar os inconvenientes do processamento em dois ou mais estágios. No presente trabalho foi utilizada a técnica do Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD), a partir de β -galactosidase de diferentes origens, associando a enzima obtida de *Kluyveromyces lactis*, que atua preferencialmente em pH acima de 6, com a enzima obtida de *Aspergillus niger*, que atua preferencialmente em pH abaixo de 5,5 (MARTINS et al., 2011).

Segundo Fooks e Gibson (2002), os oligossacarídeos agem como fibras que proporcionam efeito positivo na composição da microbiota intestinal humana, potencializando seus efeitos quando consumidos associados a micro-organismos probióticos, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacteria* spp. Para Roberfroid (2007), somente os fruto-oligossacarídeos (FOS) e os galacto-oligossacarídeos (GOS), dentre os oligossacarídeos, possuem características comprovadamente prebióticas.

A formação de GOS ocorre a partir de um substrato rico em lactose submetido à ação de β -galactosidase. A enzima tanto pode hidrolisar a lactose, formando galactose e glicose, quanto transgalactosilar a galactose, formando galacto-oligossacarídeos (MARTINS e BURKERT, 2009).

O presente trabalho objetiva avaliar a formação de GOS e a conversão da lactose em Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD), onde a enzima é adicionada após o início da fermentação. Tal estratégia visou minimizar o efeito de hidrólise dos GOS ao longo do processamento (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Substrato

O substrato foi composto por uma base láctea formada apenas por leite em pó integral Danby[®] (Cosulati, Brasil) e água destilada, com uma concentração inicial de lactose aproximadamente igual a 90 g.L⁻¹. O substrato sofreu prévio tratamento térmico a 90 ± 1°C por 5 ± 1 min, para desnaturar a proteína e minimizar riscos de contaminação microbiológica.

Enzima

Foi utilizada a enzima comercial Lactomax Flex[®] (Prozyn, EUA), trata-se de uma formulação líquida composta por β-galactosidases obtidas de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus niger*.

Cultura láctica

O fermento comercial utilizado foi o ABY-3[®] (Chr Hansen, Dinamarca). Esta cultura láctica liofilizada é fornecida em uma embalagem única contendo os seguintes micro-organismos: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*. Por indicação do fabricante, a quantidade de fermento contida na embalagem foi adicionada em 500 mL de leite desnatado UHT e acondicionada em frascos esterilizados. O inóculo foi guardado refrigerado, tendo sido dosado 4 mL em cada batelada de 2 L de substrato.

Planejamento experimental

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², com uma repetição no ponto central, onde as variáveis estudadas foram: concentração inicial de enzima (E) e o tempo de defasagem na aplicação da enzima em relação ao início da fermentação (t). As respostas avaliadas foram às concentrações de lactose (L), de galacto-oligossacarídeos (GOS), de glicose (Gu) e de galactose (Ga). A matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 1. Um ensaio controle foi realizado sem a adição de enzima. Para

avaliar a eventual hidrólise de galacto-oligossacarídeos ao longo do tempo de processamento foram coletadas amostras intermediárias nos diferentes ensaios. Os resultados experimentais foram tratados através do programa Statistica[®] 5.0.

Bioprocessos

Os bioprocessos foram conduzidos em um fermentador de bancada Biostat[®] (B Braun, Alemanha) com capacidade para 2 L. A temperatura foi mantida em 43°C até atingir-se o pH 4,70 quando, então, o processamento foi cortado via resfriamento rápido.

Determinações analíticas

A identificação e a quantificação de lactose, de galacto-oligossacarídeos, de glicose e de galactose, foi via cromatografia líquida de alta eficiência com pulso amperométrico de detecção (HPLC-PAD). A cromatografia foi realizada empregando uma coluna Carbowac PA1 (4 x 250mm) com uma pré-coluna PA1 (4 x 50 mm), na temperatura de 22 a 24°C, usando uma bomba gradiente GP-50, um detector eletroquímico ED40 e o software Peaknet (Dionex, EUA). A eluição ocorreu utilizando-se NaOH 20 mM, a uma taxa de 1,0 mL/min (MANERA et al., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados de lactose, galacto-oligossacarídeos, glicose e galactose, avaliadas ao final dos ensaios do planejamento experimental.

O intervalo de variação da concentração enzimática e o tempo de defasagem da aplicação da enzima em relação ao início da fermentação foram definidos a partir de resultados que foram obtidos em trabalho anterior dos autores (MARTINS et al., 2011).

Foi calculada a conversão da lactose (C_L) em todos os ensaios do presente trabalho, segundo a equação 05, onde L_I é o valor medido da lactose no início do processo e L_F é o valor final da lactose. A Tabela 4 apresenta os valores de conversão da lactose para os ensaios.

$$C_L = \frac{L_I - L_F}{L_I} \cdot 100 \quad (01)$$

O melhor resultado de conversão da lactose foi para a condição que associou incremento na concentração de enzima (nível +1) e redução na defasagem de seu tempo de aplicação (nível -1), resultando em mais de 63% de conversão (ensaio 03). Na condição de maior concentração final de GOS (ensaio 04), a conversão da lactose foi um pouco superior a 54%. O resultado de conversão da lactose (C_L) para a amostra controle, onde ocorreu o processo fermentativo sem a adição de enzima, foi de 13,5%.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental

<i>Ensaio</i>	<i>E</i> (g.L ⁻¹)	<i>t</i> (min)	<i>L</i> (g.L ⁻¹)	<i>Gu</i> (g.L ⁻¹)	<i>Ga</i> (g.L ⁻¹)	<i>GOS</i> (g.L ⁻¹)	<i>C_L</i> (%)
01	-1 (0,16)	-1 (60)	53,5	16,1	16,3	1,7	39,5
02	-1 (0,16)	+1 (90)	58,6	12,4	15,5	2,3	36,8
03	+1 (0,44)	-1 (60)	33,1	26,1	24,6	3,5	63,1
04	+1 (0,44)	+1 (90)	40,5	22,7	21	4,9	54,6
05	0 (0,3)	-1,41 (54)	36,9	24	23	3,2	58,5
06	-1,41 (0,1)	0 (75)	68,1	9,2	9,8	0,9	23,4
07	0 (0,3)	+1,41 (96)	49,2	17,3	18,2	4,7	45,4
08	+1,41 (0,5)	0 (75)	40,2	23,4	20,8	4,1	54,9
09	0 (0,3)	0 (75)	44,8	20,3	20	3,5	49,7
10	0 (0,3)	0 (75)	46,1	19,3	19,5	3,6	48,4

As concentrações de lactose e de galacto-oligossacarídeos foram avaliadas a partir de análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 2. As variáveis que foram significativas e preditivas em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) são apresentadas nas equações 02 e 03. As variáveis que, no citado intervalo de confiança, não foram significativas e preditivas foram agregadas ao erro da análise de variância.

Tabela 2. Análise de variância para lactose e galacto-oligossacarídeos

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma quadrática</i>		<i>Graus de liberdade</i>		<i>Média quadrática</i>		<i>F</i> (<i>calculado</i>)	
	<i>L</i>	<i>GOS</i>	<i>L</i>	<i>GOS</i>	<i>L</i>	<i>GOS</i>	<i>L</i>	<i>GOS</i>
Regressão	987,05	14,29	3	3	329,02	4,76	67,8	79,3
Resíduo	29,07	0,33	6	6	4,85	0,06		
Total corrigido	1.631,13	12,26	9	9				

$L \rightarrow F_{(tabulado) 3, 6, 0,05} = 6,94$; Coeficiente de correlação: $R = 0,96$

$GOS \rightarrow F_{(tabulado) 3, 6, 0,05} = 6,94$; Coeficiente de correlação: $R = 0,97$

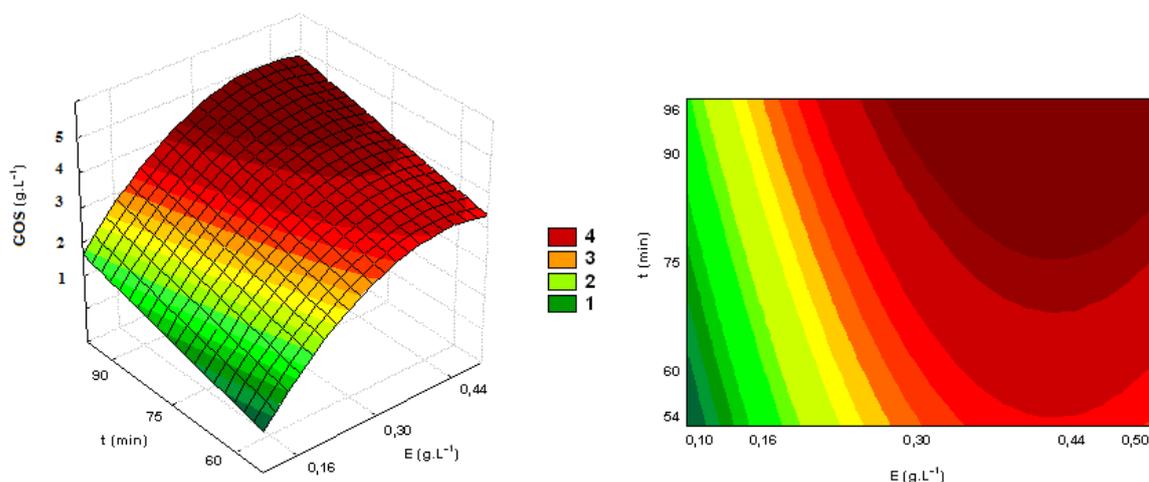
A equação 02 apresenta o ajuste do modelo do DCCR aos dados experimentais para a resposta galacto-oligossacarídeos (*GOS*).

$$GOS = 3,546 + 2,222 \cdot E - 1,112 \cdot E^2 + 1,065 \cdot t + 0,367 \cdot t^2 + 0,37 \cdot E \cdot t \quad (02)$$

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta galacto-oligossacarídeos (*GOS*).

Os melhores resultados na formação de galacto-oligossacarídeos a partir de bioprocessos simultâneos defasados (BSD) indicaram que o aumento do tempo de defasagem (*t*) contribuiu positivamente para o aumento da concentração de *GOS*. O aumento da concentração de enzima (*E*) igualmente contribuiu para o incremento da concentração de *GOS*. Nesse trabalho foi possível obter valores entre 0,9 e 4,9 g.L⁻¹ de *GOS* através do bioprocessos simultâneos defasados (BSD).

Figura 1 – Superfície de resposta e curva de contorno para *GOS*



O trabalho de Toba et al. (1986) buscou obter *GOS* aplicando enzima obtida de *Aspergillus oryzae* em um processo simultâneo à fermentação láctica com 8 h de duração. Os autores encontraram até 15% de conversão da lactose inicial em *GOS* até a 2ª hora de processamento. Esses valores caíram pela metade até o final da fermentação, indicando que a própria enzima tende a hidrolisar os *GOS* formados.

Martínez-Villaluenga et al. (2008) observaram formação de GOS em fermentados lácticos comerciais, com destaque para leite fermentado com bifidobactéria, indicando que as enzimas exógenas das bactérias ácido-lácticas (BAL) também podem formar e hidrolisar oligossacarídeos. Yadav et al. (2007) encontraram atividade de transgalactosilação em fermentações conduzidas por diferentes lactobacilos.

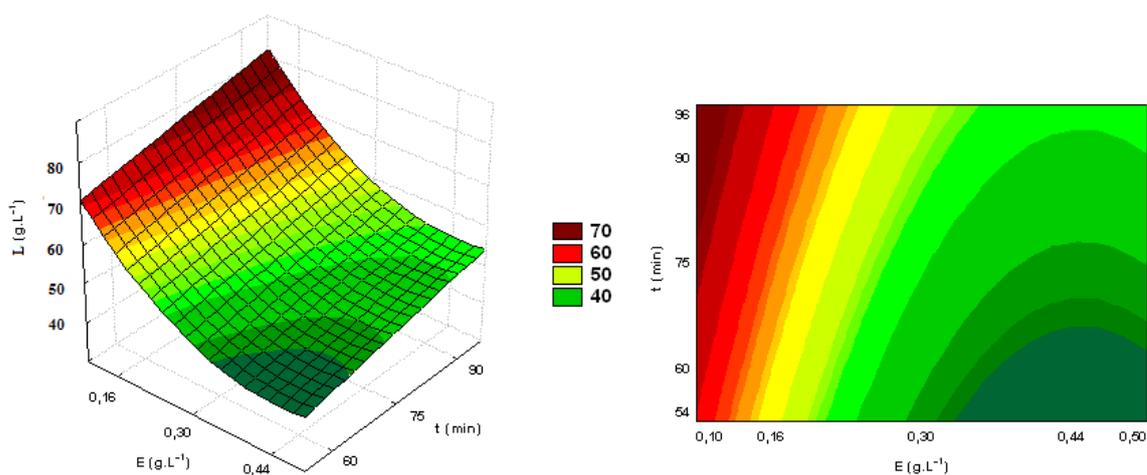
A defasagem no tempo de adição da enzima em relação à aplicação da cultura láctica pode contribuir para minimizar o efeito de hidrólise de GOS, indicando a possibilidade de estabelecimento de Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD) como técnica indicada para a obtenção de fermentados lácticos de baixa lactose e com concentrações de GOS de interesse comercial.

A equação 02 apresenta o ajuste do modelo do DCCR aos dados experimentais para a resposta lactose (L).

$$L = 45,463 - 19,518 \cdot E + 7,636 \cdot E^2 + 7,483 \cdot t \quad (03)$$

A Figura 2 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta lactose (L).

Figura 2 – Superfície de resposta e curva de contorno para lactose



Os melhores resultados na redução de lactose a partir de bioprocesso simultâneo defasado (BSD) indicaram que o aumento da concentração de enzima (E) contribuiu positivamente para a redução da concentração de lactose final. O aumento do tempo de aplicação da enzima (t), ao contrário, contribuiu negativamente para a redução da

concentração de lactose. A lactose ao final do processo variou entre 33,1 a 68,1 g.L⁻¹ (significando uma conversão entre 23,4 e 63,1%).

No trabalho de Toba et al. (1986), em que se obteve iogurte através de bioprocessamento simultâneo com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, os autores obtiveram 64% de conversão da lactose em 8 h de processamento, adicionando a enzima junto com a cultura láctica.

Mais recentemente, Rodriguez et al. (2008) realizaram fermentação e catálise simultânea utilizando leite de cabra como substrato e uma enzima obtida de *Aspergillus oryzae*, aplicada juntamente com a cultura láctea, obtendo uma conversão de até 82,6% partindo de um substrato com concentração inicial de 44,2 g.L⁻¹ de lactose.

Na comparação com os resultados obtidos para galacto-oligossacarídeos (GOS), é possível observar que o aumento da defasagem no tempo de aplicação da enzima, em relação ao início da fermentação, é favorável ao aumento da concentração de GOS e desfavorável à conversão da lactose, ou seja, à redução da concentração de lactose final.

As respostas concentração de glicose (*Gu*) e concentração de galactose (*Ga*), medidas ao final dos ensaios, foram avaliadas a partir de análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 3. As variáveis que foram significativas e preditivas em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) são apresentadas nas equações 04 e 05. As variáveis que, no citado intervalo de confiança, não foram significativas e preditivas foram agregadas ao erro da análise de variância.

Tabela 3. Análise de variância para glicose e galactose

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma quadrática</i>		<i>Graus de liberdade</i>		<i>Média quadrática</i>		<i>F</i> (calculado)	
	<i>Gu</i>	<i>Ga</i>	<i>Gu</i>	<i>Ga</i>	<i>Gu</i>	<i>Ga</i>	<i>Gu</i>	<i>Ga</i>
Regressão	256,47	150,52	3	3	85,49	50,17	111	30,2
Resíduo	4,60	9,98	6	6	0,77	1,66		
Total corrigido	394,19	295,48	9	9				

Gu $\rightarrow F_{(tabulado) 3, 6, 0,05} = 6,94$; Coeficiente de correlação: R = 0,97

Ga $\rightarrow F_{(tabulado) 3, 6, 0,05} = 6,94$; Coeficiente de correlação: R = 0,91

A equação 03 apresenta o ajuste do modelo do DCCR aos dados experimentais para a resposta galactose (*Ga*) e a equação 04 para a resposta glicose (*Gu*).

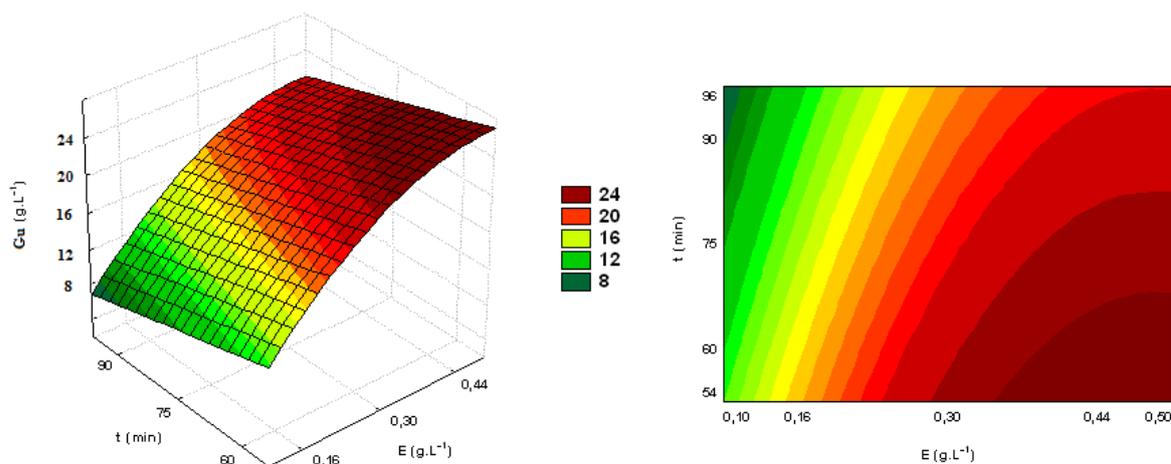
$$Ga = 19,742 + 7,349 \cdot E - 3,759 \cdot E^2 - 2,8 \cdot t \quad (04)$$

$$Gu = 19,795 + 10,111 \cdot E - 3,084 \cdot E^2 - 4,149 \cdot t \quad (05)$$

A Figura 3 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta concentração de glicose e a Figura 4 para a resposta concentração de galactose.

Os resultados para glicose a partir de bioprocesso simultâneo defasado (BSD) indicaram que o aumento da concentração de enzima (E) contribuiu positivamente para o incremento na concentração de glicose. O aumento do tempo de aplicação da enzima (t) contribuiu negativamente para o aumento da concentração de glicose, indicando um efeito similar ao observado para a lactose. A concentração de glicose ao final dos ensaios variou entre 9,2 e 26,1 g.L⁻¹.

Figura 3 – Superfície de resposta e curva de contorno para glicose

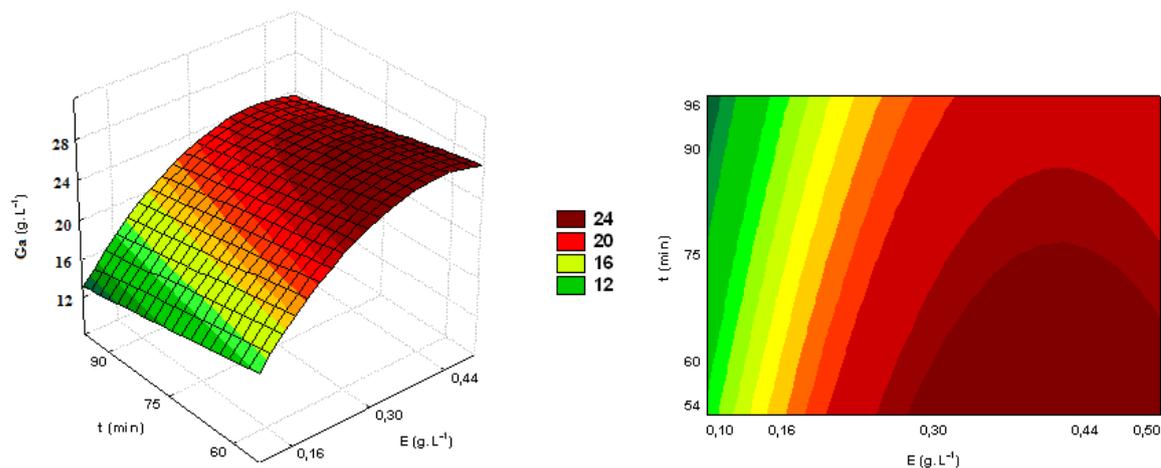


Os resultados para galactose (Ga) a partir de bioprocesso simultâneo defasado (BSD) indicaram um comportamento similar ao observado para glicose, como seria o esperado para um processo de conversão enzimática a partir da lactose. O aumento da concentração de enzima (E) contribuiu positivamente para o incremento na concentração de galactose. O aumento do tempo de aplicação da enzima (t) contribuiu negativamente para o aumento da concentração de galactose. A concentração de galactose ao final dos ensaios variou entre 10,4 e 25,1 g.L⁻¹.

O comportamento da glicose e galactose ao longo do bioprocesso simultâneo foi similar aos observados em processos exclusivos de síntese enzimática, como o do citado

trabalho de Albayrak e Young (2002). Os referidos autores observaram a tendência de incremento nas concentrações de glicose e galactose ao longo do processamento.

Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para galactose

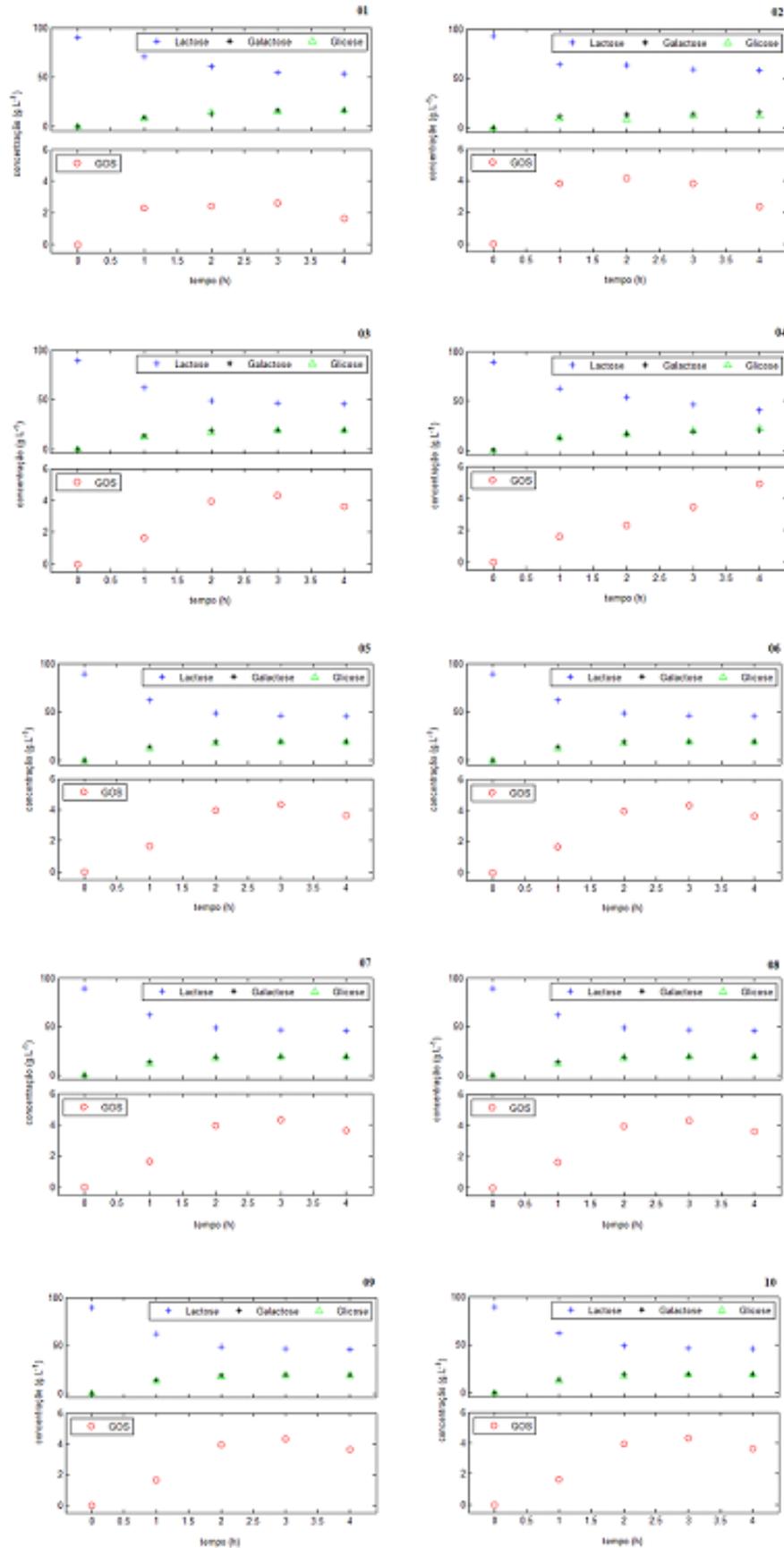


A Figura 5 apresenta as cinéticas dos ensaios do planejamento experimental do presente trabalho, onde foram tomadas cinco (5) amostras ao longo do processo, uma no início e outra no final do processamento e mais três (3) amostras intermediárias. Observa-se na Figura 5 que ocorreu hidrólise de galacto-oligossacarídeos em todos os ensaios, à exceção do ensaio 04.

Pode-se observar no ensaio 03, correspondente a uma concentração de enzima de 0,44 g.L^{-1} (nível +1) e tempo de defasagem da enzima de 60 min (nível -1), atingiu-se um valor máximo de GOS de 4,6 g.L^{-1} em 3 h de processo, reduzindo sua concentração para 3,5 g.L^{-1} ao final do processo. A redução na concentração de GOS verificada no ensaio 03 significou um recuo de aproximadamente 23,9% na quantidade de galacto-oligossacarídeos produzidos no citado ensaio. Tal fato pode estar associado à ação hidrolítica da β -galactosidase sobre os GOS, conforme relatado por outros autores (Martínez-Villaluenga et al., 2008; Lisboa et al., 2012).

Entretanto, no ensaio 04, a concentração máxima de GOS (4,9 g.L^{-1}) foi observada ao final do processo, não sendo verificado, portanto, hidrólise de GOS durante o processamento. Comparando o ensaio 04 com o ensaio 03, a diferença na condução do processo diz respeito a maior defasagem no tempo de adição da enzima no primeiro, fato que pode ter contribuído para minimizar os efeitos de hidrólise de GOS.

Figura 5 – Cinéticas dos ensaios experimentais



O ensaio 04 foi o que associou a maior defasagem no tempo de adição da enzima (nível +1) com a maior concentração inicial deste catalisador (nível +1). O resultado do ensaio 04 indica que a aplicação de Bioprocesso Simultâneo Defasado (BSD) pode propiciar uma condição que minimize os efeitos da hidrólise de GOS por ação da própria β -galactosidase.

CONCLUSÕES

A adição de uma mistura de β -galactosidases de origens distintas e sua ação simultânea e defasada no tempo, ocorrida ao longo de fermentação conduzida por quatro diferentes bactérias ácido-láticas, têm seus resultados sumarizados como tendo propiciado:

- ✓ Um impacto positivo sobre a conversão de lactose nos fermentados lácticos associada ao incremento da concentração de enzima comercial utilizada;
- ✓ Um impacto negativo sobre a conversão da lactose nos fermentados lácticos associada ao incremento do tempo de defasagem na aplicação da enzima;
- ✓ Uma tendência de maior obtenção de GOS com a aplicação da enzima em um tempo defasado em relação ao início da fermentação, indicando uma alternativa de obtenção dessas biomoléculas em processos simultâneos de fermentação e catálise enzimática;
- ✓ Uma formação de GOS que possui tendência em sofrer hidrólise ao longo do processo, por ação da própria β -galactosidase adicionada, comportamento que tende a ser minimizado a partir do aumento na defasagem da aplicação da enzima.

REFERÊNCIAS

ABU-REESH, I.M. Optimal design for CSTR's in series performing enzymatic lactose hydrolysis. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 709-713, 2000.

ALBAYRAK, N.; YOUNG, S-T. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 240-251, 2002.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Probiotics and modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

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

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fiber bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 397-405, 2004.

LISBOA, C.R.; COSTA, F.A.A; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 30-40, 2012.

MANERA, A.P.; ZABOT, G.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; KALIL, S.J.; TREICHEL, H.; MAUGERI FILHO, F. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurized fluid as reaction medium. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1408-1413, 2012.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 540-544, 2008.

MARTINS, A.R.; BURKERT, C.AV. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 230-240, 2009.

MARTINS, A.R.; MANERA, A.P. ; MONTEIRO, R.L. ;BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Lactose conversion and the synthesis of galactooligosaccharides in a simultaneous lagged bioprocess using β -galactosidases and probiotics microorganisms. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14 (02): 130-136, 2011.

MARTINS, A.R.; MONTEIRO, R.L.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 551-559, 2012.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830S-837S, 2007.

RODRIGUEZ, V.A.; CRAVERO, B.F.; ARMONÍA, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciencia e Tecnología de Alimentos**, v. 28, p. 109-115, 2008.

SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 458-465, 2008.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 197-219, 2003.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Quantitative changes in oligosaccharides during fermentation and storage of yogurt inoculated simultaneously with starter culture and β -galactosidase preparation. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1241-1245, 1986.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* and probiotic strain of lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 154-159, 2007.

Artigo 2

PROPOSTA DE INIBIÇÃO PARA O MODELO CINÉTICO CLÁSSICO DE MICHAELIS-MENTEN NO ESTADO TRANSIENTE E SUA APLICAÇÃO AO PROCESSO ENZIMÁTICO DE HIDRÓLISE DE DISSACARÍDEOS

Resumo: Os processos enzimáticos que seguem o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten foram estudados a partir de diferentes propostas para descrever a etapa de inibição. As propostas de inibição foram comparadas a partir de um processo genérico, onde as constantes cinéticas receberam valores unitários e o valor numérico da concentração de substrato foi superior em dez (10) vezes ao valor numérico da concentração de enzima. Para cada proposta de modelo de inibição foram obtidas soluções numéricas a partir de sistema não linear de equações diferenciais ordinárias, gerando gráficos que apresentaram a variação da enzima e dos complexos enzimáticos e a variação do substrato e do produto da reação. Foi desenvolvido um modelo com desempenho indicando comportamento similar ao verificado no modelo clássico de Michaelis-Menten, onde o complexo de reação é rapidamente formado e, ao longo do processo, decai até tender à zero. Na nova proposta de modelo, o efeito de inibição começa em zero e, ao longo do processo, tende ao valor nominal da concentração inicial da enzima. Tais respostas mostraram-se válidas para valores distintos de concentração de enzima e de tempo de processo, mostrando robustez. O modelo proposto foi aplicado para a hidrólise de dissacarídeos, propiciando um ajuste com conservação de massa do modelo ao final do processo no que se refere às respostas de concentração dos carboidratos.

Palavras Chaves: Catálise enzimática. Modelo cinético. Modelo de Michaelis-Menten.

1. INTRODUÇÃO

Passados mais de 100 anos da publicação do emblemático trabalho sobre cinética enzimática do processo de inversão do dissacarídeo sacarose, de autoria do alemão Leonor Michaelis e da canadense Muad Leonora Menten, o mecanismo de inibição nos processos de catálise enzimática que seguem o modelo clássico de Michaelis-Menten ainda não estão suficientemente esclarecidos. Na modelagem matemática para cinética aplicada a maioria das

reações enzimáticas parte-se da hipótese de Michaelis-Menten, que descreve a velocidade de reação na condição em que a concentração de substrato é superior à concentração da enzima e a soma das concentrações da enzima e dos complexos enzimáticos formados se mantém constante ao longo do tempo de processamento (JOHNSON e GOODY, 2011).

A grande dúvida com respeito ao processo de catálise enzimática se refere à condição em que a etapa de inibição se desenvolve. O modelo clássico de Michaelis-Menten não contempla a inibição, muito embora a ampla maioria dos processos enzimáticos não propicie conversão de 100% do substrato indicando que existe um ponto em que, para uma dada condição, o processo é interrompido (CHAUDHURY e IGOSHIN, 2010).

A literatura na área de bioquímica aponta quatro (4) possíveis mecanismos de inibição enzimática para processos reversíveis, quais sejam: competitiva; não competitiva; mista e incompetitiva (IUB, 1982).

As soluções para o problema geral da cinética enzimática no estado estacionário têm sido limitadas na ajuda aos experimentalistas, tendo em vista os modelos não ajustarem-se adequadamente às observações experimentais. Os inibidores são tradicionalmente caracterizados a partir do pressuposto de equilíbrio, no estado estacionário, entre o complexo enzimático de reação e o substrato. Esse pressuposto seria válido apenas para enzimas muito ineficientes (FANGE et al., 2011).

O presente trabalho se propõe a avaliar as diferentes possibilidades de inibição do processo representado pela cinética clássica de Michaelis-Menten e sugerir novas representações para a etapa de inibição da catálise em modelos matemáticos adequados à representação no estado transiente. Para tal, usa o recurso de definir um processo pictórico onde o valor nominal da concentração do substrato é superior em dez (10) vezes ao valor nominal da concentração da enzima. Todas as constantes cinéticas, nesse modelo pictórico, assumem o valor unitário.

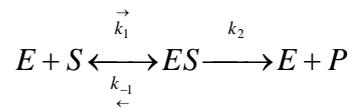
A solução numérica dos sistemas não lineares de equações diferenciais ordinárias (EDOs) foi obtida a partir de uma rotina elaborada no Matlab[®] com aplicação do método de Runge-Kutta de 4ª ordem.

As respostas são apresentadas em figuras com dois gráficos, mostrando separadamente a variação da enzima e dos complexos enzimáticos e, de outra parte, a variação do substrato e do produto.

1.1. Revisão dos modelos da literatura

Para proceder à avaliação das diferentes perspectivas de inibição, faz-se necessário, inicialmente, uma abordagem sobre a cinética clássica de Michaelis-Menten aplicada a um processo de catálise genérico, conforme descrito no Esquema 1.

Esquema 1 – Modelo cinético clássico de Michaelis-Menten



Onde k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes cinéticas destas reações. Os demais componentes são: a concentração de enzima, E ; a concentração de substrato, S ; a concentração do complexo enzima substrato, ES ; a concentração do produto, P .

Na modelagem matemática das reações anteriores são obtidas as variações do substrato, da enzima, do produto e do complexo enzimático, conforme segue:

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) + k_2ES \quad (1)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1(E \cdot S) - k_{-1}ES - k_2ES \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) \quad (3)$$

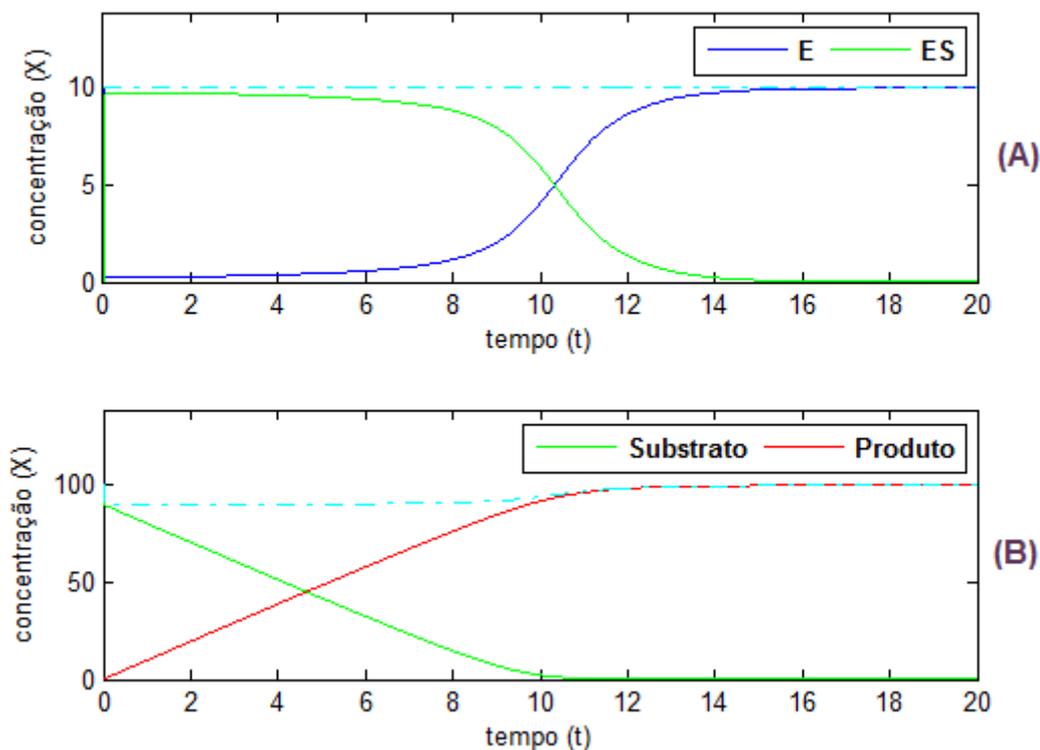
$$\frac{dP}{dt} = k_2ES \quad (4)$$

Para a solução das equações diferenciais ordinárias do sistema não linear descrito, a principal exigência diz respeito à estrita observação à Lei de Conservação de Massas para a enzima e o complexo, através da expressão abaixo:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dES}{dt} = \frac{d}{dt}(E + ES) = 0 \quad (5)$$

A solução numérica deste modelo é aplicada para o processo pictórico sugerido e é mostrada na Figura 1, com concentração de substrato e de enzima com unidade hipotética (X), que representa uma relação entre massa e volume, e com o tempo de processo com unidade hipotética (t).

Figura 1 – Resposta para o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten



O gráfico da Figura 1-A apresenta a variação da enzima e do complexo enzimático e, na linha pontilhada, a soma das contribuições destas variáveis. O gráfico da Figura 1-B apresenta a variação do substrato e do produto e, na linha pontilhada, a soma da contribuição desses dois componentes.

Importante observar que a linha pontilhada na Figura 1-A se mantém sempre no valor nominal da enzima adicionada, o que condiz com o atendimento da Lei de Conservação de Massas.

Na linha pontilhada da Figura 1-B observa-se uma queda no início e uma convergência posterior ao valor nominal do substrato adicionado. Esta queda inicial está vinculada à relação entre enzima e substrato e será igual à fração entre esses componentes. No exemplo mostrado, a fração é igual a 10/100, ou seja, representa uma queda inicial de 10% no somatório substrato

e produto, quando do início do processo, tendendo ao valor da concentração inicial do substrato no decorrer do processo.

O complexo de reação ES é formado imediatamente no início da reação e, após, decresce desde um valor inicial muito próximo ao valor nominal da enzima até zero. Numa parte expressiva do tempo de processo a variação da concentração deste complexo é pequena, indicando a possibilidade de considerar-se, nesse segmento do tempo de processo, o estado como ‘quase estacionário’, ou seja:

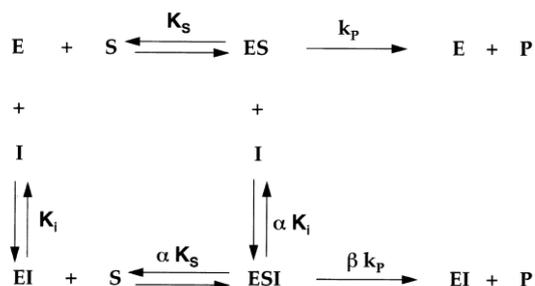
$$\frac{dES}{dt} \cong 0 \quad (6)$$

Os trabalhos disponíveis na literatura, via de regra, tratam a resolução da etapa de inibição a partir desse pressuposto do estado estacionário ou ‘quase estacionário’, apontando um presumido equilíbrio entre a formação e a dissociação do complexo enzima substrato (TZAFRIRI e EDELMAN, 2007; STOLERIU et al., 2004; RECHT et al., 2009; BAKALIS et al., 2012).

1.2. Revisão dos modelos de inibição

Uma representação genérica das diferentes possibilidades de inibição enzimática reversível é mostrada no Esquema 2, conforme proposta modificada para o mecanismo de Botts e Morales (1953).

Esquema 2 – Mecanismo para inibição do modelo de Michaelis-Menten



Fonte: Schenker e Baici (2009)

Nessa proposta aparecem dois novos complexos enzimáticos: EI representa o complexo de inibição e ESI é o complexo intermediário de inibição. Nesse mecanismo geral aparece, também, a representação de uma substância I que será responsável pela inibição.

Em alguns trabalhos da literatura a substância que propicia o efeito de inibição é representada por R , sendo tratada como uma molécula modificada no processo enzimático (JIA et al., 2012).

No Esquema 2, o coeficiente α define a proporção entre as formas competitiva e incompetitiva de inibição e β é um fator de multiplicação da constante cinética.

A representação para o sistema de EDOs referente ao mecanismo geral do Esquema 2 é mostrada a seguir:

$$\frac{dE}{dt} = k_s ES - k_s (E \cdot S) + k_p ES + k_i (EI \cdot S) - k_i (E \cdot S \cdot I) \quad (7)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_s (E \cdot S) - k_s ES - k_p ES + \alpha k_i ESI - \alpha k_i (ES \cdot I) \quad (8)$$

$$\frac{dESI}{dt} = \alpha k_i (ES \cdot I) - \alpha k_i ESI + \alpha k_s (EI \cdot S) - \alpha k_s ESI - \beta k_p ESI \quad (9)$$

$$\frac{dEI}{dt} = k_i (E \cdot S \cdot I) - k_i (EI \cdot S) + \alpha k_s ESI - \alpha k_s (EI \cdot S) + \beta k_p ESI \quad (10)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_s ES - k_s (E \cdot S) + \alpha k_s ESI - \alpha k_s (EI \cdot S) \quad (11)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_p ES + \beta k_p ESI \quad (12)$$

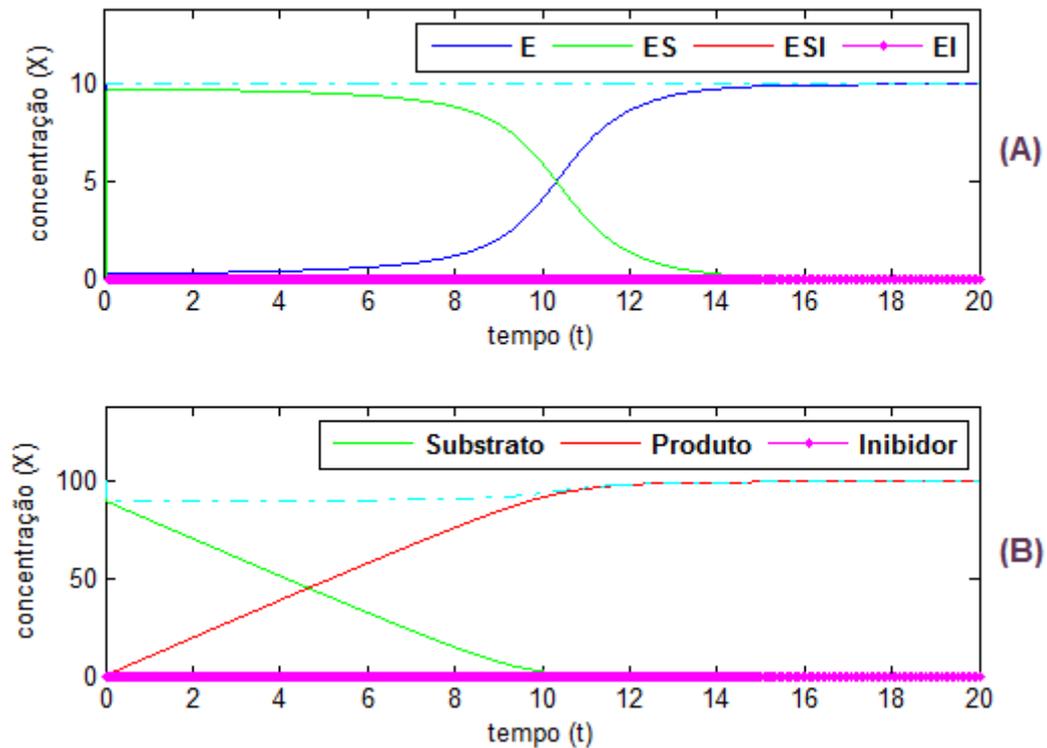
$$\frac{dI}{dt} = k_i (EI \cdot S) - k_i (E \cdot S \cdot I) + \alpha k_i ESI - \alpha k_i (ES \cdot I) \quad (13)$$

A Figura 2 apresenta a solução numérica do sistema de equações diferenciais ordinárias anteriores, a partir do modelo pictórico e com valores unitários para os fatores α e β .

O que se observa nessa resposta é que o comportamento da enzima e de seus complexos é similar ao do modelo cinético clássico de Michaelis-Menten sem inibição. A resposta do gráfico da Figura 2-A indica que os complexos ESI e EI permanecem iguais à zero ao longo de todo o tempo de processamento. Por consequência, no gráfico da Figura 2-B, a concentração da substância de inibição, I , também se manterá com valor numérico igual à zero. A resposta observada nesse mecanismo genérico se repetirá caso se estude,

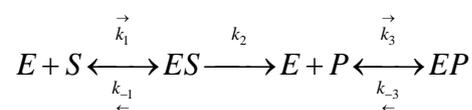
individualmente, as propostas de inibição competitiva, não competitiva, incompetitiva ou mista.

Figura 2. Resposta ao mecanismo genérico do modelo de Schenker e Baici (2009)



Outra forma de representar-se o processo de inibição é considerando que o inibidor é um produto da própria reação, conforme mostra o Esquema 3.

Esquema 3 – Modelo clássico de Michaelis-Menten com inibição pelo produto



Fonte: Van Boekel (2009)

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) + k_2ES + k_{-3}EP - k_3(E \cdot P) \quad (14)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1(E \cdot S) - k_{-1}ES - k_2ES \quad (15)$$

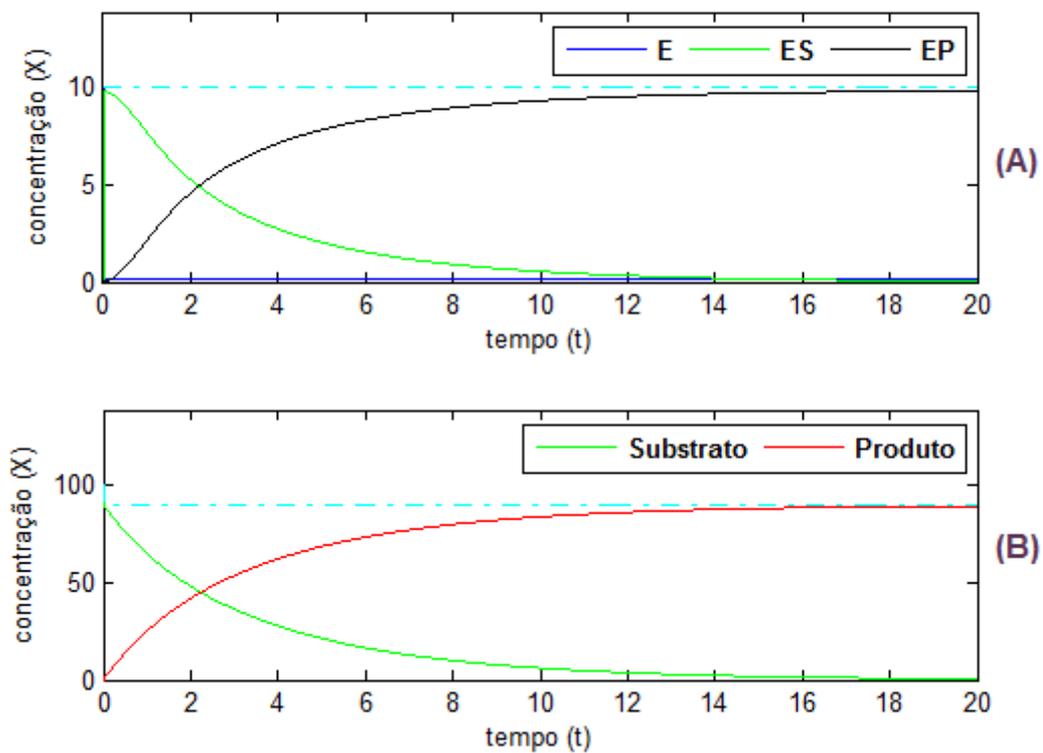
$$\frac{dEP}{dt} = k_3(E \cdot P) - k_{-3}EP \quad (16)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) \quad (17)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2ES + k_{-3}EP - k_3(E \cdot P) \quad (18)$$

A Figura 3 mostra o resultado numérico para o processo pictórico do modelo com inibição pelo produto, onde se fez: $k_1 = k_2 = 3$ e demais constantes unitárias.

Figura 3. Resposta do modelo de Van Boekel (2009)



No resultado do gráfico da Figura 3-B é possível observar que não ocorre convergência do produto para o valor inicial do substrato, ao final do processamento. No modelo com inibição pelo produto, tal como proposto, ocorre um erro equivalente ao percentual da fração enzima substrato, ou seja:

$$Erro(\%) \cong \frac{E}{S} * 100 \quad (19)$$

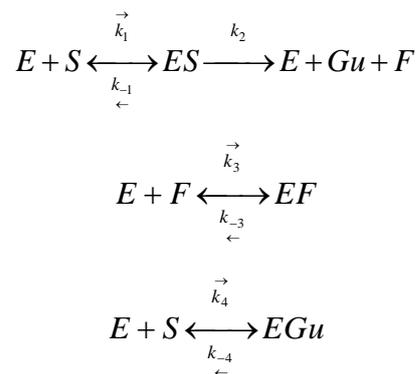
No gráfico da Figura 3-A observa-se que ES forma-se instantaneamente e, ao longo do processo, sofre redução tendendo à zero. O complexo EP , ao contrário, cresce desde zero

e tende ao valor inicial da enzima. A enzima livre (E) cai instantaneamente até zero e mantém-se próximo desse valor ao longo do processamento, resultando em:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dES}{dt} + \frac{dEP}{dt} = \frac{d}{dt}(E + ES + EP) = 0 \rightarrow \frac{dE}{dt} \cong 0 \quad \therefore \quad \frac{dEP}{dt} \cong -\frac{dES}{dt} \quad (20)$$

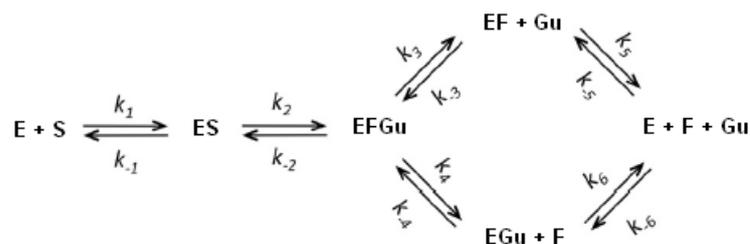
Especificamente para o processo de hidrólise da sacarose pela enzima invertase, estudado originalmente em trabalho publicado em 1913 pelo alemão Leonor Michaelis e pela canadense Muad Leonora Menten, recentemente Johnson e Goody (2011) propuseram a estrutura para a hipótese da inibição pelo produto mostrada no Esquema 4, onde S representa a sacarose, Gu é a glicose, F representa a frutose, EGu é o complexo enzima glicose e EF representa o complexo enzima frutose. Mais recentemente, Johnson (2013) propôs uma nova representação para o citado processo, mostrado no Esquema 5.

Esquema 4 – Modelo de inversão da sacarose com inibição pelo produto



Fonte: Johnson e Goody (2011)

Esquema 5 – Modelo de inversão da sacarose com inibição pelos produtos



Fonte: Johnson (2013)

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) + k_5(EF \cdot Gu) - k_{-5}(E \cdot F \cdot Gu) + k_6(EGu \cdot F) - k_{-6}(E \cdot F \cdot Gu) \quad (28)$$

$$\frac{dEGu}{dt} = k_4EFGu - k_{-4}(EGu \cdot F) + k_{-6}(E \cdot F \cdot Gu) - k_6(EGu \cdot F) \quad (29)$$

$$\frac{dEF}{dt} = k_3EFGu - k_{-3}(EF \cdot Gu) + k_{-5}(E \cdot F \cdot Gu) - k_5(EF \cdot Gu) \quad (30)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1(E \cdot S) - k_{-1}ES + k_{-2}EFGu - k_2ES \quad (31)$$

$$\frac{dEFGu}{dt} = k_2ES - k_{-2}EFGu + k_{-3}(EF \cdot Gu) - k_3EFGu + k_{-4}(EGu \cdot F) - k_4EFGu \quad (32)$$

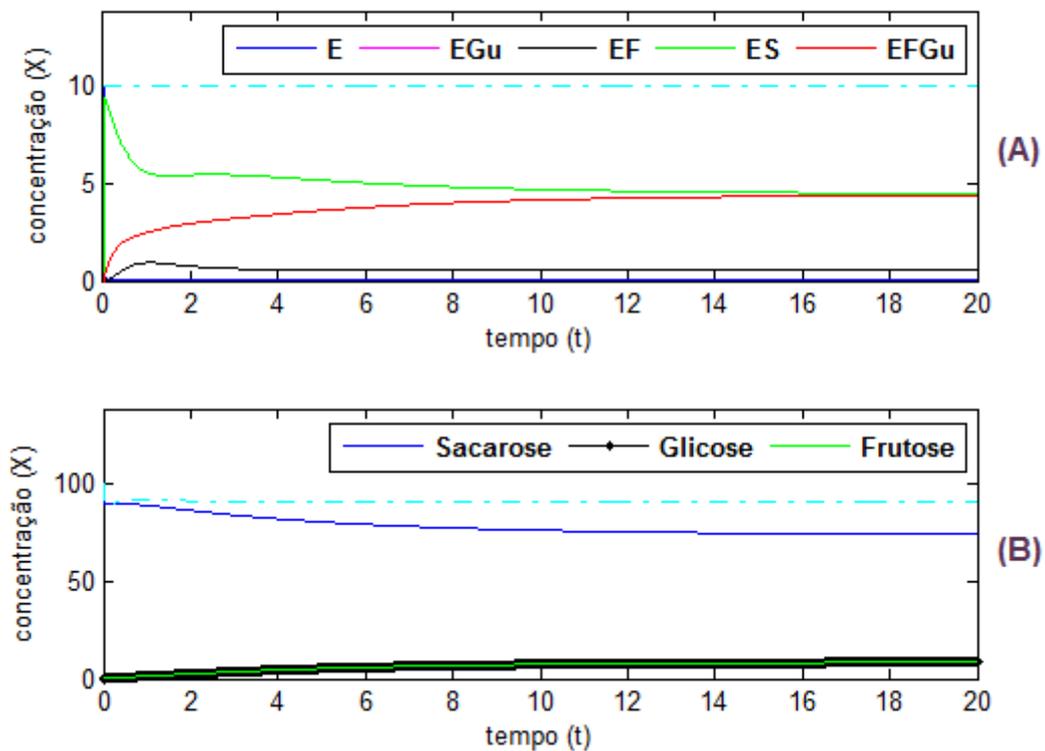
$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) \quad (33)$$

$$\frac{dF}{dt} = k_4EFGu - k_{-4}(EGu \cdot F) + 0,5(k_{-6} - k_{-5})(E \cdot F \cdot Gu) + 0,5k_5(EF \cdot Gu) - 0,5k_6(EGu \cdot F) \quad (34)$$

$$\frac{dGu}{dt} = k_3EFGu - k_{-3}(EF \cdot Gu) + 0,5(k_{-5} - k_{-6})(E \cdot F \cdot Gu) + 0,5k_6(EGu \cdot F) - 0,5k_5(EF \cdot Gu) \quad (35)$$

A Figura 4 apresenta o resultado do processo pictórico para o modelo de Johnson (2013), nas mesmas condições anteriores.

Figura 4 – Resposta do modelo de Johnson (2013)



Observa-se na resposta do gráfico da Figura 4-B que a variação dos produtos indica a tendência da obtenção de iguais valores numéricos para as concentrações de glicose e frutose.

No gráfico da Figura 4-A observa-se que existe uma tendência na obtenção de valores numéricos equivalentes para o complexo de reação (ES) e para o complexo de inibição (EI) ao final do processamento.

A resposta do modelo de Johnson (2013), no entanto, mantêm o comportamento observado no modelo de van Boekel (2009), no que se refere ao erro associado ao valor numérico do percentual da fração enzima substrato.

2. PROPOSTA DE NOVO MODELO

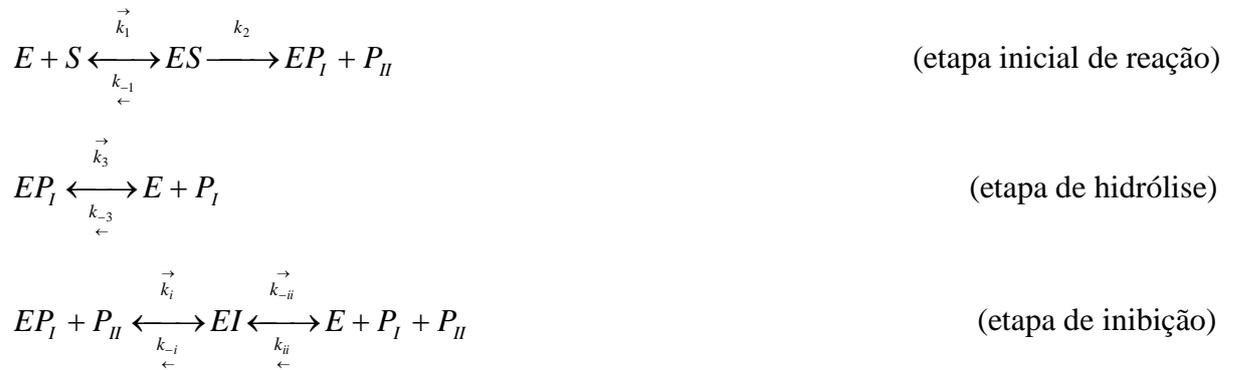
Para a elaboração de um modelo visando representar o efeito de inibição na cinética clássica de Michaelis-Menten faz-se necessário, inicialmente, estabelecer algumas premissas:

- a) O modelo deve seguir estritamente a Lei de Conservação de Massas, no que se refere à variação do somatório da enzima e de seus complexos, ao longo de todo o tempo de processamento e de forma contínua.
- b) O modelo deve convergir o somatório do substrato e produto(s) ao valor nominal do substrato adicionado, em um tempo suficientemente elevado e com o menor erro possível, para garantir estabilidade ao processo.
- c) O modelo deve ser suficientemente robusto e permitir a variação na relação enzima substrato em um tempo suficientemente elevado, garantindo a estabilidade do processo.
- d) O modelo deve propiciar um desempenho do complexo de reação (complexo enzima substrato) com uma alta taxa de formação no início da reação e com a redução de sua concentração ao longo do tempo, tendendo à zero ao final do processamento.
- e) O modelo deve representar o efeito de inibição a partir de um complexo enzimático que atue sobre o complexo de reação, indicando suas relações com os demais componentes da catálise enzimática.
- f) Se houver mais de um complexo enzimático e mais de um produto de reação, suas contribuições devem ser consideradas para o efeito de inibição.
- g) O modelo deve propiciar uma formação inicial do complexo de inibição igual à zero, com crescimento ao longo do tempo e tendendo ao valor inicial da enzima no final do processamento.

Aplicam-se, na sequência, as premissas anteriores para um processo de reação enzimática em que um substrato genérico, S , é convertido em dois (2) produtos de igual massa molecular, P_I e P_{II} , típica representação de hidrólise de dissacarídeos.

O Esquema 6 apresenta a proposta desse modelo. Nessa proposta forma-se tanto um complexo de reação com o substrato (ES) quanto um complexo com um dos produtos, (EP_I), além da representação do complexo de inibição (EI).

Esquema 6 – Proposta de inibição para o modelo de hidrólise de dissacarídeos



A proposta de modelo pressupõe o mecanismo de inibição pelo produto para expressar a etapa final da catálise, postulando que o efeito de inibição ocorre sobre o complexo de reação (ES) formando um complexo de inibição (EI). O complexo de inibição se relaciona com a enzima livre (E), com o complexo enzima produto (EP_I) e com os produtos da hidrólise (P_I e P_{II}), respeitando a estequiometria da reação.

O modelo proposto forma um sistema não linear com sete (7) equações diferenciais ordinárias e com nove (9) constantes cinéticas. A Figura 5 apresenta o resultado numérico para o processo genérico.

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) + k_3EP_I - k_{-3}(E \cdot P_I) + k_{-ii}EI - k_{ii}(E \cdot P_I \cdot P_{II}) \quad (36)$$

$$\frac{dEP_I}{dt} = k_2ES + k_{-3}(E \cdot P_I) - k_3EP_I + k_{-i}EI - k_i(EP_I \cdot P_{II}) \quad (37)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1(E \cdot S) - k_{-1}ES - k_2ES \quad (38)$$

$$\frac{dEI}{dt} = k_{ii}(E \cdot P_I \cdot P_{II}) - k_{-ii}EI + k_i(EP_I \cdot P_{II}) - k_iEI \quad (39)$$

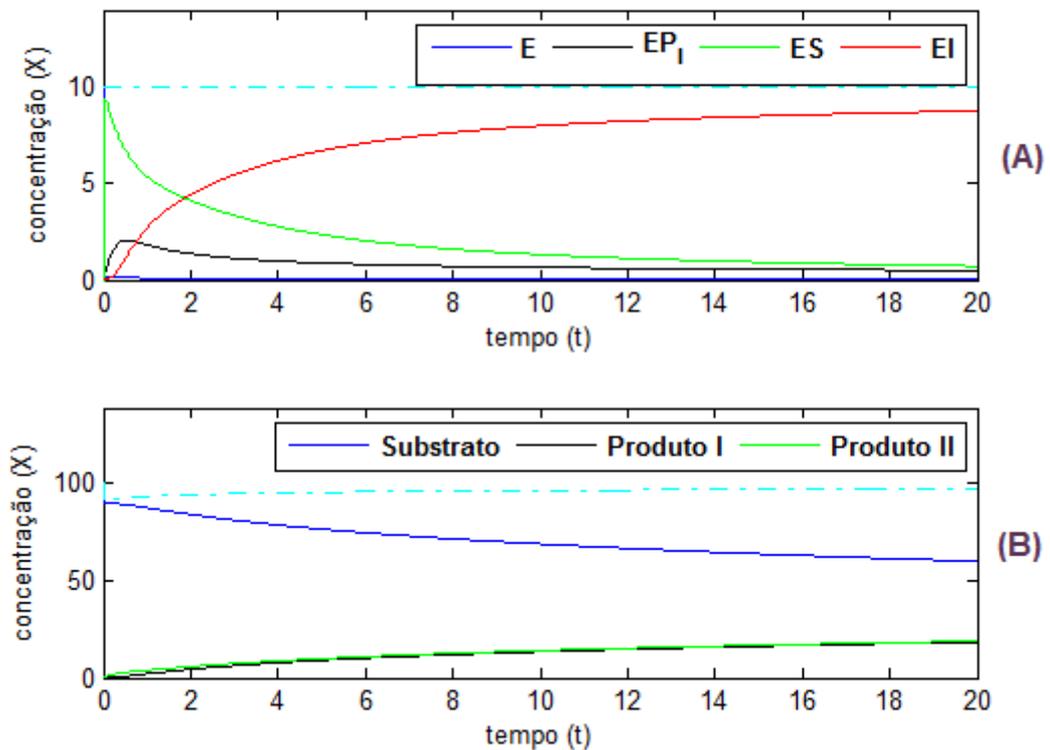
$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}ES - k_1(E \cdot S) \quad (40)$$

$$\frac{dP_I}{dt} = k_3EP_I - k_{-3}(E \cdot P_I) + 0,5 \cdot k_{-ii}EI - 0,5 \cdot k_{ii}(E \cdot P_I \cdot P_{II}) \quad (41)$$

$$\frac{dP_{II}}{dt} = k_2ES + 0,5 \cdot k_{-ii}EI - 0,5 \cdot k_{ii}(E \cdot P_I \cdot P_{II}) + k_{-i}EI - k_i(EP_I \cdot P_{II}) \quad (42)$$

O gráfico da Figura 5-B apresenta o comportamento esperado para um processo de reação em que um substrato é dividido em dois produtos de igual massa molecular. No começo da reação existe uma flutuação, mostrando uma concentração de P_{II} um pouco superior ao de P_I , mas ao longo do processamento observa-se a tendência da obtenção de concentrações aproximadas de ambos os produtos.

Figura 5. Resposta do processo genérico para a hidrólise de dissacarídeo



No gráfico da Figura 5-A observa-se a tendência de incremento do complexo de inibição e conseqüente redução do complexo de reação, com uma flutuação inicial do

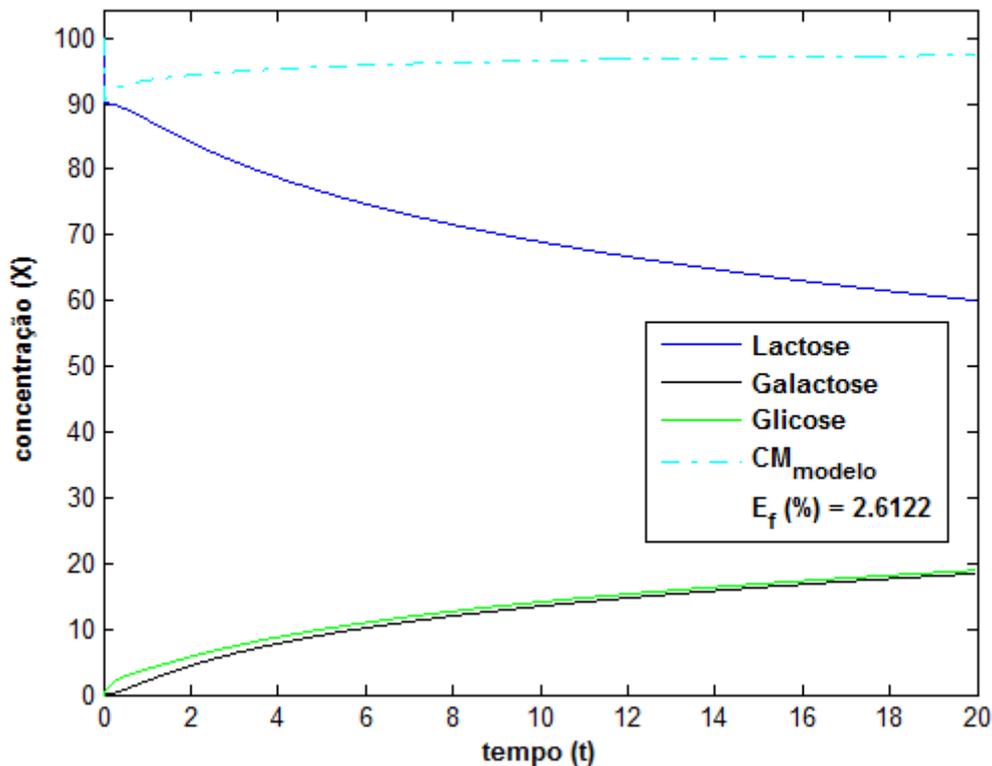
complexo enzima produto. A flutuação na variação do complexo enzima produto está associada, aparentemente, à diferença na variação inicial da concentração dos produtos no gráfico inferior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar o erro associado ao modelo proposto e melhor visualizar a flutuação inicial na concentração dos produtos, a Figura 6 mostra o resultado apenas com a variação dos carboidratos ao longo do processo genérico. A conservação de massa ao final do processamento foi calculada a partir da expressão abaixo, onde L_0 é a concentração inicial do substrato e $y_i(n+1)$ é o valor da concentração de cada carboidrato ao final do processo. A solução foi obtida pelo método de Runge-Kutta de ordem 4 e passo (h) de 1.10^{-4} .

$$CM_{\text{modelo}} = \sum_{i=1}^v (y_i(n+1)) = L_0 \quad (43)$$

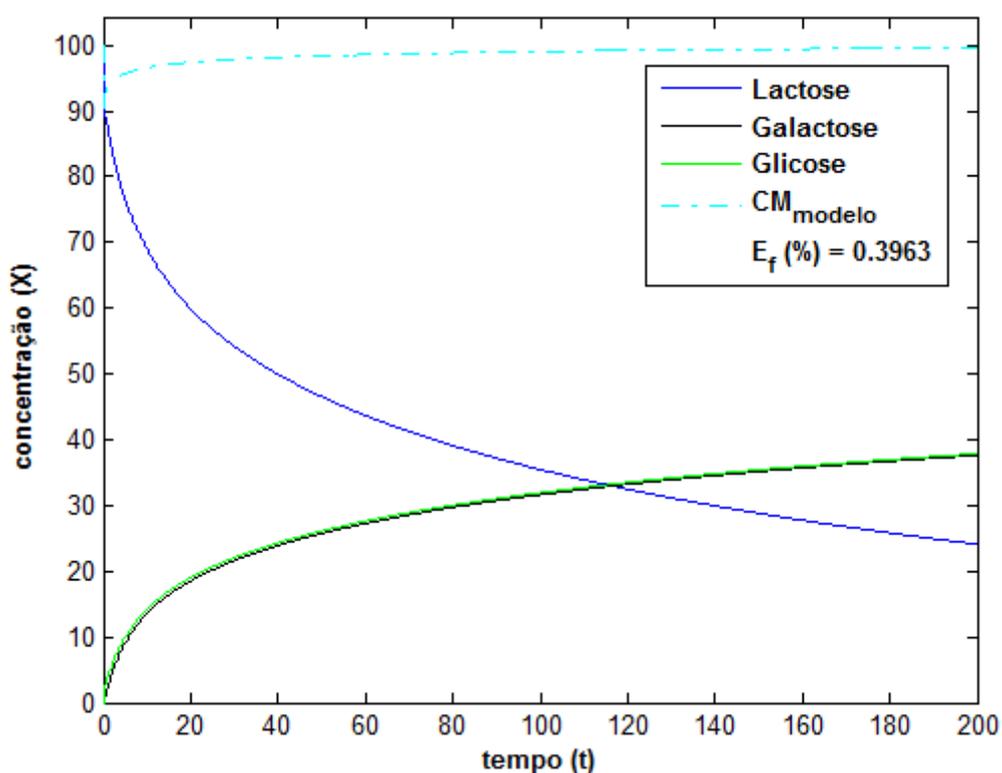
Figura 6 – Resposta do modelo para a variação do substrato e dos produtos



Observa-se que o erro do modelo calculado ao final do processo foi de 2,6122% e não se relaciona, portanto, com o percentual da fração enzima substrato, como no caso da inibição do modelo sugerido por Johnson e Goody (2011) e pelo modelo de Johnson (2013).

A Figura 7 mostra o resultado para o modelo do presente trabalho quando o valor numérico do tempo de processo é aumentado em dez (10) vezes, com os demais parâmetros mantidos iguais aos da Figura 6. Observa-se que o somatório dos carboidratos ao final do processo possui um erro significativamente inferior do que o erro obtido no resultado da Figura 6.

Figura 7 – Resposta do processo de hidrólise de dissacarídeo com incremento no tempo



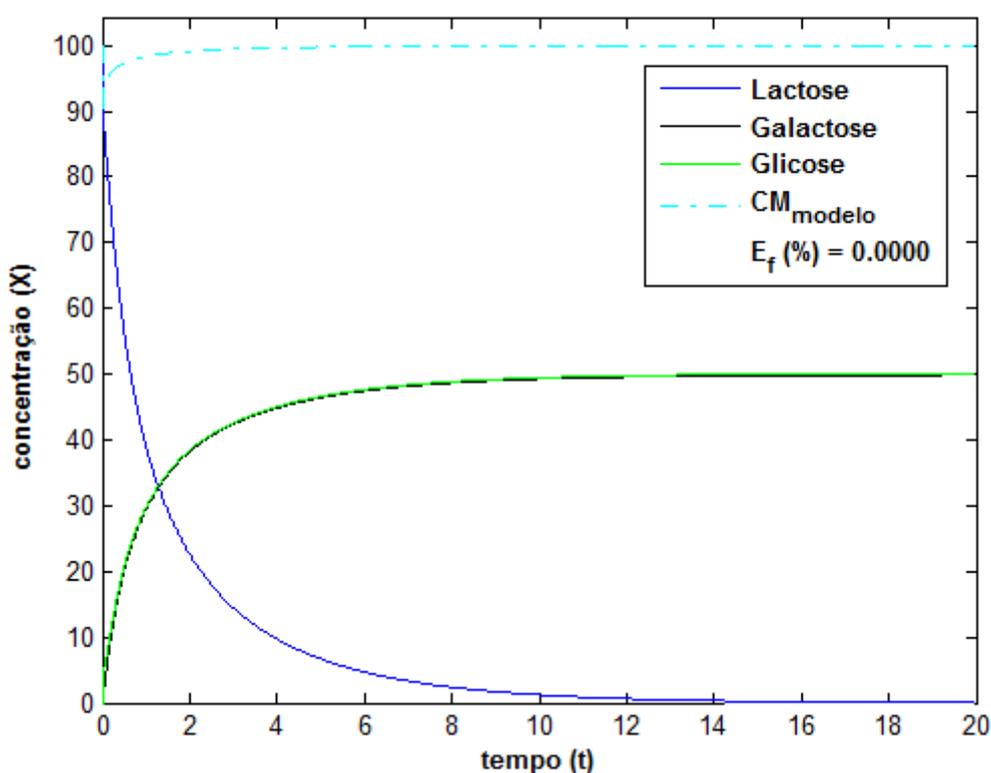
No gráfico da Figura 7 verifica-se, portanto, uma tendência de redução no erro do modelo ao longo do tempo, nas respostas do modelo do presente trabalho, o que permite inferir a existência de um conjunto de valores numéricos, para as constantes cinéticas, que propiciam erro próximo de zero em um dado tempo de processamento.

Tal situação indica que o modelo do presente trabalho, apesar de apresentar uma proposta de inibição pelo produto, diferencia-se do comportamento observado no modelo de Johnson (2013), elaborado para representar o processo de hidrólise do dissacarídeo sacarose.

A Figura 8 apresenta o resultado numérico para o processo genérico ($S = 100$; $E = 10$ e $t = 20$), prevendo a conservação de massa dos carboidratos ao final do processamento. Na Figura 8 é mostrado o resultado com conversão total do substrato, mantidas as mesmas condições de tempo de processo e concentrações de substrato e enzima mostrados na Figura 6.

Os valores numéricos das constantes cinéticas na Figura 8 foram: $k_1 = 165$; $k_2 = k_{-1} = 70$; demais constantes com valores iguais a dez (10).

Figura 8 – Resposta do modelo para hidrólise de dissacarídeo com conversão total



3. CONCLUSÃO

No presente trabalho a etapa de inibição da reação enzimática, representada pelo modelo cinético clássico de Michaelis-Menten, teve seu comportamento descrito ao aplicarem-se propostas de inibição por efeito do incremento da concentração do produto, em solução numérica de um processo genérico.

A proposta de modelo apresentada no presente trabalho foi aplicada em processo enzimático que gerou dois (2) produtos de reação, ambos com igual massa molecular, no exemplo da hidrólise de dissacarídeo. Diferentemente dos modelos da literatura com inibição pelo produto que propiciam um erro do modelo vinculado ao percentual dos valores numéricos da fração enzima substrato, o presente modelo com inibição pelos produtos de reação permite a obtenção de resultado que minimiza o erro percentual do modelo, podendo propiciar conservação de massa, para o somatório do substrato e dos produtos, ao final do processamento.

A aplicação da presente abordagem do efeito de inibição na construção de novos modelos deverá ser diferenciada e aplicada para cada situação específica, nos casos de catálises enzimáticas que gerem diferentes produtos de reação.

REFERÊNCIAS

BAKALIS, E.; KOSMAS, M. PAPAMICHAEL, E.M. Perturbation theory in the catalytic rate constant of the Henry-Michaelis-Menten enzymatic reaction. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 74, p. 2535-2546, 2012.

BOTTS, J.; MORALES, M. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate. **Transactions of the Faraday Society**, v. 49, p. 696-707, 1953.

CHAUDHURY, S.; IGOSHIN, O.A. Dynamic disorder in quasi-equilibrium enzymatic systems. **PLoS ONE**, v. 8, p. e12364, 2010.

FANGE, D.; LOVMAR, M.; PAVLOV, M.Y.; EHRENBERG, M. Identification of enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics. **Biochimie**, v. 93, p. 1623-1629, 2011.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (IUB). Symbolism and terminology in enzyme kinetics. Recommendations 1981. **European Journal of Biochemistry**, v. 128, p. 281-291, 1982.

JIA, C.; LIU, X-F., QIAN, M-P.; JIANG, D-Q.; ZHANG, Y-P. Kinetic behavior of the general modifier mechanism of Botts and Morales with non-equilibrium binding. **Journal of Theoretical Biology**, v. 296, p. 13-20, 2012.

JOHNSON, K.A.; GOODY, R.S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, p. 8264-8269, 2011.

JOHNSON, K.A. Review: A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2753-2766, 2013.

RECHT, M.I.; TORRES, F.E.; BRUYKER, D.D.; BELL, A.G.; KLUMPP, M.; BRUCE, R.H. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 204-212, 2009.

SCHENKER, P.; BAICI, A. Simultaneous interaction of enzymes with two modifiers: reappraisal of kinetic models and new paradigms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 261, p. 318-329, 2009.

STOLERIU I.; DAVIDSON, F.A.; LIU, J.L. Quasi-steady state assumptions for non-isolated enzyme-catalysed reactions. **Journal of Mathematics Biology**, v. 48, p. 82-104, 2004.

TEOH, Y.P.; DON, M.M. Kinetic model for the hydrolysis of sterilized palm press fiber. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 3523-3530, 2011.

TZAFRIRI, A.R.; EDELMAN, E.R. Quasi-steady state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. **Journal of Theoretical Biology**, v. 245, p. 737-748, 2007.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Kinetic modeling of reaction in foods**. New York (USA): CRC Press, 2009. 788p.

Artigo 3

MODELO MATEMÁTICO PARA A CINÉTICA DE CONVERSÃO DA LACTOSE E DE SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) COM INIBIÇÃO PELA GLICOSE E PELA GALACTOSE

Resumo: O presente trabalho avaliou as propostas de modelos matemáticos para conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir da enzima β -galactosidase, comparando propostas da literatura que apresentaram soluções sem inibição enzimática, com inibição pela galactose e com inibição pela glicose, para desenvolver e propor um novo modelo baseado na cinética de Michaelis-Menten. Foram comparados processos genéricos em que o valor numérico da concentração do substrato foi representado como sendo superior em dez (10) vezes ao valor numérico da concentração da enzima e as constantes cinéticas receberam, inicialmente, um valor numérico unitário. Na sequência foram avaliadas situações com alteração nas taxas cinéticas e variação nos valores numéricos da concentração de enzima. O novo modelo proposto é representativo de um processo de inibição reversível tendo a glicose e a galactose como substâncias inibidoras. O mecanismo geral de inibição proposto teve seu desempenho comparado com modelos disponíveis na literatura. Os resultados indicaram que o novo modelo cinético teve desempenho robusto.

Palavras Chaves: Cinética enzimática. Conversão da lactose. Síntese de galacto-oligossacarídeos. Modelagem matemática.

1. INTRODUÇÃO

Na modelagem matemática para conversão da lactose, em um processo de hidrólise e transgalactosilação conduzido a partir da enzima β -galactosidase, parte-se da cinética de Michaelis-Menten que descreve a velocidade de reação enzimática na condição em que a concentração de substrato é superior à concentração da enzima e a soma das concentrações da enzima e dos complexos enzimáticos formados se mantém constante ao longo do tempo de

processamento (CHEN et al., 2003; KIM et al., 2004; JURADO et al., 2004; NERI et al., 2009).

Na maioria dos trabalhos que apresentam modelos matemáticos para conversão da lactose e síntese de galacto-oligosacarídeos (GOS) ocorre a intencional omissão da etapa de inibição para a solução do modelo. Alguns autores exibem uma etapa de inibição em seus modelos, mas retiram essa etapa na hora de buscar a solução do sistema de equações diferenciais ordinárias, argumentando que a etapa de inibição poderia ser negligenciada (CHEN et al., 2003; KIM et al., 2004; NERI et al., 2009; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ et al., 2011).

O modelo clássico de Michaelis-Menten não contempla a inibição, muito embora a ampla maioria dos processos enzimáticos não propicie conversão de 100% do substrato indicando que existe um ponto em que, para uma dada condição, o processo é interrompido (CHAUDHURY e IGOSHIN, 2010).

Os trabalhos disponíveis na literatura, via de regra, tratam a resolução da etapa de inibição a partir do pressuposto do estado estacionário ou ‘quase estacionário’, apontando um presumido equilíbrio entre a formação e a dissociação do complexo enzima substrato (TZAFRIRI e EDELMAN, 2007; STOLERIU et al., 2004; RECHT et al., 2009; BAKALIS et al., 2012).

As soluções para o problema geral da cinética enzimática no estado estacionário têm sido limitadas na ajuda aos pesquisadores, tendo em vista que os modelos gerados não se ajustam adequadamente às observações experimentais. Os inibidores são tradicionalmente caracterizados a partir do pressuposto de equilíbrio, no estado estacionário, entre o complexo enzimático de reação e o substrato. Segundo Fange e colaboradores (2011), o referido pressuposto seria válido apenas para enzimas muito ineficientes.

O presente trabalho propõe-se a avaliar as diferentes possibilidades de inibição do processo de hidrólise da lactose e transgalactosilação de GOS, sob a perspectiva estabelecida em diferentes modelos matemáticos disponíveis na literatura, e busca sugerir novo modelo, aplicável ao estado transiente, que represente melhor o citado processo.

Para atingir o referido objetivo, definiu-se um processo pictórico onde o valor nominal da concentração do substrato é superior em dez (10) vezes o valor nominal da concentração da enzima. Todas as constantes cinéticas, nesse processo genérico, assumem o valor unitário. A solução numérica dos sistemas não lineares de equações diferenciais ordinárias (EDOs) foi

obtida a partir de uma rotina elaborada no Matlab[®], com aplicação do método de Runge-Kutta de 4ª ordem. As respostas são apresentadas em figuras com dois gráficos distintos, mostrando, separadamente, a variação da enzima e dos complexos enzimáticos e, de outra parte, a variação do substrato e dos produtos.

1.1. Revisão dos modelos da literatura

No caso específico da cinética de conversão da lactose e transgalactosilação de GOS pela enzima β -galactosidase, a referência na literatura é o trabalho de Kim e colaboradores (2004), que propôs o modelo cinético sem inibição. Nesta referida proposta, E representa a concentração de enzima, GOS representa a concentração de galacto-oligossacarídeos, L a concentração de lactose, Ga a concentração de galactose e Gu a concentração de glicose.

Os complexos enzimáticos são representados por EL , complexo enzima substrato e por EGa , complexo enzima galactose. As constantes cinéticas são: k_1 , k_{-1} , k_2 , k_3 , k_{-3} , k_4 e k_{-4} .

A grande facilidade na solução do sistema de Michaelis-Menten, conforme a proposta de Kim e colaboradores (2004), mostrado no Esquema 1, diz respeito à inexistência de uma etapa de inibição, indicando que todo o substrato será convertido em produto, em um dado tempo, desde que se cumpra a premissa fundamental do modelo, ou seja, que a concentração da enzima seja inferior à concentração do substrato.

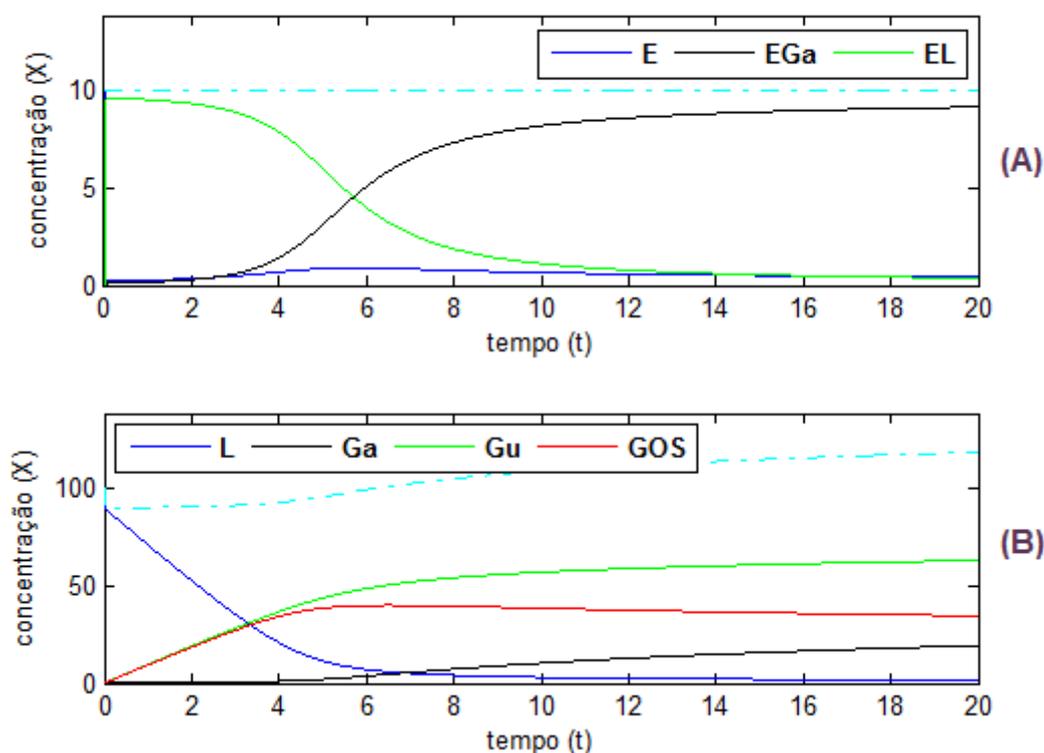
Esquema 1 – Modelo para conversão da lactose sem inibição



Fonte: Kim et al. (2004)

O sistema de equações diferenciais ordinárias para este modelo é mostrado no Anexo do presente artigo e a Figura 1 apresenta a solução numérica para o processo genérico, com concentração de substrato e de enzima com unidade hipotética (X), que representa uma relação entre massa e volume, e com o tempo de processo com unidade hipotética (t).

Figura 1 – Resposta do processo pictórico conforme modelo de Kim et al. (2004)



A Figura 1 mostra dois gráficos que representam a solução das EDOs representativas do modelo de Kim e colaboradores (2004). O gráfico da Figura 1-A apresenta a variação da enzima e dos complexos enzimáticos e, na linha pontilhada, a conservação de massa para essas variáveis. O gráfico da Figura 1-B apresenta a variação do substrato e dos produtos e, na linha pontilhada, a soma da contribuição destas variáveis.

Na Figura 1-B observa-se que o valor numérico da glicose rapidamente supera a metade do valor inicial do substrato e a linha pontilhada indica que não ocorre a conservação de massa para o somatório do substrato e produtos ao longo do processamento.

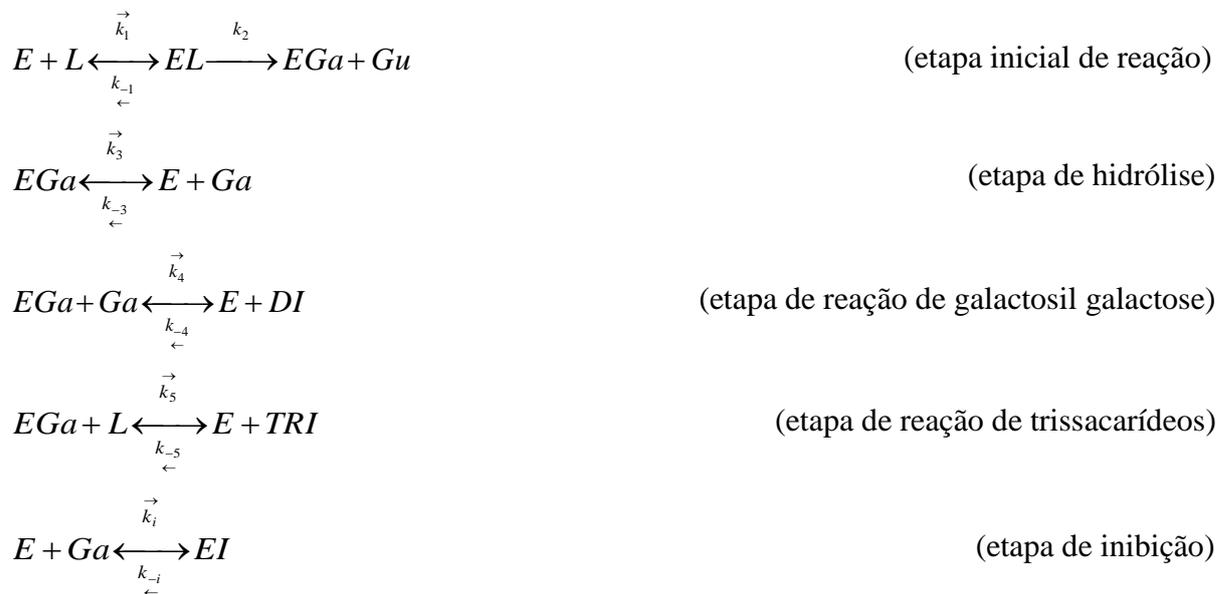
Importante observar na Figura 1-A que a linha pontilhada se mantém sempre no valor nominal da enzima adicionada, o que condiz com o atendimento da Lei de Conservação de Massas, ou seja:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dEL}{dt} + \frac{dEGa}{dt} = \frac{d}{dt}(E + EL + EGa) = 0 \quad (1)$$

No trabalho de Rodríguez-Fernández et al. (2011) foi desenvolvido um modelo para síntese de GOS a partir da lactulose com inibição pela galactose.

No Esquema 2 é mostrado esse modelo adaptado para a situação em que o substrato é a lactose. A única diferença para o modelo de Rodríguez-Fernández e colaboradores (2011) é a inserção da glicose, como produto da hidrólise do substrato, em lugar da frutose.

Esquema 2 – Modelo para conversão da lactose com inibição pela galactose



Fonte: adaptado de Rodríguez-Fernández et al. (2011)

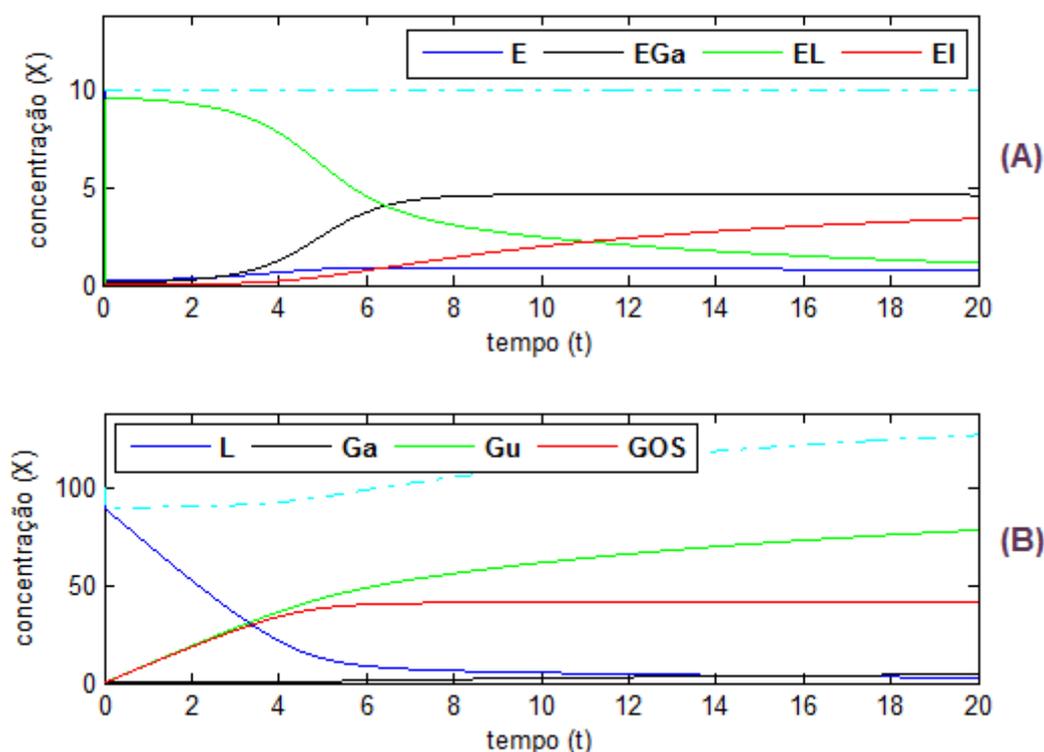
O composto *DI* representa um dissacarídeo do tipo galactosil galactose, o composto *TRI* representa um trissacarídeo do tipo galactosil lactose e *EI* representa o complexo de inibição. Para efeito de comparação entre os modelos do presente texto, fez-se a composição de *GOS* como sendo o somatório dos dissacarídeos e dos trissacarídeos (*DI + TRI*).

O sistema de equações diferenciais ordinárias para esse modelo é mostrado no Anexo do presente artigo e a Figura 2 apresenta a solução numérica para o processo genérico. É importante observar que ocorre uma tendência de incremento contínuo da glicose, mostrado

no gráfico da Figura 2-B. No limite, para esse modelo, a glicose aumentaria continuamente até atingir o valor nominal da concentração do substrato no início da reação.

Na solução do modelo de Rodríguez-Fernández et al. (2011), os autores consideraram a inibição como negligenciável, quando da comparação da proposta de modelo aos resultados experimentais.

Figura 2 – Resposta do modelo adaptado de Rodríguez-Fernández et al. (2011)

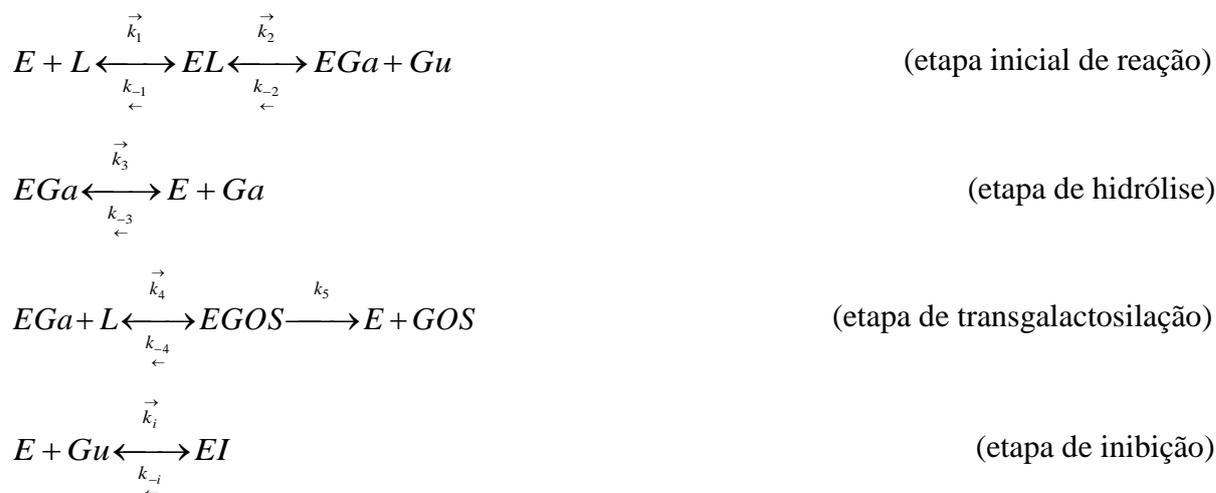


Mais recentemente, no trabalho de Palai e Bhattacharya (2013), a inibição é atribuída ao efeito da concentração de glicose sobre a enzima, conforme o modelo mostrado no Esquema 3, onde *EGOS* representa um complexo intermediário de formação dos galacto-oligossacarídeos.

A Figura 3 apresenta a solução numérica do processo pictórico proposto. O resultado do modelo de Palai e Bhattacharya (2013), para o processo genérico, aparenta ter um desempenho mais robusto que os anteriores.

O sistema de equações diferenciais ordinárias para o modelo de Palai e Bhattacharya (2013) é mostrado no Anexo do presente artigo.

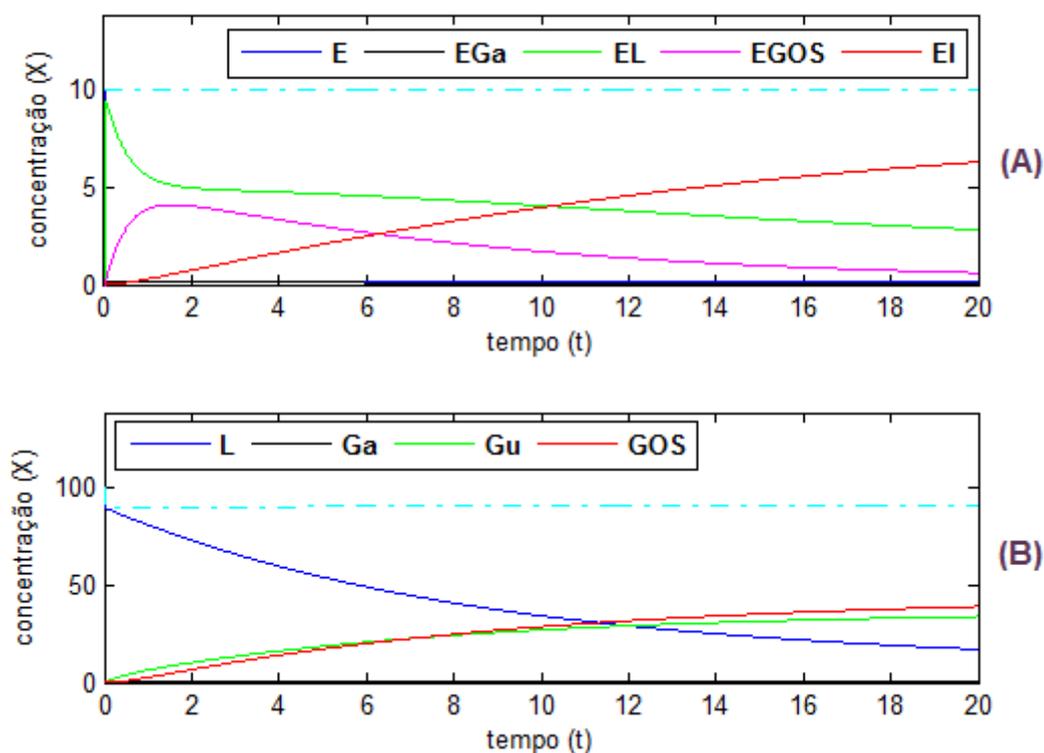
Esquema 3 – Modelo para conversão da lactose com inibição pela glicose



Fonte: Palai e Bhattacharya (2013)

Observa-se no resultado da Figura 3-B que no modelo de Palai e Bhattacharya (2013), diferentemente dos modelos anteriores, o valor numérico da glicose não supera a metade do valor da concentração inicial do substrato.

Figura 3 – Resposta do processo pictórico para o modelo de Palai e Bhattacharya (2013)



2. PROPOSIÇÃO DE NOVO MODELO

Para a elaboração de um novo modelo para expressar a conversão da lactose e síntese de GOS, baseado na cinética de Michaelis-Menten, faz-se necessário, inicialmente, o estabelecimento de algumas premissas:

- a) O modelo deve seguir estritamente a Lei de Conservação de Massas, no que se refere à variação do somatório da enzima e de seus complexos, ao longo de todo o tempo de processamento e de forma contínua.
- b) O modelo deve convergir o somatório dos carboidratos ao valor nominal do substrato adicionado, em um tempo suficientemente elevado e com o menor erro possível, para garantir estabilidade ao processo.
- c) O modelo deve exibir taxa de produção de produto da hidrólise do substrato (glicose e/ou galactose), ao final do processo, necessariamente não superior à metade do valor inicial do substrato, para atender a estequiometria da reação.
- d) O modelo deve ser suficientemente robusto e permitir a variação na relação enzima substrato em um tempo suficientemente elevado, garantindo a estabilidade ao processo.
- e) O modelo deve propiciar um desempenho do complexo de reação similar ao verificado na cinética de Michaelis-Menten, com uma alta taxa de formação no início da reação e com a redução de sua concentração ao longo do tempo, tendendo a zero ao final do processamento.
- f) O modelo deve propiciar uma formação inicial do complexo enzimático de inibição com valor igual a zero, com crescimento ao longo do tempo e tendendo ao valor inicial da enzima ao final do processo.

O modelo proposto parte do pressuposto de que a inibição ocorre por efeito do aumento tanto da concentração de glicose quanto por efeito do incremento da concentração de galactose. É, portanto, um típico modelo de inibição por efeito do incremento na concentração dos produtos de reação. Faz-se uma expressão genérica para os trissacarídeos (*TRI*), que podem ser formados tanto pela transgalactosilação da lactose (*L*) quanto do galactosil galactose (*DI*). O modelo gera um sistema não linear formado por nove (9)

equações diferenciais ordinárias e quinze (15) constantes cinéticas, mostrados no Anexo do presente artigo. A Figura 4 mostra o resultado da solução numérica do modelo do presente trabalho, para o processo pictórico com as mesmas condições anteriores.

Esquema 4 – Modelo para conversão da lactose com inibição pela glicose e galactose

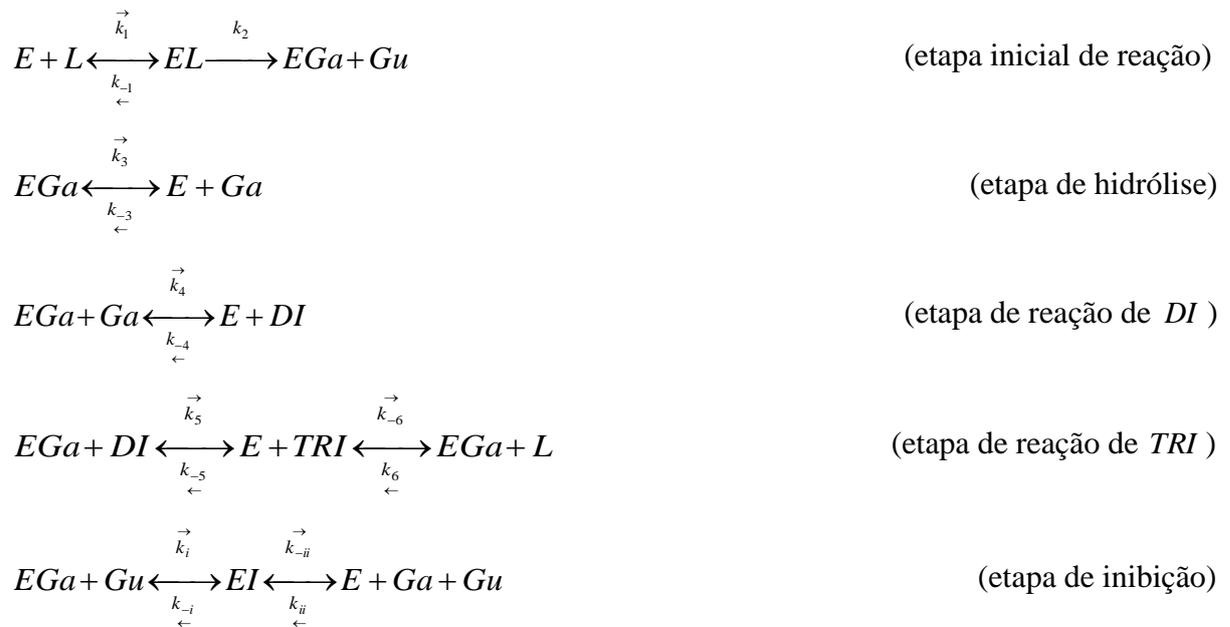
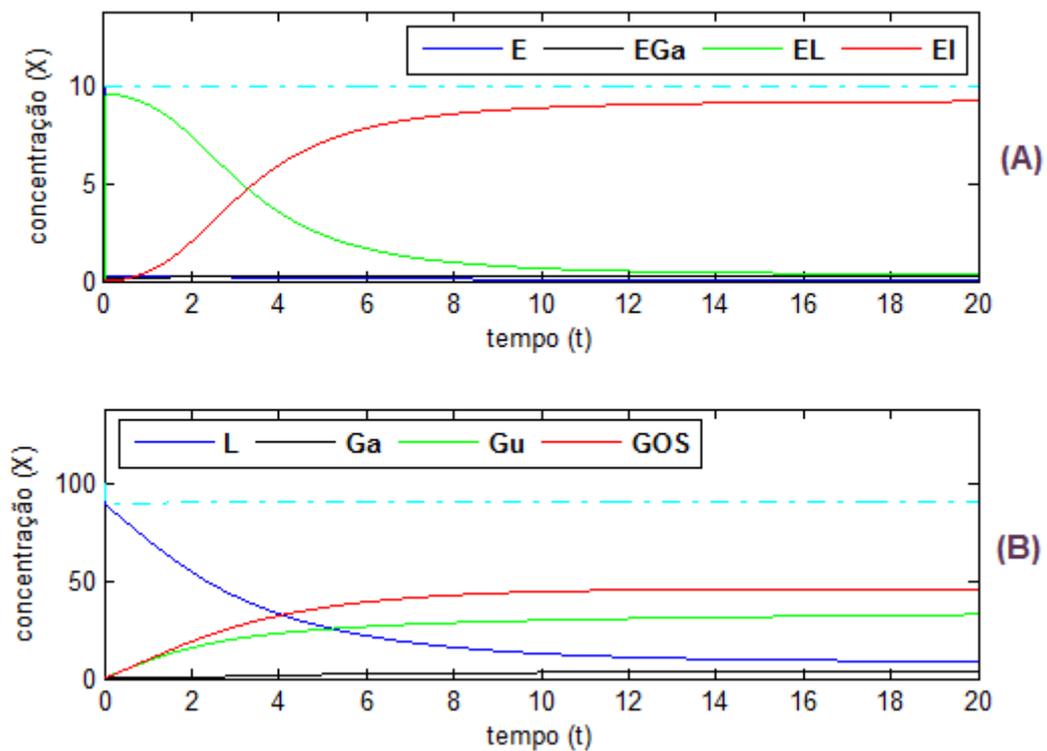


Figura 4 – Resposta do processo pictórico conforme o modelo do presente trabalho



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta de modelo do presente trabalho pressupõe o mecanismo de inibição pelo produto para expressar a etapa final da catálise, postulando que o efeito de inibição ocorre sobre o complexo de reação (EL) formando um complexo de inibição (EI).

Na etapa de inibição o modelo apresenta dois (2) efeitos: um efeito de inibição do tipo competitivo, onde os produtos galactose (Ga) e glicose (Gu) competem pelo sítio ativo da enzima livre (E); de outra parte, tem-se um efeito de inibição do tipo incompetitivo, onde a glicose (Gu) propicia a inibição no complexo formado pela enzima e a galactose (EGa).

O sistema não linear que modela a reação enzimática proposta nesse trabalho possui alta complexidade. São nove (9) equações diferenciais ordinárias (EDOs) e quinze (15) constantes cinéticas.

O gráfico da Figura 4-A mostra a variação da enzima e dos complexos enzimáticos com tendência de EI crescer para atingir o valor nominal do substrato inicial e EL com queda tendendo à zero, mantendo os demais componentes muito próximos de zero. O modelo segue estritamente a Lei de Conservação de Massas para a enzima e os complexos enzimáticos, ou seja:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dEL}{dt} + \frac{dEGa}{dt} + \frac{dEI}{dt} = \frac{d}{dt}(E + EL + EGa + EI) = 0 \quad (2)$$

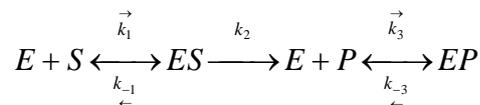
Também é possível observar, no gráfico mostrado na Figura 4-A, que a enzima livre (E) e o complexo enzima galactose (EGa) possuem variação muito próxima de zero ao longo de todo o processo, ou seja:

$$\frac{dE}{dt} \cong 0 ; \frac{dEGa}{dt} \cong 0 \quad (3)$$

Tal situação indica que, para o modelo do presente trabalho, o incremento do complexo de inibição (EI) é aproximadamente igual ao decréscimo do complexo de reação (EL) ao longo do tempo de processamento, ou seja:

$$\frac{dEI}{dt} \cong -\frac{dEL}{dt} \quad (4)$$

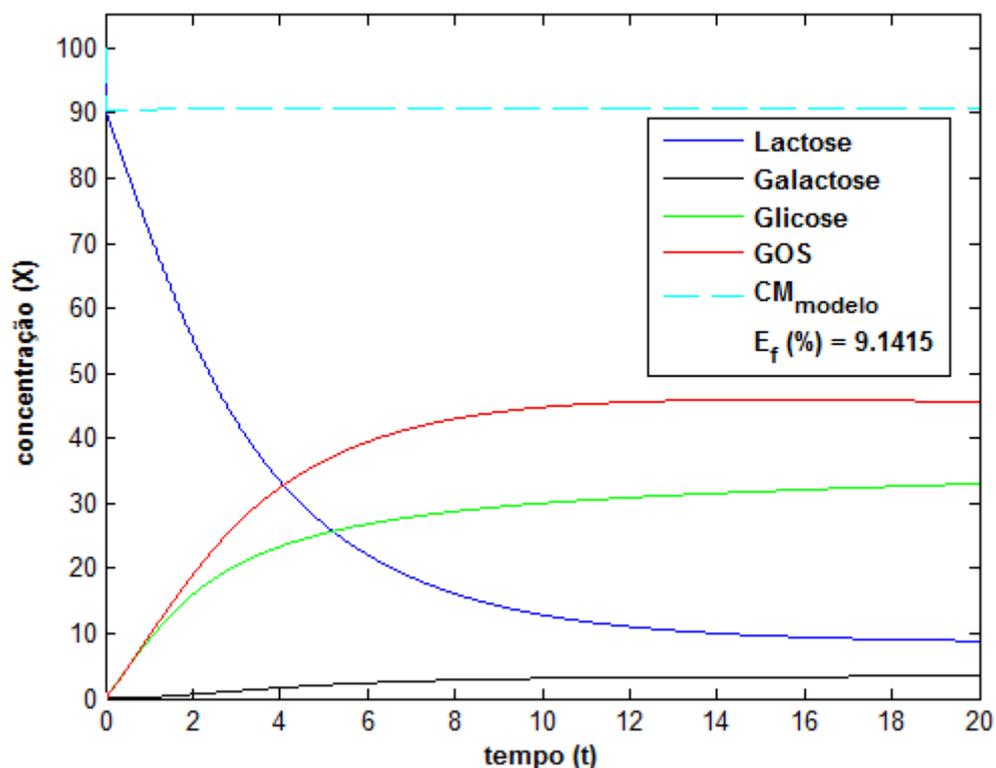
O referido comportamento é válido para qualquer conjunto de valores de constantes cinéticas que ajustem o modelo do presente trabalho a valores experimentais, indicando que essa proposta pode ser aproximada do comportamento esperado para o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, conforme Van Boekel (2009), onde, para um dado substrato S e para um dado produto P , têm-se as seguintes relações:



$$\frac{dE}{dt} + \frac{dES}{dt} + \frac{dEP}{dt} = \frac{d}{dt}(E + ES + EP) = 0 \rightarrow \frac{dE}{dt} \cong 0 \quad \therefore \frac{dEP}{dt} \cong -\frac{dES}{dt} \quad (5)$$

Na Figura 5 é mostrado o resultado do processo pictórico para a variação dos carboidratos para o modelo do presente trabalho com a avaliação da conservação de massa do substrato e produtos ao longo do processamento.

Figura 5. Resposta do modelo ($L = 100$; $E = 10$; $t = 20$ e constantes unitárias)

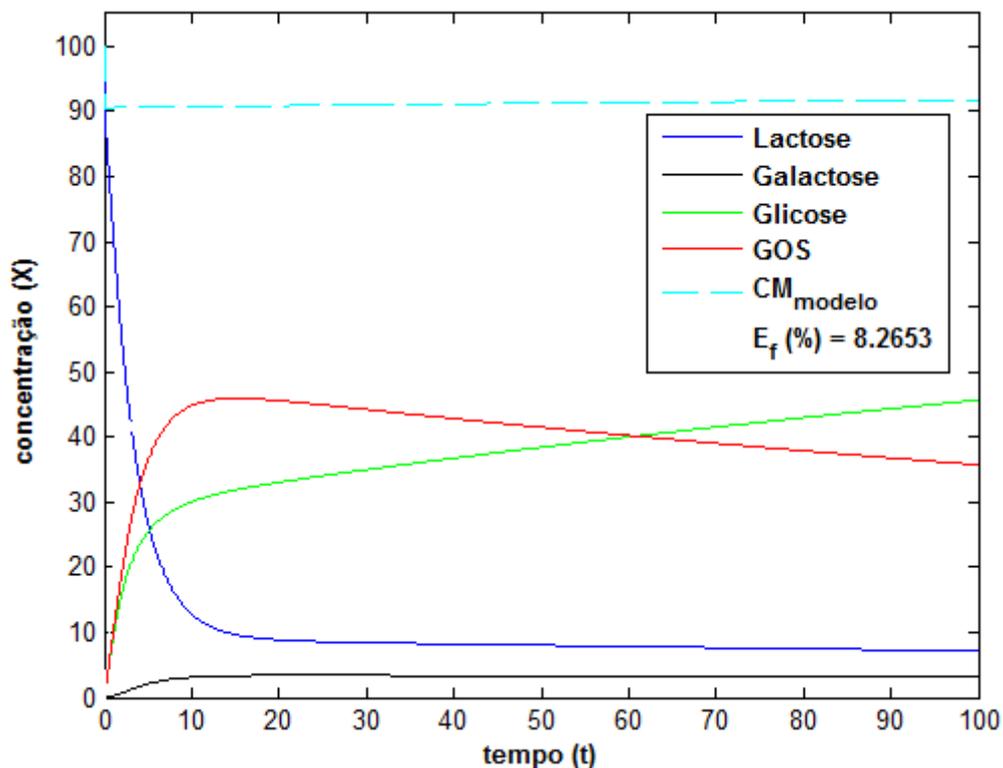


A conservação de massa ao final do processamento foi calculada a partir da expressão abaixo, onde L_0 é a concentração inicial do substrato e $y_i(n+1)$ é o valor da concentração de cada variável ao final do processo. A solução foi obtida pelo método de Runge-Kutta de ordem 4 e passo (h) de 1.10^{-3} . Verificou-se que, para as condições do processo da Figura 5, ocorreu um erro do modelo inferior a 9,15% ao final do processamento.

$$CM_{\text{modelo}} = \sum_{i=1}^v (y_i(n+1)) = L_0 \quad (6)$$

Na Figura 6 é mostrado o resultado do processo pictórico em que o tempo de processamento foi aumentado em cinco (5) vezes. Observa-se que o erro do modelo cai para aproximadamente 8,27%. A Figura 6 mostra, também, que o presente modelo permite representar a possibilidade de formação e posterior hidrólise de GOS ao longo do processo, ao contrário do modelo de Palai e Bhattacharya (2013), em que não é possível representar o efeito de hidrólise dos galacto-oligossacarídeos.

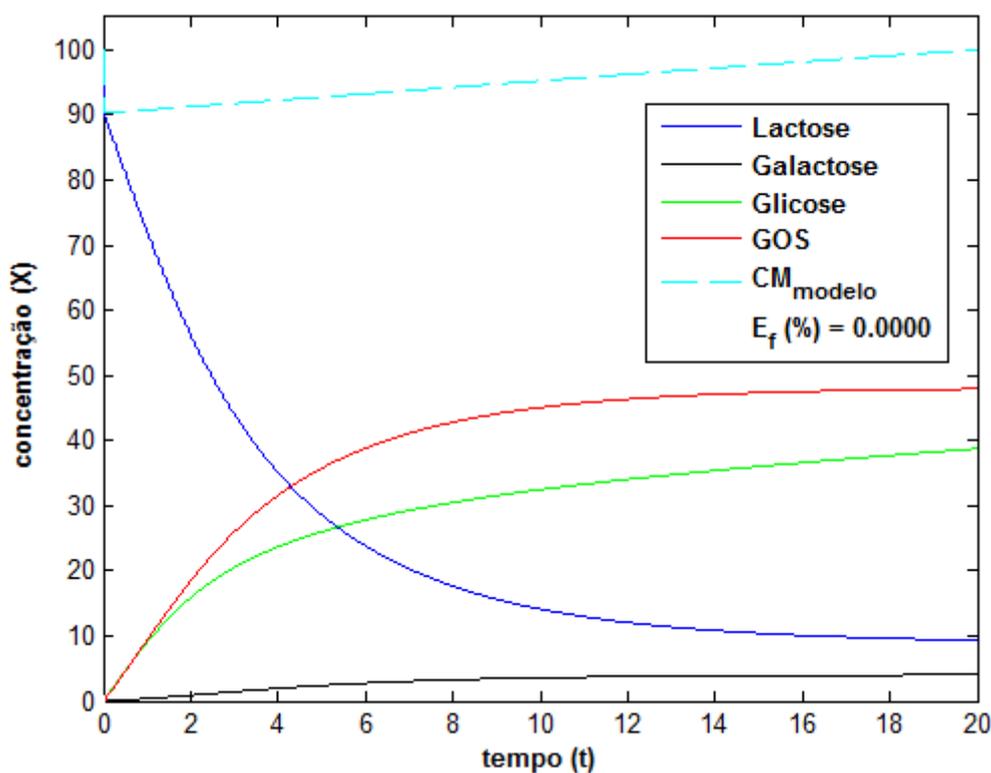
Figura 6 – Resposta do modelo ($L = 100$; $E = 10$; $t = 100$ e constantes unitárias)



Na Figura 7 é mostrado o resultado para o modelo do presente trabalho em que o ajuste permitiu um erro próximo de zero para a variação do substrato e dos produtos de reação, ao final do processo.

As constantes cinéticas na Figura 7 foram todas unitárias, à exceção da constante de hidrólise da lactose. O valor que propiciou a conservação de massa do modelo ao final do processamento foi $k_3 = 3,08656$.

Figura 7 – Resposta com conservação de massa ($k_3 = 3,08656$ e demais constantes unitárias)



A resposta da Figura 7 indica que existe uma condição de ajuste das constantes cinéticas aos resultados experimentais, que propicia a conservação de massa para o modelo ao final do processamento.

4. CONCLUSÃO

A conversão da lactose e a síntese de galacto-oligossacarídeos foram avaliadas a partir da elaboração de um novo modelo matemático para representar a cinética da reação, em um

processo enzimático com inibição pela glicose e pela galactose. A nova proposta foi comparada com os modelos sem inibição, com inibição pela galactose e com inibição pela glicose, disponíveis na literatura.

O desempenho do novo mecanismo de representação da cinética enzimática para conversão da lactose e síntese de GOS mostrou-se robusto no que se refere ao erro do modelo, bem como para a variação da relação enzima substrato e do tempo de processamento.

O modelo proposto é representado por um sistema com nove (9) equações diferenciais ordinárias e com quinze (15) constantes cinéticas, as quais podem assumir diferentes valores numéricos, fato que dificulta o ajuste do modelo aos resultados experimentais. No entanto, o adequado ajuste do modelo aos dados experimentais poderá propiciar a conservação de massa do substrato e produtos ao final do tempo de processamento.

REFERÊNCIAS

BAKALIS, E.; KOSMAS, M. PAPAMICHAEL, E.M. Perturbation theory in the catalytic rate constant of the Henry-Michaelis-Menten enzymatic reaction. **Bulletin Mathematical Biology**, v. 74, p. 2535-2546, 2012.

CHAUDHURY, S.; IGOSHIN, O.A. Dynamic disorder in quasi-equilibrium enzymatic systems. **PLoS ONE**, v. 08, e12364, 2010.

CHEN, C.W.; OU-YANG, C-C.; YEH, C-W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 33, p. 497-507, 2003.

FANGE, D.; LOVMAR, M.; PAVLOV, M.Y.; EHRENBERG, M. Identification of enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics. **Biochimie**, v. 93, p. 1623-1629, 2011.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 397-405, 2004.

KIM, C.S.; JI, E-S.; OH, D-K. A new kinetic model recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 316, p. 738-743, 2004.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.P.; FERREIRA, E.M.F.C.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO JR., R.B.; TEIXEIRA, J.A. Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol. **Food Chemical**, v. 115, p. 92-99, 2009.

PALAI, T.; BHATTACHARYA, P.K. Kinetic of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized of PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 668-673, 2013.

RECHT, M.I.; TORRES, F.E.; BRUYKER, D.D.; BELL, A.G.; KLUMPP, M.; BRUCE, R.H. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 204-212, 2009.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, M.; CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; BANGA, J.R. Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 116-124, 2011.

STOLERIU I.; DAVIDSON, F.A.; LIU, J.L. Quasi-steady state assumptions for non-isolated enzyme-catalysed reactions. **Journal of Mathematics Biology**, v. 48, p. 82-104, 2004.

TZAFRIRI, A.R.; EDELMAN, E.R. Quasi-steady state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. **Journal of Theoretical Biology**, v. 245, p. 737-748, 2007.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Kinetic modeling of reaction in foods**. New York (USA): CRC Press, 2009. 788p.

Anexo: Sistemas de equações diferenciais ordinárias.

a) Modelo do Esquema 1 (Kim et al., 2004)

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_4(EGa \cdot L) - k_{-4}(E \cdot GOS)$$

$$\frac{dEGa}{dt} = k_2EL + k_{-3}(E \cdot Ga) - k_3EGa + k_{-4}(E \cdot GOS) - k_4(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dEL}{dt} = k_1(E \cdot L) - k_{-1}EL - k_2EL$$

$$\frac{dL}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_{-4}(E \cdot GOS) - k_4(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dGa}{dt} = k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga)$$

$$\frac{dGu}{dt} = k_2EL$$

$$\frac{dGOS}{dt} = k_4(EGa \cdot L) - k_{-4}(E \cdot GOS)$$

b) Modelo do Esquema 2 (adaptado de Rodríguez-Fernández et al., 2011).

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_5(EGa \cdot L) - k_{-5}(E \cdot TRI) + k_{-i}EI - k_i(E \cdot Ga)$$

$$\frac{dEGa}{dt} = k_2EL + k_{-3}(E \cdot Ga) - k_3EGa + k_{-4}(E \cdot DI) - k_4(EGa \cdot Ga) + k_{-5}(E \cdot TRI) - k_5(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dEL}{dt} = k_1(E \cdot L) - k_{-1}EL - k_2EL$$

$$\frac{dEI}{dt} = k_i(E \cdot Ga) - k_{-i}EI$$

$$\frac{dL}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_{-5}(E \cdot TRI) - k_5(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dGa}{dt} = k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_{-4}(E \cdot DI) - k_4(EGa \cdot Ga) + k_{-i}EI - k_i(E \cdot Ga)$$

$$\frac{dGu}{dt} = k_2EL$$

$$\frac{dDI}{dt} = k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI)$$

$$\frac{dTRI}{dt} = k_5(EGa \cdot L) - k_{-5}(E \cdot TRI)$$

$$\frac{dGOS}{dt} = \frac{dDI}{dt} + \frac{dTRI}{dt} = k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_5(EGa \cdot L) - k_{-5}(E \cdot TRI)$$

c) Modelo do Esquema 3 (Palai e Bhattacharya, 2013).

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_5EGOS + k_{-i}EI - k_i(E \cdot Gu)$$

$$\frac{dEGa}{dt} = k_2EL - k_{-2}(EGa \cdot Gu) + k_{-3}(E \cdot Ga) - k_3EGa + k_{-4}EGOS - k_4(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dEL}{dt} = k_1(E \cdot L) - k_{-1}EL + k_{-2}(EGa \cdot Gu) - k_2EL$$

$$\frac{dEGOS}{dt} = k_4(EGa \cdot L) - k_{-4}EGOS - k_5EGOS$$

$$\frac{dEI}{dt} = k_i(E \cdot Gu) - k_{-i}EI$$

$$\frac{dL}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_{-4}EGOS - k_4(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dGa}{dt} = k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga)$$

$$\frac{dGu}{dt} = k_2EL - k_{-2}(EGa \cdot Gu) + k_{-i}EI - k_i(E \cdot Gu)$$

$$\frac{dGOS}{dt} = k_5EGOS$$

d) Modelo do Esquema 4 (presente trabalho).

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_5(EGa \cdot DI) - (k_{-5} + k_{-6}) \cdot (E \cdot TRI) + k_6(EGa \cdot L) + k_{-ii}EI - k_{ii}(E \cdot Ga \cdot Gu)$$

$$\frac{dEGa}{dt} = k_2EL + k_{-3}(E \cdot Ga) - k_3EGa + k_{-4}(E \cdot DI) - k_4(EGa \cdot Ga) + (k_{-5} + k_{-6}) \cdot (E \cdot TRI) - k_5(EGa \cdot DI) - k_6(EGa \cdot L) + k_{-i}EI - k_i(EGa \cdot Gu)$$

$$\frac{dEL}{dt} = k_1(E \cdot L) - k_{-1}EL - k_2EL$$

$$\frac{dEI}{dt} = k_i(EGa \cdot Gu) - k_{-i}EI + k_{ii}(E \cdot Ga \cdot Gu) - k_{-ii}EI$$

$$\frac{dL}{dt} = k_{-1}EL - k_1(E \cdot L) + k_{-6}(E \cdot TRI) - k_6(EGa \cdot L)$$

$$\frac{dGa}{dt} = k_3EGa - k_{-3}(E \cdot Ga) + k_{-4}(E \cdot DI) - k_4(EGa \cdot Ga) + 0,5 \cdot k_{-ii}EI - 0,5 \cdot k_{ii}(E \cdot Ga \cdot Gu)$$

$$\frac{dGu}{dt} = k_2EL + k_{-i}EI - k_i(EGa \cdot Gu) + 0,5 \cdot k_{-ii}EI - 0,5 \cdot k_{ii}(E \cdot Ga \cdot Gu)$$

$$\frac{dDI}{dt} = k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_{-5}(E \cdot TRI) - k_5(EGa \cdot DI)$$

$$\frac{dTRI}{dt} = k_5(EGa \cdot DI) - k_{-5}(E \cdot TRI) + k_6(EGa \cdot L) - k_{-6}(E \cdot TRI)$$

$$\frac{dGOS}{dt} = \frac{dDI}{dt} + \frac{dTRI}{dt} = k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_{-5}(E \cdot TRI) - k_5(EGa \cdot DI) + k_5(EGa \cdot DI) - k_{-5}(E \cdot TRI) + k_6(EGa \cdot L) - k_{-6}(E \cdot TRI)$$

$$\frac{dGOS}{dt} = k_4(EGa \cdot Ga) - k_{-4}(E \cdot DI) + k_6(EGa \cdot L) - k_{-6}(E \cdot TRI)$$

Artigo 4

MODELO MATEMÁTICO APLICADO À CONVERSÃO DA LACTOSE E SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS)

Resumo: O presente trabalho avaliou a aplicação de novo modelo matemático para representar a conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS), a partir da enzima β -galactosidase. O novo modelo, baseado na cinética de Michaelis-Menten, pressupõe que o efeito de inibição enzimática ocorra devido ao incremento da concentração de produtos da própria reação. O novo modelo proposto é representativo de um processo de inibição reversível tendo a glicose e a galactose como substâncias inibidoras. Na comparação do modelo aos valores experimentais, observou-se que o ajuste para galacto-oligossacarídeos, para a lactose, para a glicose e para a galactose propiciou que a média do somatório dos erros quadráticos (SME) variasse entre 0,11 e 0,80%, em processos com erro do modelo nulo ao final do processamento. Os valores do somatório da média dos erros quadráticos indicaram que o ajuste do modelo aos dados experimentais foi tanto melhor quanto maior a concentração inicial de enzima, menor a concentração inicial de substrato e menor a temperatura da catálise enzimática.

Palavras Chaves: Cinética enzimática. Conversão da lactose. Síntese de galacto-oligossacarídeos.

1. Introdução

Na modelagem matemática para conversão da lactose, em um processo de hidrólise e transgalactosilação conduzido a partir da enzima β -galactosidase, parte-se da cinética de Michaelis-Menten que descreve a velocidade de reação enzimática na condição em que a concentração de substrato é superior à concentração da enzima e a soma das concentrações da enzima e dos complexos enzimáticos formados se mantém constante ao longo do tempo de processamento (CHEN et al., 2003; KIM et al., 2004; JURADO et al., 2004; NERI et al., 2009).

Um traço comum entre a maioria os trabalhos que apresentam modelos matemáticos para conversão da lactose e síntese de galacto-oligosacarídeos (GOS) é a intencional omissão da etapa de inibição para a solução do modelo. Alguns autores exibem uma etapa de inibição em seus modelos, mas retiram essa etapa na hora de buscar a solução do sistema de equações diferenciais ordinárias, argumentando que a etapa de inibição poderia seria negligenciada (NERI et al., 2009; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ et al., 2011).

O modelo clássico de Michaelis-Menten não contempla a inibição, muito embora a ampla maioria dos processos enzimáticos não propicie conversão de 100% do substrato indicando que existe um ponto em que, para uma dada condição, o processo é interrompido (CHAUDHURY e IGOSHIN, 2010).

Os trabalhos disponíveis na literatura, via de regra, tratam a resolução da etapa de inibição a partir do pressuposto do estado estacionário ou ‘quase estacionário’, apontando um presumido equilíbrio entre a formação e a dissociação do complexo enzima substrato (TZAFRIRI e EDELMAN, 2007; STOLERIU et al., 2004; RECHT et al., 2009; BAKALIS et al., 2012).

As soluções para o problema geral da cinética enzimática no estado estacionário têm sido limitadas na ajuda aos pesquisadores, tendo em vista que os modelos gerados não ajustam adequadamente às observações experimentais. Os inibidores são tradicionalmente caracterizados a partir do pressuposto de equilíbrio, no estado estacionário, entre o complexo enzimático de reação e o substrato. Esse pressuposto seria válido apenas para enzimas muito ineficientes (FANGE et al., 2011).

O presente trabalho propõe-se a apresentar um modelo para representar o processo de hidrólise da lactose e transgalactosilação de GOS com inibição pela glicose e galactose, comparando seu ajuste a valores experimentais no estado transiente, sem negligenciar a etapa de inibição quando da solução do sistema não linear.

2. Modelo

O modelo proposto parte da hipótese que a inibição ocorre por efeito do aumento tanto da concentração de glicose quanto da galactose.

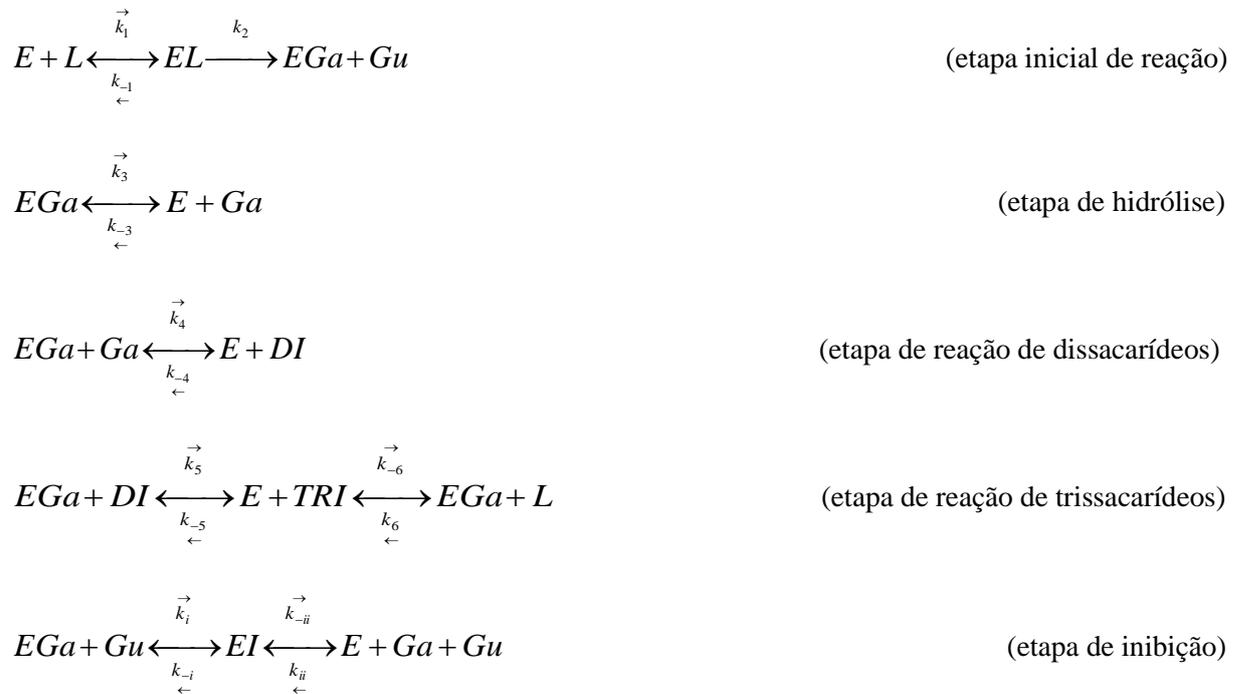
No Esquema 1 o substrato, a lactose (L), é convertida pela enzima (E) em glicose (Gu) e galactose (Ga), além do dissacarídeo galactosil galactose (DI) e de trissacarídeos

(*TRI*). Os complexos enzimáticos são: *EL* (complexo de reação); *EGa* (complexo de hidrólise e formação dos produtos) e *EI* (complexo de inibição).

Parte-se do pressuposto de que os trissacarídeos (*TRI*) podem ser obtidos tanto pela transgalactosilação da lactose quanto do dissacarídeo galactosil galactose. Os galacto-oligosacarídeos (*GOS*) são formados pela soma dos dissacarídeos e dos trissacarídeos.

O sistema não linear que modela esta reação enzimática possui alta complexidade, com nove (9) equações diferenciais ordinárias (EDOs) e quinze (15) constantes cinéticas. O balanço de massa aplicado à quantidade de inibição, com respeito aos produtos, é relativo à massa molecular de cada substância.

Esquema 1 – Proposta de mecanismo geral para conversão da lactose e síntese de GOS



Para o ajuste das constantes utilizou-se o conceito da média do somatório dos erros quadráticos (*SME*), comparando as medidas experimentais com as correspondentes respostas do modelo (DON e SHOPARWE, 2010).

Na equação a seguir, *SME* é a média do somatório dos erros quadráticos, *V* é o número total de variáveis medidas e *M* é o número total de medições de cada variável. O valor *n* corresponde ao número de pontos calculados conforme o passo escolhido para a solução numérica do método de Runge-Kutta.

$$SME(\%) = \left(\frac{\sum_{i=1}^V \sum_{t=1}^M (y_{i,\text{exp}}(t) - y_i(t,n))^2}{n+1} \right) * 100 \quad (1)$$

O componente $y_{i,\text{exp}}(t)$ refere-se aos valores experimentais das variáveis em um dado tempo, enquanto $y_i(t,n)$ refere-se aos valores previstos pelo modelo para as variáveis no tempo.

A média do somatório dos erros quadráticos é expressa em percentual (%) e indica a proximidade do ajuste do modelo aos valores experimentais, sendo o resultado obtido tanto melhor quanto mais próximo de zero for o valor numérico do *SME* (DON e SHOPARWE, 2010).

A implementação das respostas, incluindo os cálculos de *SME*, foi realizada a partir de rotina criada no Matlab[®], usando o método de Runge-Kutta de ordem 4 e com passo (h) de 1.10^{-3} .

A conservação de massa ao final do processamento foi calculada a partir da seguinte expressão, onde L_0 é a concentração inicial do substrato e $y_i(n+1)$ é o valor da concentração de cada carboidrato ao final do processo.

$$CM_{\text{modelo}} = \sum_{i=1}^V (y_i(n+1)) = L_0 \quad (2)$$

3. Dados experimentais

Para avaliar o comportamento do modelo proposto com respeito aos resultados experimentais, partiu-se de dados experimentais obtidos pela equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG (LISBOA et al, 2012).

No estudo de Lisboa e colaboradores (2012), a enzima comercial Lactozym 3000L[®] (Novozymes, Dinamarca) foi utilizada em um processo de síntese de GOS, tendo a lactose como substrato. A Tabela 1 sumariza as condições experimentais utilizadas.

Tabela 1. Condições experimentais na conversão da lactose e síntese de GOS

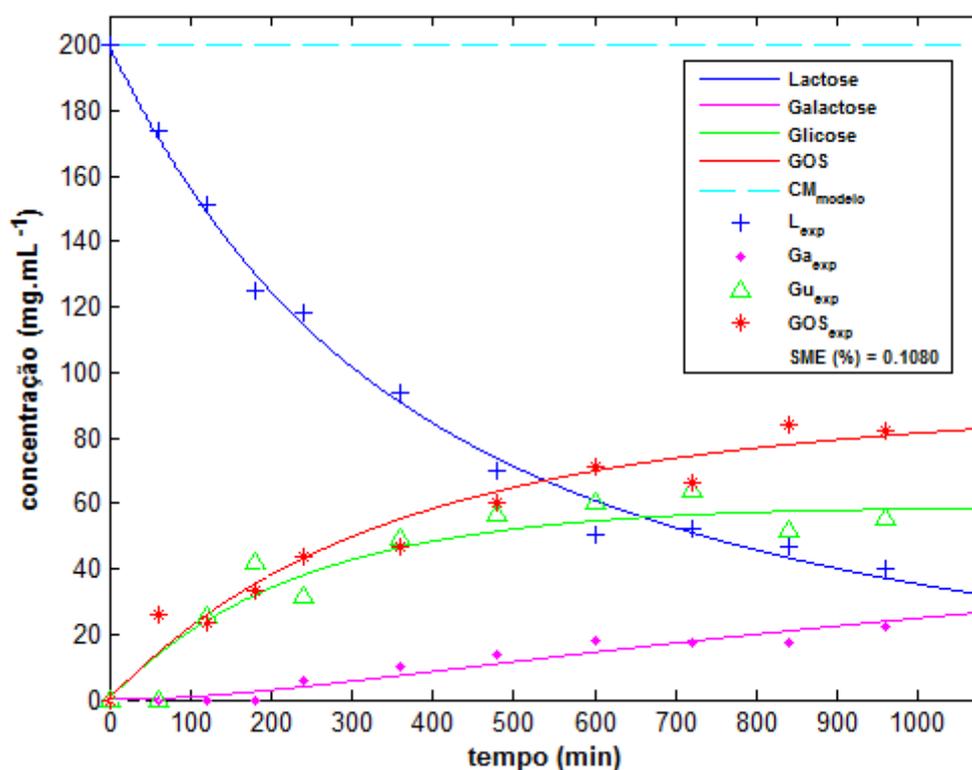
Condição	Temperatura (°C)	Enzima (U.mL ⁻¹)	Lactose (mg.mL ⁻¹)
01	30	10	200
02	30	10	400
03	30	5	200
04	40	10	400

Partiu-se de 125 mL de solução de lactose em tampão fosfato, com concentração de substrato e de enzima conforme as condições definidas na Tabela 1.

Para fins da aplicação das condições iniciais do processo ao modelo matemático do presente trabalho, a atividade enzimática foi convertida em concentração mássica de enzima, com base na composição do extrato enzimático, correspondendo a 0,056 mg.mL⁻¹ e 0,112 mg.mL⁻¹, respectivamente para 5 U.mL⁻¹ e 10 U.mL⁻¹.

A Figura 1 apresenta a resposta da condição 01, com 200 mg.mL⁻¹ de lactose e concentração de enzima igual a 0,112 mg.mL⁻¹, na temperatura de reação de 30°C.

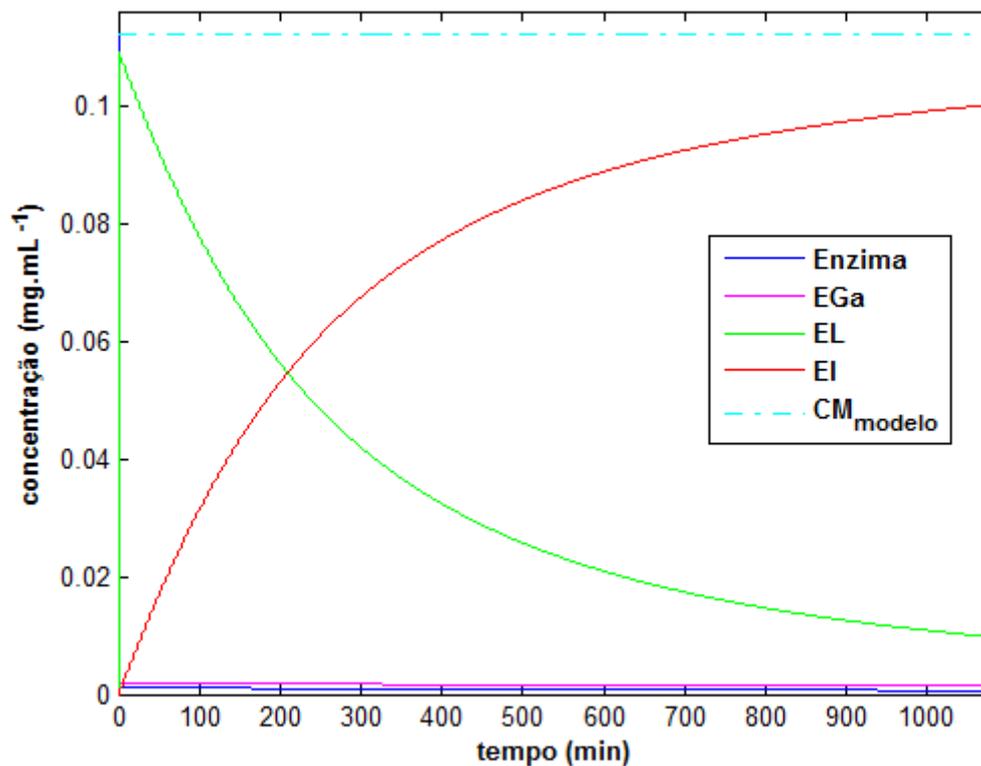
Figura 1 – Resultado do modelo para o ajuste aos valores experimentais (condição 01)



A linha pontilhada da Figura 1 indica que a solução do modelo respeitou a conservação de massa (CM) do substrato e produtos ao longo do processamento. E o erro do modelo observado ao final do processo foi aproximadamente zero.

A Figura 2 apresenta o resultado para a variação da enzima livre e dos complexos enzimáticos a partir do ajuste das constantes cinéticas realizado para a solução da condição 01.

Figura 2 – Resultado do modelo para a variação da enzima e complexos (condição 01)



Observa-se no resultado da Figura 2 que o processo segue estritamente a Lei de Conservação de Massas para a enzima e os complexos enzimáticos, ou seja:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dEL}{dt} + \frac{dEGa}{dt} + \frac{dEI}{dt} = \frac{d}{dt}(E + EL + EGa + EI) = 0 \quad (3)$$

Também é possível observar, no gráfico mostrado na Figura 2, que a enzima livre (E) e o complexo enzima galactose (EGa) possuem variação muito próxima de zero ao longo de todo o processo, ou seja:

$$\frac{dE}{dt} \cong 0 ; \frac{dEGa}{dt} \cong 0 \quad (4)$$

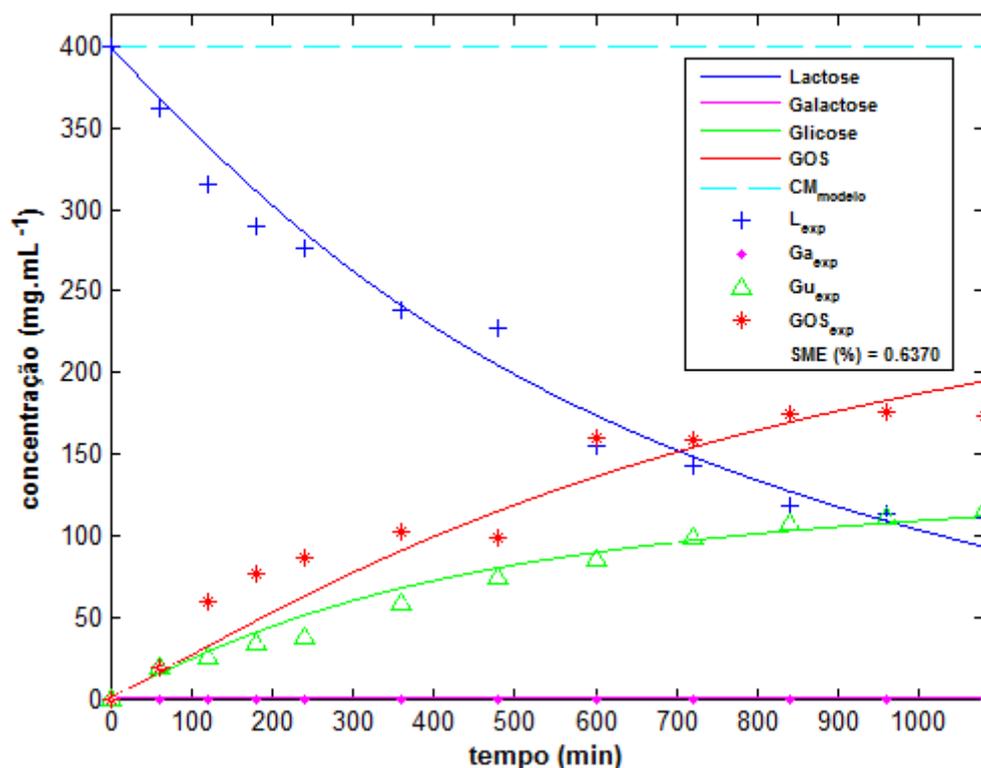
Tal situação indica que, para o modelo do presente trabalho, o incremento do complexo de inibição (EI) é aproximadamente igual ao decréscimo do complexo de reação (EL) ao longo do tempo de processamento, ou seja:

$$\frac{dEI}{dt} \cong -\frac{dEL}{dt} \quad (5)$$

O referido comportamento é válido para qualquer conjunto de valores de constantes cinéticas que ajustem o modelo do presente trabalho a valores experimentais, indicando que essa proposta pode ser aproximada do comportamento esperado para o modelo cinético clássico de Michaelis-Menten com inibição pelo produto.

O resultado mostrado na Figura 3 compara o modelo com os resultados da condição 02 apresentada na Tabela 1, cuja única diferença para a Figura 1 foi o aumento da concentração de substrato, de 200 mg.mL^{-1} para 400 mg.mL^{-1} .

Figura 3 – Resultado do modelo para o ajuste aos valores experimentais (condição 02)



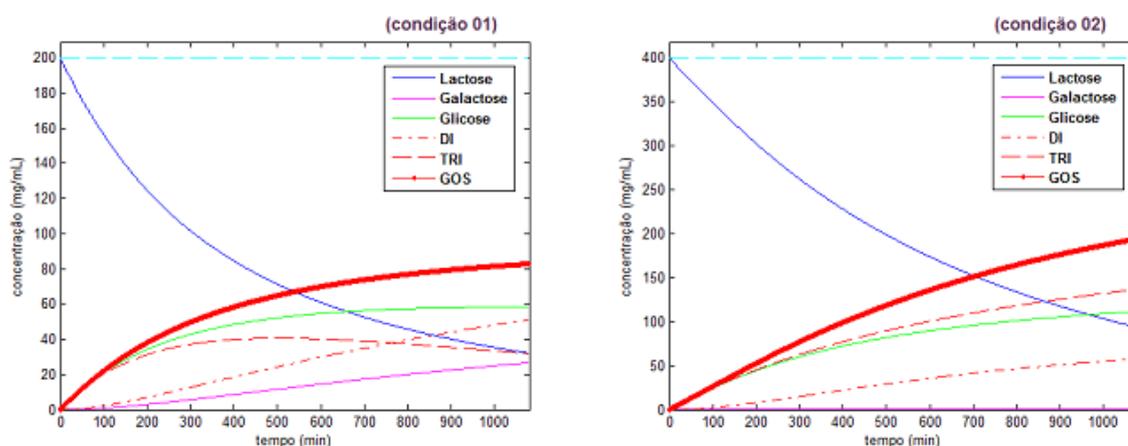
Uma diferença importante entre o resultado mostrado na Figura 3, quando comparado com o resultado da Figura 1, diz respeito ao comportamento da galactose.

Verifica-se na Figura 3 que a galactose permanece igual a zero em todo o processamento. Isso parece indicar que a condição de incremento na concentração do substrato, e conseqüente redução da atividade de água da solução, tende a favorecer a incorporação do monossacarídeo galactose à estrutura dos GOS.

Na Figura 3 observa-se que o modelo teve dificuldades em ajustar os resultados experimentais no início da reação, ao contrário da resposta mostrada na Figura 1.

A Figura 4 compara a resposta dos modelos nas condições 01 e 02, aplicando as constantes cinéticas das respostas das Figuras 1 e 3, respectivamente. A Figura 4 apresenta, ainda, o comportamento para os dissacarídeos galactosil galactose (*DI*) e os trissacarídeos (*TRI*) separadamente, além da soma destes dois componentes como representação da resposta do modelo para os GOS.

Figura 4 – Comparação entre as respostas do modelo para as condições 01 e 02



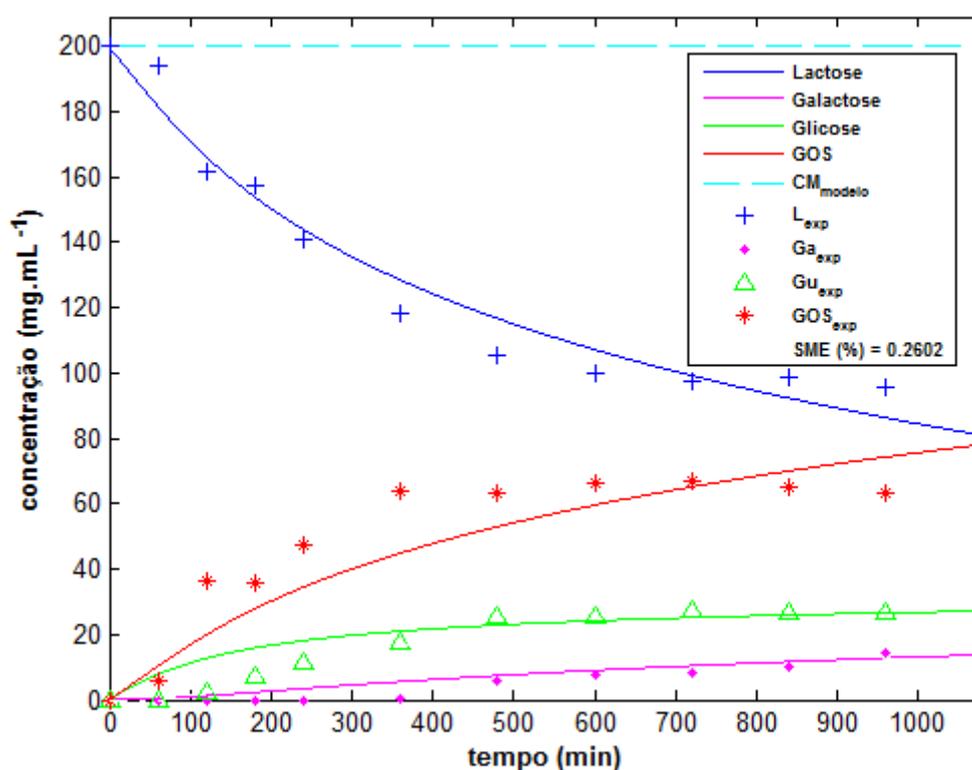
Observa-se na resposta para a condição 02, apresentada na Figura 4, que ocorre crescimento contínuo nos valores numéricos de *DI* e *TRI*, possivelmente pelo efeito da inexistência de concentração de galactose ao longo de todo o processamento.

Na condição 01 da Figura 4, ao contrário da condição 02, é observada tanto a hidrólise de trissacarídeos, a partir de um determinado tempo do processo, quanto o efeito do incremento na concentração de galactose.

A Figura 5 apresenta o resultado para a condição 03 do trabalho de Lisboa e colaboradores (2012), onde a concentração inicial de lactose foi fixada em 200 mg.mL^{-1} e a concentração de enzima foi reduzida para $0,056 \text{ mg.mL}^{-1}$. A temperatura de reação nesse processo foi mantida em 30°C .

Observa-se na Figura 5 que o modelo apresentou dificuldades em ajustar a resposta aos resultados experimentais no início da reação, a exemplo do ocorrido na condição mostrada na Figura 3. A resposta da Figura 5 não propiciou, também, o ajuste do modelo ao efeito da hidrólise dos GOS ao final do tempo de processamento.

Figura 5 – Resultado do modelo para o ajuste aos valores experimentais (condição 03)

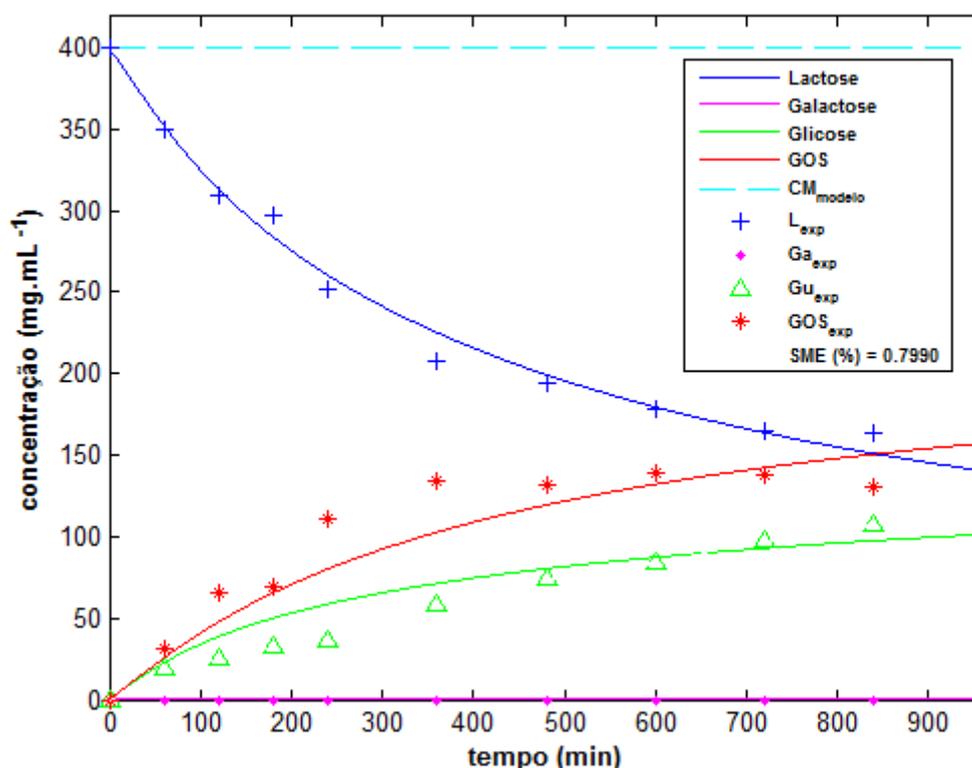


A Figura 6 apresenta o resultado da condição 04 do trabalho de Lisboa et al. (2012), com concentração de enzima e de substrato idênticas ao da Figura 3, mas com temperatura de reação de 40°C .

A Figura 6 mostra, a exemplo da resposta da Figura 3, a condição em que a galactose permanece com valor igual a zero ao longo de todo o processo. Na Figura 6 observa-se idêntica dificuldade do modelo em representar a resposta de GOS e glicose no início da reação e a hidrólise de GOS ao final do processamento, observadas na Figura 5. Aparentemente, no

que se refere aos resultados experimentais da condição 04, a hidrólise de GOS não gerou incremento na concentração de galactose.

Figura 6 – Resultado do modelo para o ajuste aos valores experimentais (condição 04)



A Tabela 2 apresenta os valores das constantes cinéticas para cada condição de processo avaliado. Observa-se na Tabela 2 que o maior valor numérico para a constante inicial da reação, k_1 , ocorreu na condição 01. Para Lisboa et al. (2012), a melhor resposta no que se refere à síntese enzimática foi a da condição 02.

Considerando que a diferença entre as condições 01 e 02 foi exclusivamente o incremento na concentração do substrato, situação que gerou como consequência experimental o comportamento de inexistência de concentração de galactose, ao longo do tempo, no processo com maior concentração inicial de lactose (condição 02), é importante avaliar a diferença nos valores das constantes cinéticas nestas citadas respostas.

Segundo Lisboa e colaboradores (2012), o incremento na concentração do substrato favorece a reação de transgalactosilação. A diferença entre os valores numéricos das constantes referentes às etapas de hidrólise de *EGa* (k_3 e k_{-3}) e de reação de *DI* (k_4 e k_{-4}) podem indicar os motivos dos comportamentos mostrados na Figura 4.

Tabela 2. Valores das constantes cinéticas para ajuste às condições experimentais

Constante cinética	Condição 01	Condição 02	Condição 03	Condição 04
k_1 (mL.min.mg ⁻¹)	1,317	0,462	0,519	0,701
k_{-1} (min ⁻¹)	0,552	0,801	11,952	9,246
k_2 (mL.min.mg ⁻¹)	2,329	2,309	3,129	3,780
k_3 (mL.min.mg ⁻¹)	0,069	0,700	0,071	0,367
k_{-3} (min ⁻¹)	0,001	1,254	0,001	0,501
k_4 (mL.min.mg ⁻¹)	0,001	0,931	0,001	0,281
k_{-4} (min ⁻¹)	0,001	0,502	0,001	0,910
k_5 (mL.min.mg ⁻¹)	0,008	0,539	0,011	1,880
k_{-5} (min ⁻¹)	1,769	0,991	1,869	0,850
k_6 (mL.min.mg ⁻¹)	0,744	1,593	0,944	2,030
k_{-6} (min ⁻¹)	0,898	0,001	1,098	4,232
k_i (mL.min.mg ⁻¹)	1,715	1,002	3,415	1,100
k_{-i} (min ⁻¹)	1,010	1,016	0,910	1,780
k_{ii} (mL.min.mg ⁻¹)	0,058	3,043	0,158	1,480
k_{-ii} (min ⁻¹)	1,034	0,589	1,934	0,620

As respostas do modelo apresentadas na Figura 4, quando mostraram os comportamentos de *DI* e *TRI* para as condições 01 e 02, indicaram que a hidrólise dos trissacarídeos ocorreu apenas na condição de menor concentração inicial de lactose. Na condição de maior concentração de substrato o que ocorreu foi que a galactose permaneceu nula ao longo do tempo de processo.

Em especial quando se verificam que os valores dessas citadas constantes cinéticas, na condição 03, são semelhantes aqueles valores observados na condição 01. Cabe ressaltar que as condições 01 e 03 apresentaram resultados experimentais com incremento da concentração de galactose ao longo do processo. Ao contrário das condições 02 e 04, em que a concentração desse carboidrato permaneceu nula ao longo de todo o tempo de processamento.

No trabalho de Palai e Bhattacharya (2013), em um processo que partiu de substrato com concentração inicial de 100 e 150 g.L⁻¹ e com enzima na concentração inicial de 6 e de 12 kU.L⁻¹, respectivamente, realizou-se uma conversão de lactose avaliada em um intervalo de reação de 30h. As constantes cinéticas, no citado trabalho, variaram desde valores numéricos na faixa de $6,6 \cdot 10^{-7}$ até $1,8 \cdot 10^3$. No presente trabalho o intervalo de variação numérica das constantes cinéticas foi significativamente mais estreito. Os resultados experimentais no

trabalho de Palai e Bhattacharya (2013) foram obtidos a partir da β -galactosidase comercial Biolacta[®] FN5, em um processo conduzido com enzima imobilizada. No presente trabalho foi utilizada, igualmente, uma enzima comercial, a Lactozym[®] 3000L, em um processo conduzido em meio livre.

No trabalho de Rodríguez-Fernández et al. (2011), que estudou a formação de GOS a partir da lactulose usando a mesma enzima comercial utilizada no presente trabalho, cuja reação foi estudada na temperatura de 40°C, os valores das constantes cinéticas variaram entre $8,3 \cdot 10^{-1}$ e $1,2 \cdot 10^2$, em um modelo onde o efeito de inibição não foi considerado para a solução do sistema de equações não lineares.

No trabalho de Metelkin et al. (2009), que estudou a conversão da lactose a partir de β -galactosidase obtida de *Escherichia coli*, os valores numéricos das constantes cinéticas variaram entre 20 e $4 \cdot 10^4$ em um modelo onde a inibição foi negligenciada.

No presente trabalho todos os ajustes do modelo aos resultados experimentais foram realizados para propiciar erro zero do modelo, ou seja, o somatório dos valores do substrato e produtos tendeu para o valor numérico da concentração inicial do substrato ao longo do processamento. No trabalho de Rodríguez-Fernández et al. (2011), o erro do modelo ao final do processo ficou abaixo de 10%, para um processo conduzido a partir da mesma enzima comercial utilizada no presente trabalho.

Os valores do somatório da média dos erros quadráticos (*SME*) indicaram que o ajuste do modelo aos resultados experimentais foi tanto melhor quanto maior a concentração inicial de enzima, menor a concentração inicial de substrato e menor a temperatura.

No trabalho de Teoh e Don (2011), que avaliou o desempenho de quatro (4) diferentes modelos para a hidrólise enzimática de fibra de palma, os valores de *SME* variaram entre 1,19 e 9,36%. No presente trabalho, a variação de *SME* ficou entre 0,11 e 0,80%.

4. CONCLUSÃO

A conversão da lactose e síntese de galacto-oligossacarídeos foi avaliada a partir da elaboração de um novo modelo matemático, com inibição pelo incremento da glicose e da galactose.

O modelo proposto é representado por um sistema de nove (9) equações diferenciais ordinárias e quinze (15) constantes cinéticas, as quais podem assumir diferentes valores numéricos, fato que dificulta o ajuste do modelo a resultados experimentais.

Na proposta de modelo do presente trabalho observa-se que o decréscimo da variação no tempo do complexo de reação *EL* pode ser aproximado ao incremento da variação no tempo do complexo de inibição *EI*, indicando um comportamento aproximado ao da cinética clássica de Michaelis-Menten.

O modelo foi ajustado aos valores experimentais conjugando a redução da média do somatório dos erros quadráticos (*SME*) com a minimização do erro do próprio modelo, no que se refere ao somatório dos carboidratos ao final do processo.

Os resultados demonstraram que o melhor ajuste do modelo matemático a dados experimentais ocorreram nas condições de maior concentração inicial de enzima, menor concentração inicial de substrato e menor temperatura de reação.

REFERÊNCIAS

BAKALIS, E.; KOSMAS, M. PAPAMICHAEL, E.M. Perturbation theory in the catalytic rate constant of the Henry-Michaelis-Menten enzymatic reaction. **Bulletin Mathematical Biology**, v. 74, p. 2535-2546, 2012.

CHAUDHURY, S.; IGOSHIN, O.A. Dynamic disorder in quasi-equilibrium enzymatic systems. **PLoS ONE**, v. 8, p. e12364, 2010.

CHEN, C.W.; OU-YANG, C-C.; YEH, C-W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 33, p. 497-507, 2003.

DON, M.M.; SHOPARWE, N.F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 95-103, 2010.

FANGE, D.; LOVMAR, M.; PAVLOV, M.Y.; EHRENBERG, M. Identification of enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics. **Biochimie**, v. 93, p. 1623-1629, 2011.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 397-405, 2004.

KIM, C.S.; JI, E-S.; OH, D-K. A new kinetic model recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 316, p. 738-743, 2004.

LISBOA, C.R.; COSTA, F.A.A; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Síntese de galactooligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 30-40, 2012.

METELKIN, E.A.; LEBEDEVA, G.V.; GORYANIN, I.I.; DEMIN, O.V. A kinetic model of *Escherichia coli* β -galactosidase. **Biophysics**, v. 54, p. 156-162, 2009.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.P.; FERREIRA, E.M.F.C.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO JR., R.B.; TEIXEIRA, J.A. Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol. **Food Chemical**, v. 115, p. 92-99, 2009.

PALAI, T.; BHATTACHARYA, P.K. Kinetic of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized of PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 668-673, 2013.

RECHT, M.I.; TORRES, F.E.; BRUYKER, D.D.; BELL, A.G.; KLUMPP, M.; BRUCE, R.H. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 204-212, 2009.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, M.; CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; BANGA, J.R. Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 116-124, 2011.

STOLERIU I.; DAVIDSON, F.A.; LIU, J.L. Quasi-steady state assumptions for non-isolated enzyme-catalysed reactions. **Journal of Mathematics Biology**, v. 48, p. 82-104, 2004.

TEOH, Y.P.; DON, M.M. Kinetic model for the hydrolysis of sterilized palm press fiber. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 3523-3530, 2011.

TZAFRIRI, A.R.; EDELMAN, E.R. Quasi-steady state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. **Journal of Theoretical Biology**, v. 245, p. 737-748, 2007.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

A conversão da lactose e a síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) foram estudadas a partir de abordagens experimental e teórica, visando ampliar a avaliação sobre bioprocessos simultâneos defasados (BSD), técnica de condução de processo para fabricação de fermentados lácticos elaborada em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, e construir e avaliar um novo modelo matemático visando representar a cinética da reação enzimática da conversão da lactose a partir da enzima β -galactosidase.

O presente trabalho indicou ser possível obter fermentados lácticos com redução de lactose e com concentrações de interesse para GOS, utilizando a técnica do bioprocessos simultâneo defasado no desenvolvimento de fermentados lácticos com reduzido teor de lactose e que possam ser rotulados como fonte de fibras, abrindo perspectivas para futura avaliação da viabilidade do uso do BSD em escala produtiva.

No que se refere a modelos matemáticos para descrever a cinética de reação enzimática, o presente trabalho apresentou uma nova proposta de representação do efeito de inibição em catálises conduzidas por hidrolases, indicando que a inibição ocorre por efeito do incremento da concentração de produtos da própria reação.

Foi desenvolvido um modelo matemático para hidrólise de dissacarídeos a partir da cinética clássica de Michaelis-Menten, com inibição pelo incremento dos produtos da reação, indicando que a etapa de inibição associa efeito do tipo competitivo com efeito do tipo incompetitivo.

No que se refere especificamente à conversão da lactose e síntese de GOS pela enzima β -galactosidase, foi desenvolvido um modelo matemático que representou o efeito de inibição a partir do incremento das concentrações de glicose e de galactose, comparando seu desempenho com os modelos disponíveis na literatura, a partir de processo genérico. O referido modelo apresentou a proposta de efeito de inibição do tipo incompetitivo para a glicose e do tipo competitivo tanto para a glicose quanto para a galactose.

O novo modelo de conversão da lactose e síntese de GOS foi comparado a resultados experimentais, indicando que este modelo pode ser utilizado como ferramenta de apoio aos pesquisadores experimentais.

REFERÊNCIAS E APÊNDICES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-REESH, I.M. Optimal design for CSTR's in series performing enzymatic lactose hydrolysis. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 709-713, 2000.

BAKALIS, E.; KOSMAS, M. PAPAMICHAEL, E.M. Perturbation theory in the catalytic rate constant of the Henry-Michaelis-Menten enzymatic reaction. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 74, p. 2535-2546, 2012.

BENGMARK, S.; ORTIZ DE URBINA, J.J. Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, p. 147-156, 2005.

BOTTS, J.; MORALES, M. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate. **Transactions of the Faraday Society**, v. 49, p. 696-707, 1953.

CHAUDHURY, S.; IGOSHIN, O.A. Dynamic disorder in quasi-equilibrium enzymatic systems. **PLoS ONE**, v. 8, p. e12364, 2010.

CHEN, C.W.; OU-YANG, C-C.; YEH, C-W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 33, p. 497-507, 2003.

COPELAND, R.A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. New York (USA): WILEY-VCH, 2000. 412p.

CUNHA, L.R.; SOARES, N.F.F.; ASSIS, F.C.C.; MELO, N.R.; PEREIRA, A.F.; SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 23-26, 2007.

DON, M.M.; SHOPARWE, N.F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 95-103, 2010.

FANGE, D.; LOVMAR, M.; PAVLOV, M.Y.; EHRENBERG, M. Identification of enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics. **Biochimie**, v. 93, p. 1623-1629, 2011.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Probiotics and modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G.R. Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 648-656, 2007.

GU, Q-M. Enzyme-mediated reactions of oligosaccharides and polysaccharides. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 7, p. 1-9, 1999.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (IUB). Symbolism and terminology in enzyme kinetics. Recommendations 1981. **European Journal of Biochemistry**, v. 128, p. 281-291, 1982.

JIA, C.; LIU, X-F.; QIAN, M-P.; JIANG, D-Q.; ZHANG, Y-P. Kinetic behavior of the general modifier mechanism of Botts and Morales with non-equilibrium binding. **Journal of Theoretical Biology**, v. 296, p. 13-20, 2012.

JOHNSON, K.A.; GOODY, R.S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, p. 8264-8269, 2011.

JOHNSON, K.A. Review: A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2753-2766, 2013.

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

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fiber bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 397-405, 2004.

KIM, C.S.; JI, E-S.; OH, D-K. A new kinetic model recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 316, p. 738-743, 2004.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1341-1346, 2006.

LISBOA, C.R.; COSTA, F.A.A; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 30-40, 2012.

MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p. 147-154, 1998.

MARTÍNEZ-FEREZ, A.; RUDLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C.A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J.J.; GUADIX, E.M.; KUNZ, C. Goat's milk as natural source lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 173-181, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; OLANO, A.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M.; JIMENO, M.L. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 557-563, 2008.

MANERA, A.P.; ZABOT, G.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; KALIL, S.J.; TREICHEL, H.; MAUGERI FILHO, F. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurized fluid as reaction medium. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1408-1413, 2012.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 540-544, 2008.

MARTINS, A.R.; BURKERT, C.A.V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 230-240, 2009.

MARTINS, A.R.; MANERA, A.P. ; MONTEIRO, R.L. ; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Lactose conversion and the synthesis of galactooligosaccharides in a simultaneous lagged bioprocess using β -galactosidases and probiotics microorganisms. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 130-136, 2011.

MARTINS, A.R.; MONTEIRO, R.L.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 551-559, 2012.

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1334-1340, 2006.

METELKIN, E.A.; LEBEDEVA, G.V.; GORYANIN, I.I.; DEMIN, O.V. A kinetic model of *Escherichia coli* β -galactosidase. **Biophysics**, v. 54, p. 156-162, 2009.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-597, 2007.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.P.; FERREIRA, E.M.F.C.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO JR., R.B.; TEIXEIRA, J.A. Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol. **Food Chemical**, v. 115, p. 92-99, 2009.

PALAI, T.; BHATTACHARYA, P.K. Kinetic of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p. 668-673, 2013.

PASSOS, L.M.; PARK, Y.K. Frutooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e uso em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 385-390, 2003.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S.A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, v. 5, p. 24-30, 2004.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ SISO, M.I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Acta Crystallographica**, v. F66, p. 297-300, 2010.

PESSELA, B. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sepabeads supports decreases product inhibition complet hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 199-205, 2003.

RECHT, M.I.; TORRES, F.E.; BRUYKER, D.D.; BELL, A.G.; KLUMPP, M.; BRUCE, R.H. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 204-212, 2009.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p. S43-S52, 2001.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.R.; DELZENNE, N.M. Dietary Fructans. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, p. 117-143, 1998.

RODRIGUEZ, V.A.; CRAVERO, B.F.; ARMONÍA, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciencia e Tecnología de Alimentos**, v. 28, p. 109-115, 2008.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, M.; CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; BANGA, J.R. Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 116-124, 2011.

RUPÉREZ, P. Bifidogenic oligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 237-243, 1998.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 69-80, 1999.

SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 458-465, 2008.

SCHENKER, P.; BAICI, A. Simultaneous interaction of enzymes with two modifiers: reappraisal of kinetic models and new paradigms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 261, p. 318-329, 2009.

SEBORG, D.E. **Process dynamics and control**. New York (USA): John Wiley and Sons, 1989. 485p.

STOLERIU I.; DAVIDSON, F.A.; LIU, J.L. Quasi-steady state assumptions for non-isolated enzyme-catalysed reactions. **Journal of Mathematics Biology**, v. 48, p. 82-104, 2004.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 197-219, 2003.

TEOH, Y.P.; DON, M.M. Kinetic model for the hydrolysis of sterilized palm press fiber. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 3523-3530, 2011.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Quantitative changes in oligosaccharides during fermentation and storage of yogurt inoculated simultaneously with starter culture and β -galactosidase preparation. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1241-1245, 1986.

TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 90-109, 2002.

TZAFRIRI, A.R.; EDELMAN, E.R. Quasi-steady state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. **Journal of Theoretical Biology**, v. 245, p. 737-748, 2007.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Kinetic modeling of reaction in foods**. New York (USA): CRC Press, 2009. 788p.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* and probiotic strain of lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 154-159, 2007.

APÊNDICE 1

Rotina para solução de sistemas não lineares de EDOs no Matlab[®] (usando a função ODE45), aplicado ao exemplo da cinética clássica de Michaelis-Menten.

```
%-----
% Rotina para gerar a função vetorial F(y) necessária para
% resolver o sistema da cinética clássica de
% Michaelis-Menten (arquivo.m)
%-----

function michaelismenten
options=odeset('Abstol',1e-6,'Reltol',1e-6);
t0 =0;
tf =20;
S0 =100;
E0 =10;
[t y]=ode45(@fdo,[t0 tf],[E0 0 S0 0 E0 S0],options);

subplot(2,1,1)
plot(t,y(:,1),'blue',t,y(:,2),'green',t,y(:,5),'-cyan');
title('Michaelis-Menten (enzima e complexo)');
ylabel('concentração (Y)');
xlabel('tempo (t)');
lgnd1 = 'E';
lgnd2 = 'ES';
legend(lgnd1,lgnd2);
axis([0 tf 0 E0+3.9]);
subplot(2,1,2)
plot(t,y(:,3),'green',t,y(:,4),'red',t,y(:,6),'-cyan');
title('Michaelis-Menten (substrato e produto)');
ylabel('concentração (X)');
xlabel('tempo (t)');
lgnd1 = 'Substrato';
lgnd2 = 'Produto';
legend(lgnd1,lgnd2);
axis([0 tf 0 S0+39]);

function dy= fdo(t,y)
dy = zeros(4,1);
k1=1.;
k11=1.;
k2=1.;

dy(1) = k11*y(2)-k1*y(1)*y(3)+k2*y(2); %Ok
dy(2) = k1*y(1)*y(3)-k11*y(2)-k2*y(2); %Ok
dy(3) = k11*y(2)-k1*y(1)*y(3); %Ok
dy(4) = k2*y(2); %Ok
dy(5) = dy(1)+dy(2); %Ok
dy(6) = dy(3)+dy(4); %Ok
```

APÊNDICE 2

Rotina para solução de sistemas não lineares de EDOs no Matlab[®], via Runge-Kutta de ordem 4 e passo de 1.10^{-3} , aplicado ao modelo desenvolvido no presente trabalho (arquivo.m).

Fez-se: $x_1 = E$; $x_2 = EGa$; $x_3 = EL$; $x_4 = EI$; $x_5 = L$; $x_6 = Ga$; $x_7 = Gu$; $x_8 = DI$; $x_9 = TRI$.

Para a expressão das constantes cinéticas, fez-se: $k_{-1} = k_{11}$; $k_{-3} = k_{31}$ (e assim sucessivamente); $k_i = k_7$; $k_{ii} = k_8$.

```
function [t,x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9]=Tese
x100 = 10.;
x200 = 0.;
x300 = 0.;
x400 = 0.;
x500 = 100.;
x600 = 0.;
x700 = 0.;
x800 = 0.;
x900 = 0.;

t0 = 0.;
tf = 20.;
h = 0.001;

k1 =1.;
k11 =1.;
k2 =1.;
k3 =1.;
k31 =1.;
k4 =1.;
k41 =1.;
k5 =1.;
k51 =1.;
k6 =1.;
k61 =1.;
k7 =1.;
k71 =1.;
k8 =1.;
k81 =1.;

n = (tf-t0)/h;
```

```

%-----
% Definindo vetores
%-----

t=zeros(1,n+1);
x1=zeros(1,n+1);
x2=zeros(1,n+1);
x3=zeros(1,n+1);
x4=zeros(1,n+1);
x5=zeros(1,n+1);
x6=zeros(1,n+1);
x7=zeros(1,n+1);
x8=zeros(1,n+1);
x9=zeros(1,n+1);

%-----
% Definindo condições iniciais
%-----

t(1)=t0;
x1(1)=x100;
x2(1)=x200;
x3(1)=x300;
x4(1)=x400;
x5(1)=x500;
x6(1)=x600;
x7(1)=x700;
x8(1)=x800;
x9(1)=x900;

%-----
% As funções auxiliares
%-----

% Enzima e Complexos Enzimáticos -----
f1 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k11*x3-k1*x1*x5+k3*x2-k31*x1*x6+k4*x2*x6-k41*x1*x8+k5*x2*x8-k51*x1*x9+k6*x2*x5-k61*x1*x9+k81*x4-k8*x1*x6*x7;
f2 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k2*x3+k31*x1*x6-k3*x2+k41*x1*x8-k4*x2*x6+k51*x1*x9-k5*x2*x8+k61*x1*x9-k6*x2*x5+k71*x4-k7*x2*x7;
f3 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k1*x1*x5-k11*x3-k2*x3;
f4 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k7*x2*x7-k71*x4+k8*x1*x6*x7-k81*x4;

% Substrato e Produtos -----
f5 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k11*x3-k1*x1*x5+k61*x1*x9-k6*x2*x5;
f6 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k3*x2-k31*x1*x6+k41*x1*x8-k4*x2*x6+0.5*k81*x4-0.5*k8*x1*x6*x7;

```

```
f7 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k2*x3+k71*x4-k7*x2*x7+0.5*k81*x4-0.5*k8*x1*x6*x7;
f8 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k4*x2*x6-k41*x1*x8+k51*x1*x9-k5*x2*x8;
f9 =@(x1,x2,x3,x4,x5,x6,x7,x8,x9) k5*x2*x8-k51*x1*x9+k6*x2*x5-k61*x1*x9;
```

```
for j=1:n
```

```
%-----
%           Primeira Aproximação j + 1
%-----
```

```
x1k1=f1(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x2k1=f2(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x3k1=f3(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x4k1=f4(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x5k1=f5(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x6k1=f6(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x7k1=f7(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x8k1=f8(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
x9k1=f9(x1(j), x2(j), x3(j),x4(j), x5(j), x6(j), x7(j), x8(j), x9(j));
```

```
%-----
%           Primeira Aproximação j + 1
%-----
```

```
%-----
%           Segunda Aproximação j + 1
%-----
```

```
x1k2=f1(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x2k2=f2(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x3k2=f3(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x4k2=f4(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x5k2=f5(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x6k2=f6(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x7k2=f7(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x8k2=f8(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
x9k2=f9(x1(j)+0.5*h*x1k1, x2(j)+0.5*h*x2k1, x3(j)+0.5*h*x3k1, x4(j)+0.5*h*x4k1, x5(j)+0.5*h*x5k1, x6(j)+0.5*h*x6k1, x7(j)+0.5*h*x7k1, x8(j)+0.5*h*x8k1, x9(j)+0.5*h*x9k1);
```

```
%-----
%           Segunda Aproximação j + 1
%-----
```

```
%-----
%           Terceira Aproximação j + 1
%-----
```

```
x1k3=f1(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x2k3=f2(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x3k3=f3(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x4k3=f4(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x5k3=f5(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
```

```
x6k3=f6(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x7k3=f7(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x8k3=f8(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
x9k3=f9(x1(j)+0.5*h*x1k2, x2(j)+0.5*h*x2k2, x3(j)+0.5*h*x3k2, x4(j)+0.5*h*x4k2, x5(j)+0.5*h*x5k2, x6(j)+0.5*h*x6k2, x7(j)+0.5*h*x7k2, x8(j)+0.5*h*x8k2, x9(j)+0.5*h*x9k2);
```

```
%-----
% Terceira Aproximação j + 1
%-----
```

```
%-----
% Quarta Aproximação j + 1
%-----
```

```
x1k4=f1(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x2k4=f2(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x3k4=f3(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x4k4=f4(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x5k4=f5(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x6k4=f6(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x7k4=f7(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x8k4=f8(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
x9k4=f9(x1(j)+h*x1k3, x2(j)+h*x2k3, x3(j)+h*x3k3, x4(j)+h*x4k3, x5(j)+h*x5k3, x6(j)+h*x6k3, x7(j)+h*x7k3, x8(j)+h*x8k3, x9(j)+h*x9k3);
```

```
%-----
% Quarta Aproximação j + 1
%-----
```

```
%-----
% Aproximação Final j + 1
%-----
```

```
x1(j+1)=x1(j)+(h/6)*(x1k1+2*x1k2+2*x1k3+x1k4);
x2(j+1)=x2(j)+(h/6)*(x2k1+2*x2k2+2*x2k3+x2k4);
x3(j+1)=x3(j)+(h/6)*(x3k1+2*x3k2+2*x3k3+x3k4);
x4(j+1)=x4(j)+(h/6)*(x4k1+2*x4k2+2*x4k3+x4k4);
x5(j+1)=x5(j)+(h/6)*(x5k1+2*x5k2+2*x5k3+x5k4);
x6(j+1)=x6(j)+(h/6)*(x6k1+2*x6k2+2*x6k3+x6k4);
x7(j+1)=x7(j)+(h/6)*(x7k1+2*x7k2+2*x7k3+x7k4);
x8(j+1)=x8(j)+(h/6)*(x8k1+2*x8k2+2*x8k3+x8k4);
x9(j+1)=x9(j)+(h/6)*(x9k1+2*x9k2+2*x9k3+x9k4);
t(j+1)=t(j)+h;
```

```
%-----
% Aproximação Final j + 1
%-----
```

end

```
%-----
% Gráfico - Substrato e Produtos
%-----
```

```
plot(t,x5,'-blue',t,x6,'-black',t,x7,'-green',t,x8+x9,'-red',t,x5+x6+x7+x8+x9,'-cyan');
title('Modelo para Conversão da Lactose com inibição pela glicose e galactose');
ylabel('concentração (X)');
xlabel('tempo (t)');
```

```
axis([0 tf 0 x500+5]);
```

```
hold on
```

```
L0 = x500;
C = x5+x6+x7+x8+x9;
Cf = C(n);
erro = ((L0 - Cf)/L0)*100;
str = sprintf('=%6.4f', erro);
```

```
lgnd1 = 'Lactose';
lgnd2 = 'Galactose';
lgnd3 = 'Glicose';
lgnd4 = 'GOS';
lgnd5 = ['Erro do modelo (%) ' str];
legend(lgnd1,lgnd2,lgnd3,lgnd4,lgnd5,1);
```

```
%-----
%          FIM
%-----
```

APÊNDICE 3

Apresenta a sub-rotina para solução de sistemas não lineares de EDOs no Matlab[®] com ênfase no cálculo de SME, aplicado à rotina do Apêndice 2. Insere-se, no segmento “Gráfico – Substrato e Produtos”, da rotina do Apêndice 2, a seguinte sequência:

```
hold on
```

```
L0 = x500;
C = x5+x6+x7+x8+x9;
Cf = C(n+1);
erro = ((L0 - Cf)/L0)*100;
str1 = sprintf('= %6.4f', erro);
```

```
L = x5;
sse1 = (L_exp(1)-L(1))^2 + (L_exp(2)-L((60/h)+1))^2 + (L_exp(3)-L((120/h)+1))^2 + (L_exp(4)-L((180/h)+1))^2 + (L_exp(5)-L((240/h)+1))^2 + (L_exp(6)-L((360/h)+1))^2 + (L_exp(7)-L((480/h)+1))^2 + (L_exp(8)-L((600/h)+1))^2 + (L_exp(9)-L((720/h)+1))^2 + (L_exp(10)-L((840/h)+1))^2 + (L_exp(11)-L((960/h)+1))^2 + (L_exp(12)-L((1080/h)+1))^2;
```

```
G = x8+x9;
sse2 = (G_exp(1)-G(1))^2 + (G_exp(2)-G((60/h)+1))^2 + (G_exp(3)-G((120/h)+1))^2 + (G_exp(4)-G((180/h)+1))^2 + (G_exp(5)-G((240/h)+1))^2 + (G_exp(6)-G((360/h)+1))^2 + (G_exp(7)-G((480/h)+1))^2 + (G_exp(8)-G((600/h)+1))^2 + (G_exp(9)-G((720/h)+1))^2 + (G_exp(10)-G((840/h)+1))^2 + (G_exp(11)-G((960/h)+1))^2 + (G_exp(12)-G((1080/h)+1))^2;
```

```
Gu = x7;
sse3 = (Gu_exp(1)-Gu(1))^2 + (Gu_exp(2)-Gu((60/h)+1))^2 + (Gu_exp(3)-Gu((120/h)+1))^2 + (Gu_exp(4)-Gu((180/h)+1))^2 + (Gu_exp(5)-Gu((240/h)+1))^2 + (Gu_exp(6)-Gu((360/h)+1))^2 + (Gu_exp(7)-Gu((480/h)+1))^2 + (Gu_exp(8)-Gu((600/h)+1))^2 + (Gu_exp(9)-Gu((720/h)+1))^2 + (Gu_exp(10)-Gu((840/h)+1))^2 + (Gu_exp(11)-Gu((960/h)+1))^2 + (Gu_exp(12)-Gu((1080/h)+1))^2;
```

```
Ga = x6;
sse4 = (Ga_exp(1)-Ga(1))^2 + (Ga_exp(2)-Ga((60/h)+1))^2 + (Ga_exp(3)-Ga((120/h)+1))^2 + (Ga_exp(4)-Ga((180/h)+1))^2 + (Ga_exp(5)-Ga((240/h)+1))^2 + (Ga_exp(6)-Ga((360/h)+1))^2 + (Ga_exp(7)-Ga((480/h)+1))^2 + (Ga_exp(8)-Ga((600/h)+1))^2 + (Ga_exp(9)-Ga((720/h)+1))^2 + (Ga_exp(10)-Ga((840/h)+1))^2 + (Ga_exp(11)-Ga((960/h)+1))^2 + (Ga_exp(12)-Ga((1080/h)+1))^2;
```

```
sme = ((sse1+sse2+sse3+sse4)/(n+1))*100;
str2 = sprintf('= %6.4f', sme);
```

```
lgnd1 = 'Lactose';
lgnd2 = 'Galactose';
lgnd3 = 'Glicose';
lgnd4 = 'GOS';
lgnd5 = ['E_f (%)': str1];
lgnd6 = ['SME (%)': str2];
```

```
legend(lgnd1,lgnd2,lgnd3,lgnd4,lgnd5,lgnd6,1);
```

```
%-----  
%      FIM  
%-----
```

O exemplo dessa sub-rotina foi aplicado aos sistemas em que o tempo de processo atingiu 1.080 minutos. Para intervalos de processo diferentes, faz-se necessário ajustar as expressões do somatório dos erros quadráticos (SSE), tanto para o substrato quanto para cada um dos produtos de reação.

“All models are wrong but some are useful”.

George Box