

VALIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS COEFICIENTES CINÉTICOS DO MODELO MATEMÁTICO MECANÍSTICO PROPOSTO PARA PREDIZER A CINÉTICA DE HIDRÓLISE DE LACTOSE POR β -GALACTOSIDASE DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Validity and sensitivity analysis of the kinetic coefficients of a mechanistical mathematical model proposed to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in permeabilized cell mass of *kluveromyces lactis*

Edimar A. F. Fontes¹
Flávia M. L. Passos²
Frederico J. V. Passos³
Paulo Rogério Fontes¹

RESUMO

Um modelo matemático mecanístico foi desenvolvido para descrever a hidrólise de lactose, levando em consideração o efeito de inibição por galactose. Foi utilizado um sistema dinâmico de equações diferenciais ordinárias da variação de lactose, glicose e galactose com o tempo. Essas equações foram resolvidas no programa Fortran 90 que gerou uma tabela de dados simulados de lactose, glicose e galactose ao longo do tempo. A análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo foi realizada variando em $\pm 20\%$ os valores dos coeficientes cinéticos. As concentrações de glicose e galactose não foram influenciadas pelas variações nos coeficientes K_m e K_i , sendo que um aumento no valor de V_{max} em 20% observou-se um melhor ajuste do modelo com os dados experimentais. Para a validação do modelo, foram realizados testes de hidrólise em solução tampão fosfato contendo 5% de lactose e em leite desnatado com teor de lactose de 4,8%. O modelo representou satisfatoriamente o processo de hidrólise em solução tampão fosfato com 5% de lactose. Para esta solução a variação entre o valor medido e o predito de glicose foi de 4%, quando 75% de hidrólise foi atingida, alterando o valor de V_{max} em 30%. No caso da hidrólise da lactose do leite, verificou-se uma variação entre as concentrações de glicose medida e predita de 13% quando 85% da hidrólise foi atingida. Os dados simulados pelo modelo apresentaram boa correlação com os dados experimentais originados da hidrólise de lactose em tampão fosfato contendo 5% de lactose e em leite desnatado.

1 INTRODUÇÃO

Estudos cinéticos em processos enzimáticos têm sido amplamente considerados no projeto de reatores e controle de processos fornecendo informações sobre mecanismos básicos de reação e outros fatores que caracterizam as propriedades o sistema (FONTES, 2001). A utilização de programas computacionais tem uma grande aplicação em princípios cinéticos na determinação dos valores mais prováveis e da precisão dos coeficientes cinéticos (FONTES, 1998). A definição de um modelo matemático mecanístico que descreva a

cinética de hidrólise de lactose é de grande importância no planejamento de um bioreator adequado. Um modelo matemático de um processo particular consiste de uma ou de um conjunto de equações que descrevem o processo. Os modelos matemáticos podem ser classificados como empíricos ou mecanísticos. Modelos empíricos descrevem meramente o comportamento do sistema com base nos dados experimentais, não refletindo o completo entendimento do sistema. Assim, um modelo empírico possui apenas uma função descritiva. Tal

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

modelo vem sendo usado em alimentos para prever a vida de prateleira dos produtos, detectar pontos críticos na produção e distribuição (ZWIETERING et al., 1990). Quando o objetivo do modelo é o entendimento global do sistema, é necessário a utilização de um modelo mecanístico (BAILEY e OLLIS, 1986 e PARULEKAR, 1985). Exemplos de modelos mecanísticos podemos citar a equação de Michaelis-Menten e suas derivadas utilizadas para descrever a cinética de enzima; a equação de Arrhenius e outras mais. Segundo REKLAITIS, (1983) uma vez definida a equação, o seu ótimo ainda não está completo. De fato, a equação vai servir como uma base nos estudos de validação e análise de sensibilidades para as mudanças ocorridas nos parâmetros da equação. Para a equação ser válida, ela terá que representar o ótimo e satisfatoriamente as condições reais do sistema para determinadas condições. A próxima fase de avaliação do sistema é determinar a sensibilidade da solução para as mudanças ocorridas nos parâmetros do modelo. Isso é chamado de análise de sensibilidade. Há várias razões para executar uma análise de sensibilidade: 1) Achar um ou mais parâmetros com correlação a qual o ótimo da solução é muito sensível; 2) Extrair informações sobre adição ou modificações no sistema para melhorar a operação como um todo; 3) Esclarecer o efeito no sistema das variações na precisão dos parâmetros conhecidos; 4) Sugerir os efeitos prováveis de variação nos extremos dos parâmetros que são incontroláveis. Pelo fato deste tipo de informação ser tão importante na implantação de uma solução num sistema real, uma análise de sensibilidade detalhada é, em muitos casos, mais valiosa que a própria solução ótima atual. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo sobre as variações nos coeficientes cinéticos do modelo matemático proposto para a hidrólise de lactose, assumindo galactose como inibidor e verificar a aplicação do modelo em um meio sintético com 5% de lactose e em leite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 Nomenclatura

Os seguintes termos foram usados:
 [S] = concentração de lactose em milimolar;
 [I] = concentração do inibidor (galactose) em milimolar;
 V = velocidade de reação em milimolar/minuto;

Os seguintes coeficientes foram usados:

V_{max} = velocidade máxima de reação em milimolar/minuto;
 K_m = constante de Michaelis-Menten em milimolar;
 K_i = constante de inibição em milimolar;
 K' = taxa de desvio de galactose para reação de transferase em mM/min;

2.2 Estimativa da constante K

Para estimar a constante K foram utilizados os dados de concentrações de glicose e galactose, produzidos na hidrólise de 100 mM de lactose, durante 3h de reação, em temperatura ambiente, contendo 1mg/mL de massa de célula permeabilizada de *Kluyveromyces lactis* contendo a enzima β -galactosidase. Foram retiradas 500 μ l de amostra a cada intervalo de 15 min até 3 horas de reação. A reação foi paralisada com adição de 500 μ l de TCA 4,5%. Foi assumido uma reação equimolar de um milimolar de lactose para cada milimolar de glicose e galactose produzida. Os conteúdos de glicose foram determinados por HPLC, conforme descrito no item 2.4. A constante K foi estimada a partir da inclinação da reta do gráfico de galactose utilizada na reação de transferase em mM em função do tempo de reação.

2.3 Solução numérica e análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo

O sistema dinâmico de equações diferenciais ordinárias foi resolvido por meio do método Runge-Kutta Fehlberg 45º ordem, escrito por Hien T. Tran, com variação no tamanho do passo (PASSOS et al., 1994) utilizando um computador pentium 100 e linguagem Fortran 90 trabalhando em ambiente Windows. As equações diferenciais ordinárias foram:

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

$$\frac{d \text{Glicose}}{dt} = \frac{d \text{Lactose}}{dt}$$

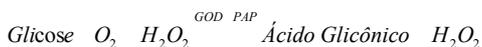
$$\frac{d \text{Galactose}}{dt} = \frac{d \text{Lactose}}{dt} - K' I$$

Uma subrotina foi desenvolvida, usando-se como variáveis de entrada os valores iniciais de lactose, glicose, galactose, constante K e tempo de reação, com a geração de tabelas com as variações ao longo do tempo de lactose, glicose e galactose. Para ilustrar o efeito das variações nos coeficientes cinéticos do modelo, foram realizadas simulações, alterando em $\pm 20\%$ os valores estimados por FONTES (1998) dos coeficientes do modelo V_{max} , K_m e K_i que corresponderam a $0,291 \pm 0,01$ mM/min;

2,536 ± 0,412 mM e 10,88 ± 8,86 mM no intervalo de confiança de 95%, respectivamente.

2.4. Verificação da Validade do Modelo

Para avaliar a validade do modelo foram realizados testes de hidrólise em solução 5% lactose (lactose foi diluída no tampão fosfato) e em leite desnatado contendo 4,8g/L de lactose. Foi utilizado como reator 2 erlenmeyers de 125 ml contendo cada um 50ml de leite e 50 ml de solução de lactose 5% . Foi adicionado 50 mg de massa de células permeabilizadas em cada erlenmyer para obter no final uma concentração 1mg/ml. Foram retirados 500µl de amostra do reator em intervalos de tempo de 15 minutos, no total de 450 minutos (7,5 horas) e a reação foi paralisada com 500µl TCA (ácido tricloroacético) 4,5%. As amostras foram congeladas para que posteriormente fossem analisadas. Após serem descongeladas, foram centrifugadas em uma microcentrifuga a 9000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e diluído em água ultrapura. Os conteúdos de glicose foram determinados em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho no equipamento HP 1050M (Hewlett Packard) utilizando coluna HPX 87 H(Bio Rad) e detector de índice de refração. Os carboidratos foram eluídos da coluna com H₂SO₄ 0,005M num fluxo de 0,7 ml/min e temperatura de 60 °C. Também os conteúdos de glicose foram determinados por espectrofotometria utilizando sendo que ao volume da mistura de reação (500 µl) foi adicionado 2ml de reagente GOD-PAP® para análise espectrofotométrica de glicose produzida durante reação. Na análise espectrofotométrica o GOD (Glicose Oxidase) oxida a glicose, que foi liberada da hidrólise da lactose, para ácido glicônico resultando num produto de cor violeta com a intensidade de cor proporcional à concentração de glicose no meio. O princípio da reação é:



As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro (Beckman DU® 640), comprimento de onda de 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. No início da curva, temos a adaptação das enzimas envolvidas no sistema de reação (GOD-PAP e β-galactosidase) que logo em seguida atinge o steady-state, ou seja, velocidade constante de reação. A inclinação da reta apresentada para cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada combinação de célula permeabilizada e de lactose. A conversão de absorvância em unidades de mM de glicose, foi feita a partir de uma curva padrão. Os dados estimados pelo modelo foram comparados com os dados experimentais da hidrólise de lactose em leite desnatado e solução de 5% de lactose.

3 RESULTADOS E DICUSSÃO

3.1 Estimativa da constante K.

Durante as análises em HPLC, foi assumido uma reação equimolar de um milimolar de lactose para cada milimolar de glicose e galactose produzida, mas foi observado que a reação de hidrólise de lactose não gerava concentrações iguais de glicose e de galactose como era previsto. Uma possível justificativa é o envolvimento da galactose em reações de transferases para formar oligossacarídeos que pode ser observado na Figura 1 indicado pela seta. Outra justificativa que pode fortalecer essa sugestão é que durante as análises em HPLC, foi observado uma relação do pico formado com a concentração de galactose, ou seja, à medida que o pico aumentava, a concentração de galactose foi menor que o valor esperado (Figura 1).

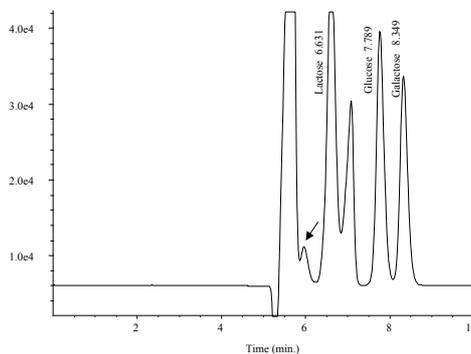


Figura 1 – Cromatograma da hidrólise de lactose em glicose e galactose no tempo de 3 horas de reação.

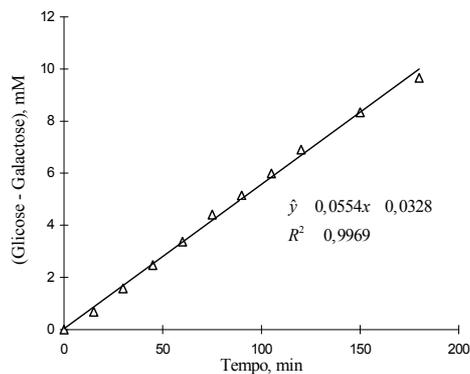


Figura 2 - Determinação da taxa de utilização (K) de galactose utilizada em reação de transferase durante o estudo da hidrólise de lactose.

A Figura 2 ilustra o cálculo do valor de K que foi utilizado para corrigir os valores estimados da concentração de galactose que possivelmente foi desviada para reação de transferase. Pela regressão linear dos dados, estimou-se um valor de K correspondente a 0,0554mM/min.

3. 2 Solução numérica e análise de sensibilidade dos coeficientes do modelo.

As Figuras 3, 4 e 5 mostram a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose. A quantidade de lactose hidrolisada foi calculada a partir da glicose formada. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha o modelo proposto. Variações em 20% nos valores K_m e K_i não

afetaram a hidrólise de lactose. Enquanto que para o valor de $V_{máx}$ estimado foi aumentado em 20%, o modelo se adequou melhor aos dados experimentais para as concentrações iniciais de 30 e 10 mM de glicose e galactose respectivamente.

3. 3 Verificação da Validade do Modelo

As Figuras 6 e 7, mostram a hidrólise de lactose numa solução contendo 5% de lactose e em leite respectivamente. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas o modelo proposto para hidrólise de lactose em função da formação de glicose no meio. O modelo representou satisfatoriamente o processo de hidrólise em solução 5% de lactose com o aumento no valor de $V_{máx}$. de 30%. Para essa

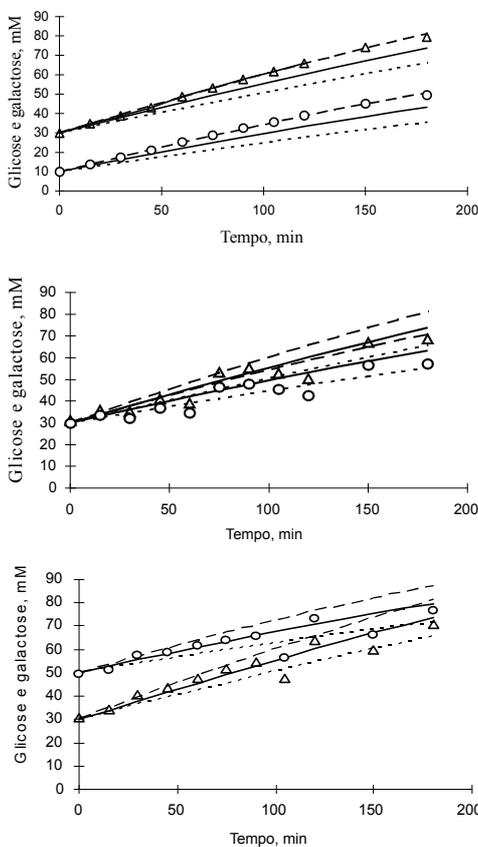


Figura 3 - Efeito das variações em $V_{máx}$. sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (...) $V_{máx}$ -20% e (- - -) $V_{máx}$ +20%. Os símbolos representam os dados experimentais (o) galactose e (Δ) glicose

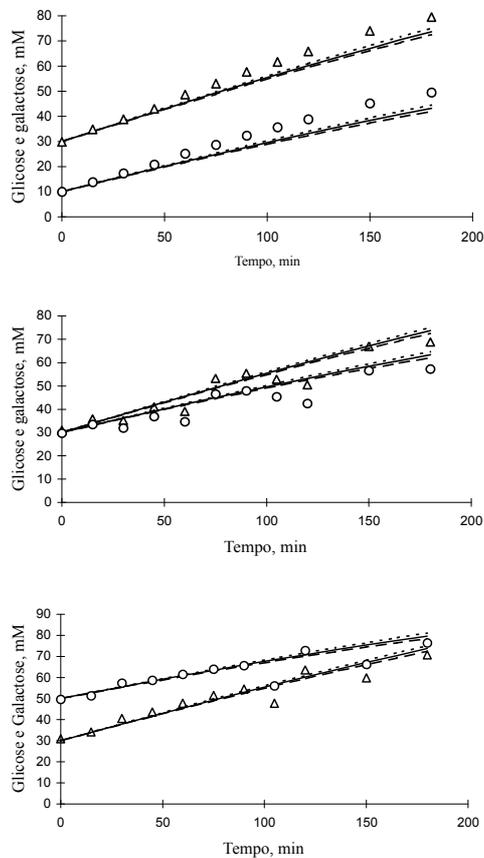


Figura 4 - Efeito das variações em K_m sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (...) K_m -20% e (- - -) K_m +20%. Os símbolos representam os dados experimentais para (o) galactose e (Δ) glicose.

solução a variação entre o valor medido e o valor predito de glicose foi de 4 %, quando aproximadamente 75% da hidrólise de lactose foi atingida. Observa-se na Figura 7, que a taxa de hidrólise de lactose em leite foi ligeiramente maior que a taxa de hidrólise proposto pelo modelo. Para hidrólise no leite, verificou-se uma variação entre as concentrações de glicose medida e predita de 13% quando aproximadamente 85% da hidrólise foi atingida. Resultados de MAHONEY e ADAMCHUCK (1980), indicaram que a atividade de lactase (β -galactosidase) de leveduras possuem maior atividade em leite desnatado que em solução tampão. Os autores sugerem que os componentes do leite, principalmente as proteínas do soro e caseína, foram ativadores dessa enzima em *Kluyveromyces fragilis*.

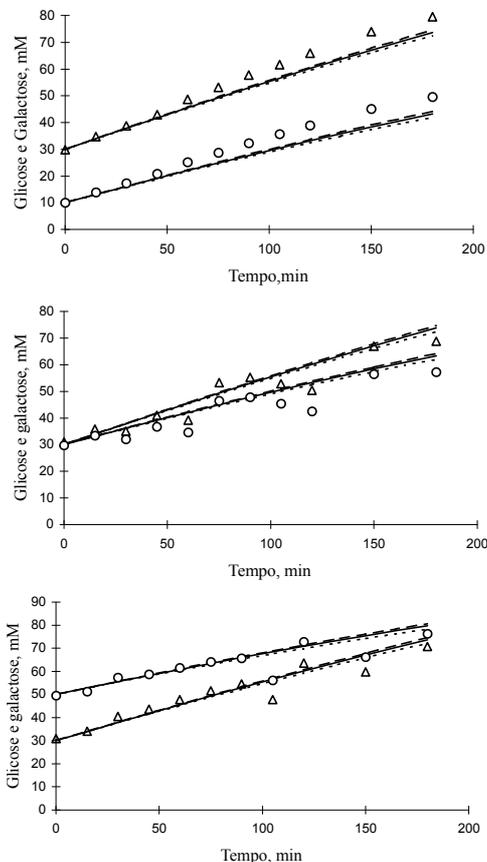


Figura 5 - Efeito das variações em K_i sobre a hidrólise de lactose na presença de glicose e galactose (....) K_i -20% e (---) K_i +20%. Os símbolos representam (o) galactose e (Δ) glicose.

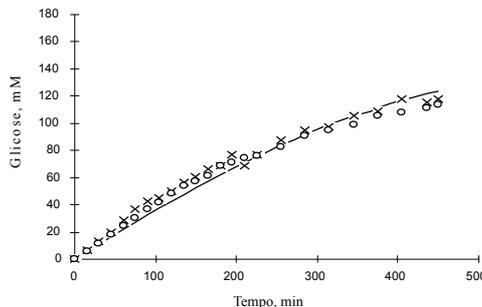


Figura 6 - Hidrólise de lactose em solução de 5% de lactose. Os símbolos (o) representam as concentrações de glicose obtida em HPLC e (x) em espectrofotômetro. A linha representa os valores estimados pelo modelo com $V_{m\acute{a}x} + 30\%$.

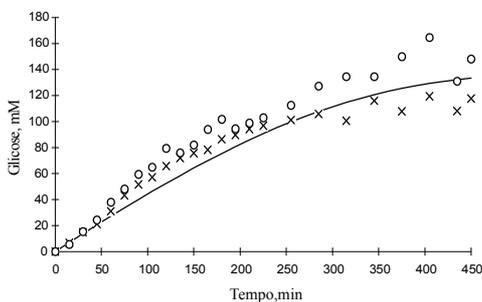


Figura 7 - Hidrólise de lactose em leite. Os símbolos (o) representam as concentrações de glicose obtida em HPLC e (x) em espectrofotômetro. A linha representa os valores estimados pelo modelo com $V_{m\acute{a}x} + 62,5\%$.

4 CONCLUSÕES

Novas linhas de trabalho podem ser conduzidas a partir dos resultados aqui obtidos. A construção de um bioreator enzimático para produção contínua de leite e/ou soro hidrolisado utilizando para isso um sistema de enzima imobilizada deve-se levar em conta parâmetros cinéticos obtidos com a enzima solúvel.

ABSTRACT

The mechanistical mathematical model was developed to describe the lactose hydrolysis, taking into consideration the inhibition effect for galactose. It was used a dynamic system of ordinary differential equations of the lactose

variation, glucose and galactose with the time. Those equations were resolved in the Fortran 90 program that generated a table of simulated data of lactose, glucose and galactose along the time. The analysis of sensibility of the coefficients of the model was accomplished varying in $\pm 20\%$ the values of the kinetic coefficients. The glucose concentrations and galactose were not influenced by the variations in the coefficients K_m and K_r , and an increase in the value of V_{max} in 20% a better adjustment of the model was observed with the experimental data. For the validation of the model, hydrolysis tests were accomplished in solution phosphate buffer containing 5% of lactose and in skimmed milk with of 4.8% lactose. The model represented the hydrolysis process satisfactorily in solution phosphate buffer with 5% of lactose. For this solution the variation among the measured value and predicted of glucose was of 4%, when 75% of hydrolysis were reached, altering the value of V_{max} in 30%. In the case of the lactose hydrolysis of the milk, a variation was verified among the concentrations of measured glucose and predicted of 13% when 85% of lactose hydrolysis was reached. The simulated data for the model presentation with the originated experimental data of the lactose hydrolysis in half synthetic containing 5% of lactose and in skimmed milk.

Keywords: Milk; galactose; inhibition.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986. 567 p.
- BURVALL, A., ASP, N.G. & DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (maxilact®) - part 3: digestibility by human intestinal enzymes *in vitro*. **Food chemistry**. 1980. 5: 189-194.
- FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J.V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.
- FONTES, E.A.F **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998.79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by the enzyme batch reaction using β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v.31, n.1,p.69-76, 1996.
- MAHONEY, R. R., ADAMCHUK, C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of food science**. 1980. 45: 962-964.
- SMART, J. B. Transferase Reactions of β -galactosidase - New products opportunities.1994. Chaper 4. **bulletin of the IDF 289.16-22**.
- PARULEKAR, S. J., LIM, H. C. Modelling, optimization and control of semi- batch bioreactors. In: Fietchter, A. **Advances in biochemical - engineering/biotechnology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Cap.5, p.207-219.
- PASSOS, F.V., FLEMING, H.P., OLLIS, D.F. et al, Kinetics and Modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Raleigh, v. 60, n.7, p. 2627-2636, july, 1994. EKLAITIS, G. V., RAVINDRAN, A., RAGSDELL, K., M. **Engineering optimizaton**. USA. 1983. 684 p
- ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M., et al. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, Wageningen, v.56, n.6, p. 1875-1881, june, 1990.