

USO DE MÉTODOS NUMÉRICOS NA QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE DA HIDRÓLISE DA LACTOSE PARA OBTENÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

USE OF NUMERICAL METHODS IN THE QUANTIFICATION OF GLUCOSE OF LACTOSE HYDROLYSIS TO OBTAIN GALACTO-OLIGOSSACHARIDES

Leandro Blass¹
Ana Paula Manera²
Anderson Luis Jeske Bihain³
Giovana Silveira Soares⁴
Everson Jonatha Gomes da Silva⁵
Mateus Sicupira de Oliveira⁶

Resumo: Galacto-oligossacarídeos (GOS) são açúcares que promovem a manutenção da saúde devido sua atividade funcional como alimento prebiótico. A enzima β -galactosidase Prozyn Lactase pode ser empregada para a realização da hidrólise da lactose resultando em glicose e galactose. Em condições específicas de hidrólise de lactose, pode ocorrer também a síntese de GOS, sendo que quanto maior a hidrólise, maiores as chances de haver a síntese desse carboidrato. Cada ensaio experimental necessita principalmente de lactose e enzima comercial, dentre outros reagentes, o que torna cada ensaio realizado de alto custo devido ao alto valor das enzimas comerciais. O objetivo desse trabalho foi aplicar métodos numéricos aos dados a fim de se obter os ajustes polinomial e exponencial que descrevem a quantidade de glicose liberada durante a reação. A hidrólise da lactose foi realizada por 10 horas, sendo que a cada duas horas foram retiradas amostras para a análise da quantidade de glicose como forma de comprovar a hidrólise. Os métodos numéricos se tornam importantes nesse trabalho pois eliminam a necessidade de realização de ensaios experimentais para obter a quantidade de glicose formada. Assim, foram obtidas equações exponenciais e polinomiais de segundo grau e, em seguida, foram obtidos

- 1 Doutor em Modelagem Computacional, Universidade Federal do Pampa.
- 2 Doutora em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa.
- 3 Doutor em Modelagem Computacional, Universidade Federal do Pampa.
- 4 Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa.
- 5 Doutor em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Pampa.
- 6 Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa.

os erros relativos de cada equação, bem como o valor do coeficiente de correlação R^2 .

Palavras-chave: Ajuste de curvas; Prozyn Lactase; Reação enzimática.

Abstract: Galacto-oligosaccharides (GOS) are sugars that promote health maintenance due to their functional activity as a prebiotic food. The enzyme β -galactosidase Prozyn Lactase can be used for the hydrolysis of lactose resulting in glucose and galactose. In particular conditions of lactose hydrolysis, the synthesis of GOS may also occur, and the higher the hydrolysis, the greater the chances of the synthesis of this carbohydrate. Each experimental trial are based on lactose and commercial enzyme, among other reagents, which makes each test carried out at high cost due to the high value of commercial enzymes. The objective of this work was to apply numerical methods to the data in order to obtain the polynomial and exponential adjustments that describe the amount of glucose released during the reaction. The lactose hydrolysis reaction was carried out for 10 hours, and every two hours samples were taken to analyze the amount of glucose as a way of proving the hydrolysis of lactose. Numerical methods become important in this work because they eliminate the need to perform experimental tests to obtain the amount of glucose formed. Thus, we obtained exponential and polynomial equations of the second degree, and then we obtained the relative errors of each equation, as well as the R^2 value. It was concluded that, numerical methods were applied to the data in order to obtain the polynomial and exponential adjustments that describe the amount of glucose released during the complete reaction.

Keywords: Curve fitting; Enzymatic reaction; Prozyn Lactase.

1. INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática da lactose para obtenção de produtos com baixo teor de lactose e na síntese de galacto-oligosacarídeos (GOS) é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos, devido aos seus efeitos potencialmente benéficos sobre a assimilação dos alimentos que contenham lactose, principalmente aos consumidores intolerantes a este carboidrato (GURDAS *et al*, 2010).

A enzima responsável pela hidrólise da lactose é a beta-galactosidase que pode ser obtida a partir de fontes de micro-organismos, plantas e animais, contudo, de acordo com a sua fonte, as suas propriedades mudam significativamente. A obtenção da enzima por micro-

organismos é considerada a mais adequada para aplicações industriais porque oferece diversas vantagens como maior taxa de multiplicação e alto rendimento de produção comparado a outras fontes (PANESAR *et al.*, 2006). Dentre as enzimas beta-galactosidades disponíveis, encontra-se a enzima Prozyn Lactase, da marca Prozyn[®], obtida do micro-organismo *Kluyveromyces lactis*, com capacidade de hidrolisar a lactose resultando nos monômeros glicose e galactose e em condições específicas, além da hidrólise, realiza a síntese de GOS.

Galacto-oligossacarídeos são carboidratos formados por até 7 unidades de galactose (TZORTZIS, VULEVIC, 2009); sendo resistentes à ação das enzimas digestivas e, portanto, não digeríveis (MORO *et al.*, 2005). Quando consumidos, resultam no incremento da população de *Bifidobacterium*, sendo por isso considerados prebióticos (LISBOA, *et al.*, 2012).

Muitos problemas importantes que envolvem a engenharia e outros setores não possuem soluções analíticas, que se caracterizam por aplicar-se a problemas com geometria, equações e condições de contorno inicial e final muito simples (MARCHI, 2001). Os métodos numéricos são técnicas pelas quais os problemas matemáticos são formulados de modo que possam ser resolvidos com operações aritméticas (CHAPRA, CANALE, 2011).

Manucci (2009) em seu trabalho sobre síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos utilizando lactose de soro de leite investigou a produção de GOS com β -galactosidases comercialmente disponíveis, com objetivo de compreender os fatores que influenciam no rendimento dos GOS. Visto que a produção deste açúcar apresenta um alto custo, modelos matemáticos são desenvolvidos com a finalidade de reduzir esses custos simulando assim resultados das concentrações de glicose ou de GOS a fim de saber quais as condições mais ideais e quais os parâmetros como substrato, concentração de enzima, pH, temperatura entre outros terão uma maior influência neste meio.

A utilização do método numérico adequado para a solução do problema proposto neste trabalho consiste em determinar uma equação que descreva a concentração de glicose conforme o tempo de reação de hidrólise da lactose, fazendo uso de um ajuste exponencial e polinomial. Ao realizar ensaios experimentais, obtém-se dados apenas nas condições do ensaio. O ajuste de curvas serve para obter estimativas intermediárias a esses pontos experimentais, permitindo encontrar a melhor condição para a hidrólise da lactose que pode estar entre um dos experimentos testados.

Um gráfico de dispersão dos dados mostra um comportamento em formato curvo que se caracteriza por um constante aumento por período de tempo, por isso, optou-se por realizar os ajustes exponencial e polinomial, para possível comparação a fim de se buscar uma equação que represente a solução do problema.

2. METODOLOGIA

Para o estudo e aplicação do método numérico, foram utilizados os dados obtidos por Oliveira et al., 2016, apresentados na Tabela 1, indicando os valores de concentração de glicose em função do tempo de reação da enzima. Sabe-se que quatro fatores principais podem influenciar uma reação enzimática, sendo eles temperatura, pH, concentração de lactose e concentração de enzima utilizada. Na Tabela 1, três destes fatores foram mantidos constantes e um fator variando, obtendo quatro condições diferentes referentes aos ensaios 1, 2, 3 e 4.

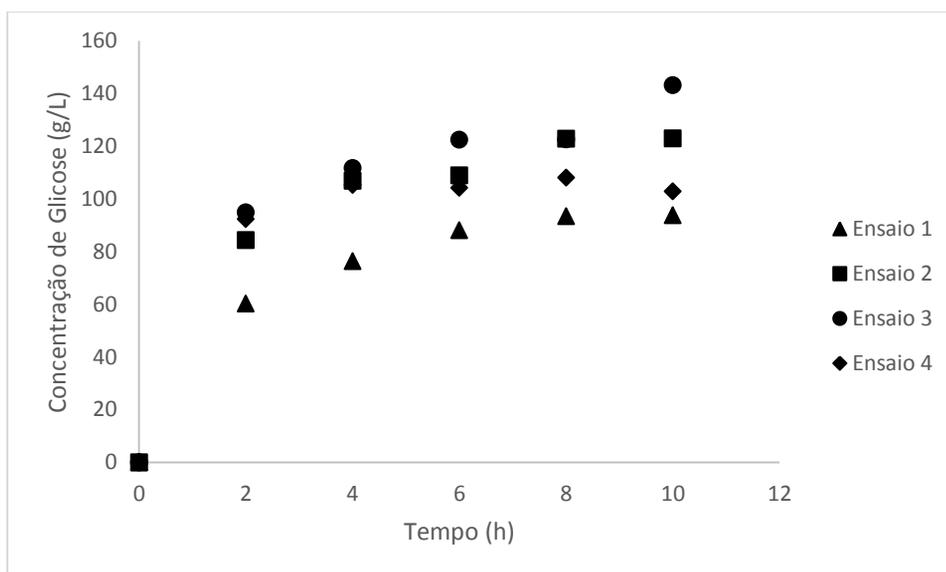
A dispersão dos dados experimentais obtidos é mostrada na Figura 1, em um gráfico de concentração de glicose versus tempo de reação de hidrólise da lactose.

Tabela 1: Concentrações de glicose experimental em função do tempo nos 4 ensaios.

ENSAIOS	Concentrações de glicose (g/L)					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
1	0	60,19	76,32	88,08	93,32	93,73
2	0	84,24	106,83	108,79	122,72	122,87
3	0	94,79	111,62	122,34	122,51	143,11
4	0	92,21	105,24	104,08	107,97	102,78

Fonte: Autores, 2018.

Figura 1: Concentração da glicose em função do tempo de hidrólise da enzima.



Fonte: Autores, 2018.

Considerando que nos resultados experimentais visualmente pode ser notado um comportamento exponencial ou polinomial, pode-se ajustá-los pelas Equações 1 e 2, mostradas a seguir, respectivamente.

$$f(x) = \beta e^{ax} \quad (1)$$

$$f(x) = c + ax + bx^2 \quad (2)$$

Os ajustes serão representados em tabelas. Os erros relativos de cada ensaio foram calculados pela Equação (3), utilizando os valores experimentais e teóricos de concentração de glicose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao aplicar o método de ajuste exponencial nos ensaios 1 ao 4, foram obtidas as constantes das equações que descrevem a concentração de glicose formada nas reações enzimáticas experimentais realizadas por Oliveira et al (2016), as quais se encontram na Tabela 2.

Tabela 2: Equações obtidas através do ajuste exponencial.

Ensaio	Equações
1	$F_1(x) = 58,6361e^{0,0543x}$
2	$F_2(x) = 82,6816e^{0,0446x}$
3	$F_3(x) = 89,4766e^{0,0458x}$
4	$F_4(x) = 95,1245e^{0,0121x}$

Fonte: Autores, 2018.

A partir das constantes da Tabela 2, foi utilizada a equação 1 para obtenção das concentrações teóricas de glicose em função do tempo. Para isso, substituiu-se o tempo de análise em x , resultando no valor da concentração de glicose correspondente, mostrados na Tabela 3.

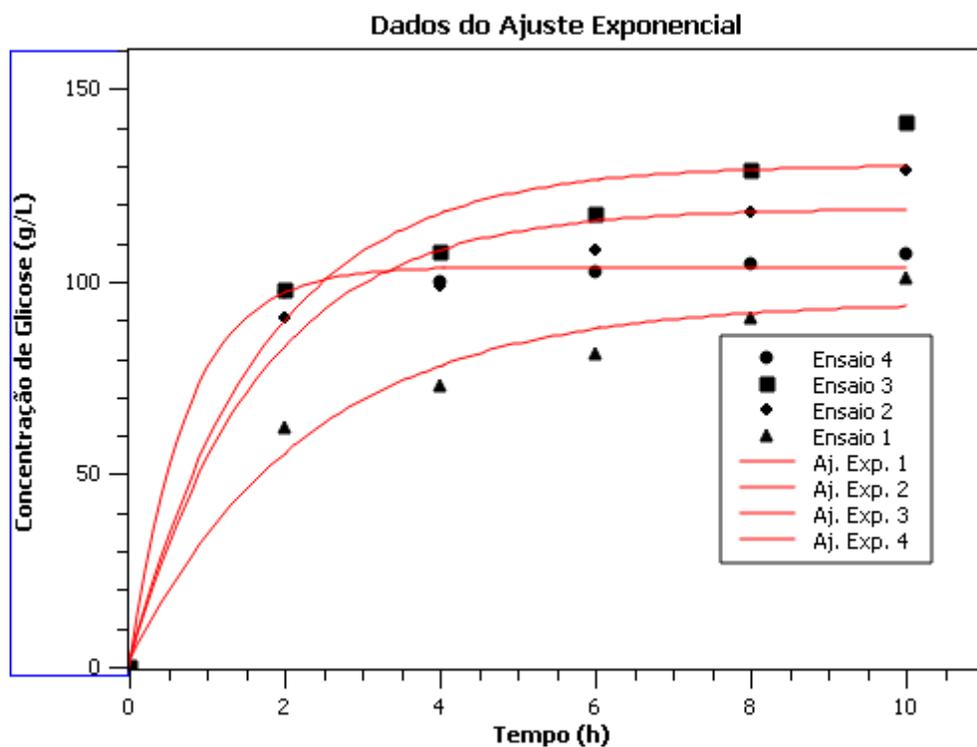
Na sequência, a Figura 2 mostra a dispersão dos dados experimentais de concentração de glicose, bem como os ajustes exponenciais obtidos para os ensaios. Na legenda da figura citada é informado então os ensaios estudados e a aplicação dos ajustes (Ajuste Exponencial).

Tabela 3: Concentrações de glicose em função do tempo, obtidas pelo ajuste exponencial para os 4 ensaios nos horários de coleta dos dados.

ENSAIOS	Concentrações de glicose (g/L)					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
1	0	65,36	72,86	81,22	90,54	100,92
2	0	90,40	98,83	108,05	118,13	129,15
3	0	98,06	107,47	117,78	129,07	141,45
4	0	97,45	99,84	102,29	104,79	107,36

Fonte: Autores, 2018.

Figura 2: Concentração de glicose em função do tempo de hidrólise da enzima, pontos experimentais e ajustes exponenciais obtidos.



Fonte: Autores, 2018.

Para o ajuste polinomial, foram obtidas as equações de segundo grau mostradas na Tabela 4.

Tabela 4: Equações obtidas através do ajuste polinomial.

Ensaio	Equações
1	$f_1(x) = 6,8110 + 23,5712x - 1,5288x^2$
2	$f_2(x) = 11,5521 + 30,7706x - 2,0316x^2$
3	$f_3(x) = 15,1996 + 31,1031x - 1,9540x^2$
4	$f_4(x) = 14,2149 + 31,3730x - 2,3372x^2$

Fonte: Autores, 2018.

A partir das equações da Tabela 4, foram obtidas as concentrações de glicose teóricas referentes ao ajuste polinomial. Esses valores de concentração de glicose são mostrados na Tabela 5 a seguir e, na Figura 3, é mostrado a dispersão dos dados experimentais e os ajustes polinomiais obtidos.

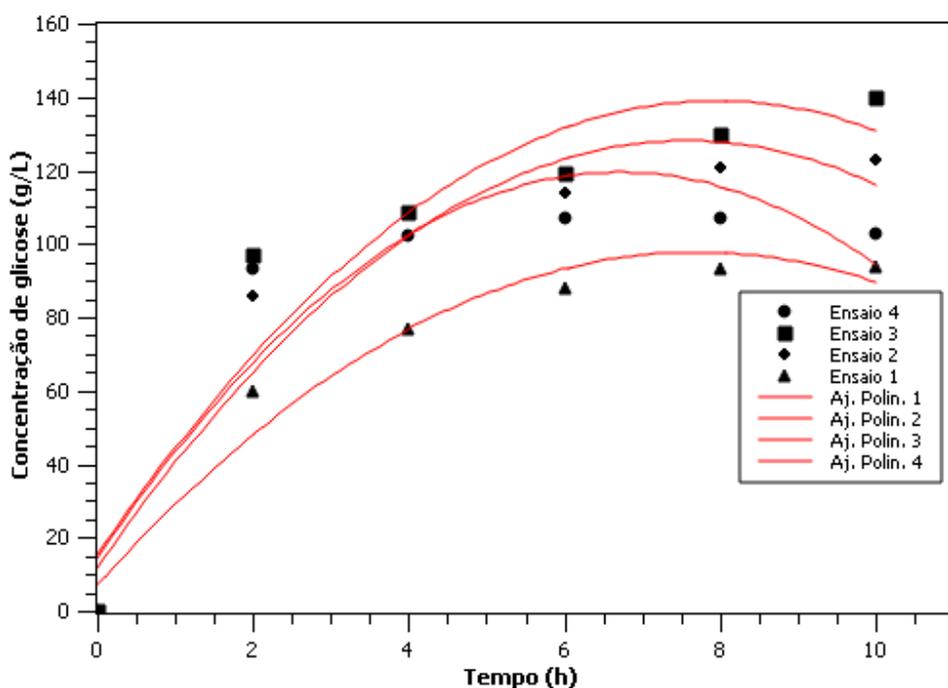
Tabela 5: Concentrações de glicose em função do tempo, obtidas pelo ajuste polinomial para os 4 ensaios nos horários de coleta dos dados.

Ensaio	Concentrações de glicose (g/L)					
	0h	2h	4h	6h	8h	10h
1	0	60,10	76,63	87,75	93,45	93,72
2	0	85,76	102,13	113,79	120,76	123,02
3	0	96,94	108,37	119,30	129,84	139,95
4	0	93,20	102,31	106,94	107,09	102,75

Fonte: Autores, 2018.

Ao comparar os valores de concentração de glicose experimentais (Tabela 1) e os obtidos através dos ajustes (Tabelas 3 e 5), nos mesmos tempos de coleta de dados, observa-se que os valores obtidos pela equação de segundo grau foram, em geral, mais próximos que os obtidos pela equação exponencial.

Figura 3: Concentração de glicose em função do tempo de hidrólise da enzima, pontos experimentais e ajustes polinomiais obtidos.



Fonte: Autores, 2018.

A Tabela 6 apresenta os Erros Relativos obtidos utilizando-se os dados das Tabelas 1, 3 e 5. Os erros foram menores para os ajustes polinomiais, sendo estas equações as que se ajustam melhor na quantificação de glicose obtida nas condições estudadas.

Tabela 6: Erro relativo dos ajustes polinomial e exponencial, para cada ensaio.

Ensaio	Erro para ajuste exponencial	Erro para ajuste polinomial
1	0,0631	0,0022
2	0,0487	0,1253
3	0,0348	0,0317
4	0,0399	0,0149

Fonte: Autores, 2018.

Mediante os dados apresentados da concentração de glicose pelo tempo neste trabalho sobre hidrólise da lactose para síntese de GOS, utilizamos os coeficientes de determinação R^2 referentes aos ajustes já citados acima para verificação de quanto o ajuste é adequado para representar o problema em questão. Observa-se que os ajustes exponenciais são mais representativos do problema experimental pois o coeficiente de determinação é mais próximo de 1.

Tabela 8: Valores de coeficiente de determinação (R^2) para os ajustes polinomial e exponencial, para cada ensaio.

Valores teóricos com ajuste exponencial	Valores teóricos com ajuste polinomial
0,965484	0,959772
0,987069	0,931201
0,970756	0,8999
0,996768	0,872504

Fonte: Autores, 2018.

4. CONCLUSÃO

Ambos os ajustes exponencial e polinomial permitiram a obtenção de equações que se adequam ao problema de quantificação de glicose, conforme observado nas Figuras 2 e 3. O ensaio 2 foi o único cujos erros relativos foram muito próximos devido correlacionar o coeficiente de determinação com o erro calculado, ou seja, ambas as equações poderiam representar o mesmo problema com um grau de confiabilidade muito próximo. Os ensaios 1,3 e 4 apresentaram erro menor no ajuste polinomial, sendo as equações de segundo grau mais representativas, o que indica que o modelo adequadamente representou a real relação entre os parâmetros estudados.

Quando analisados os coeficientes de determinação, as equações exponenciais se mostraram mais precisas, ou seja, são as equações que melhor se adequam para a quantificação de glicose. Em posse da

equação que descreve o problema é possível obter um menor custo de produção de GOS, mais facilidade na quantificação da glicose e diminuição da quantidade de trabalho experimental necessário, além de permitir conhecer a concentração de glicose em tempos que não sejam os analisados experimentalmente.

Agradecimentos

Ao PDA - Pesquisa/UNIPAMPA, CNPq e à FAPERGS pelo apoio financeiro. Ao incentivo à pesquisa e espaço físico do Laboratório de Tecnologia de Matemática e Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos – UNIPAMPA – Campus Bagé.

REFERÊNCIAS

CHAPRA, S. C. CANALE, R.P. Métodos numéricos para Engenharia. 5ª Edição. Porto Alegre: AMGH, 2011.

GURDAS, S.; GULEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-Galactosidase onto Duolite A568 resin via simple adsorption mechanism. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 94-911, 2010.

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**, Campinas, v. 15, p 30-40, 2012.

MANUCCI, F. Enzymatic Synthesis of galactooligosaccharides from Whey Permeate. Dublin Institute of Technology. **Tourism and Food**, 2009.

MARCHI, C.H. **Verificação de soluções numéricas unidimensionais em dinâmica dos fluídos**. Tese (doutorado em Engenharia Mecânica) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p 305, 2001.

MORO, G. E.; STAHL, B.; FANARO, S.; JELINEK, J.; BOEHM, G.; COPPA, G. Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed infants. **Acta**

Paediatrica, Stockholm, v. 94, s. 449, p. 27-30, 2005. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02151.x>.

OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, R. M.; BONINI, M. P.; MANERA, A. P. Hidrólise da Lactose pela Enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. **Congrega – Urcamp**. São Gabriel – RS. 2016

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S., KENNEDY, J.F.; KUMAR, H. Review microbial production, immobilization and applications of beta-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 530-543, 2006.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. (Ed). **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**. New York: Springer, 2009. p. 207-244.