



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

RAVENA CASEMIRO OLIVEIRA

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-
TAGATOSE CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE**

FORTALEZA

2019

RAVENA CASEMIRO OLIVEIRA

ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE
CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana.

FORTALEZA

2019

RAVENA CASEMIRO OLIVEIRA

ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE
CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada em: 27 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará

Professor Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará

Dra. Anne Kamilly Nogueira Felix
Membro externo ao programa

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me conceder força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, Wilma e Manoel Vieira, por serem peças fundamentais na minha formação, por terem sempre acreditado em mim e que com muito amor não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Rebeca e Leiva, pelo companheirismo, incentivo e por todos os conselhos.

À professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves pela orientação, confiança, por toda ajuda e conhecimento transmitido ao longo desses dois anos. Obrigada por ser uma fonte de inspiração.

Ao professor Hosiberto Batista de Sant'Ana pela coorientação e apoio na realização do trabalho.

Aos professores Dr. José Nilton Silva e Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira da UFCG pelo companheirismo, incentivo, confiança, por serem exemplos de profissional e além de tudo por serem amigos.

Aos membros do GpBio, em especial Bruna, Edvan, Juliana, Layanne, Renata e Ticiane, pelo apoio e por tornarem os dias de trabalho mais leves e felizes.

Aos amigos e companheiros de mestrado Darlyson, Jorge, Karol, Liana e Raquel pela amizade, apoio, convívio e por toda ajuda na realização desse trabalho.

À minhas amigas Adrielly, Débora e Emanuelle por acreditarem em mim e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos que me incentivaram, me apoiaram e me acompanharam durante essa conquista.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP.

‘São nossas escolhas que mostram o que realmente somos, muito mais do que nossas habilidades’

J.K. Rowling

RESUMO

A D-Tagatose é um açúcar raro com baixo valor calórico, similar a sacarose possuindo 92% do seu poder de dulçor, porém com apenas 38% do valor calórico, aproximadamente $1,5 \text{ Kg}\cdot\text{cal}^{-1}$. É considerado um agente anti-hiperglicemante, devido a sua baixa absorção e metabolização pelo organismo humano. Além disso, possui vários benefícios, como o seu alto potencial antidiabético para o tratamento de diabetes tipo II e efeito prebiótico. A D-Tagatose pode ser produzida através do método enzimático a partir da D-Galactose utilizando como biocatalisador a enzima L-arabione isomerase, A enzima L-AI utilizada nesse trabalho foi obtida de *Enterococcus faecium* expressa em *Escherichia coli*. Com o intuito de otimizar a produção de D-Tagatose, por processos biológicos, a reação de isomerização foi estudada. Realizou-se um planejamento experimental do tipo 2^3 com 3 repetições no ponto central para analisar e encontrar as melhores condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato que promovem a maior conversão de D-Galactose em D-Tagatose. Além disso, técnicas alternativas, como o uso do ultrassom e do tampão borato, também foram analisadas. A concentração de D-Tagatose produzida foi determinada pelo método colorimétrico utilizando espectrofotômetro. Os resultados mostraram que existe uma forte influência da temperatura e do pH sob a reação enzimática. O planejamento experimental resultou no ponto ótimo de produção de D-Tagatose nas condições de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,6 e concentração de substrato de 164 mM, obtendo um rendimento de 29,77 %. Também observou-se que o ultrassom aumentou o efeito da temperatura na reação. Além disso, o trabalho aponta que a reação enzimática de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose ocorre na faixa de temperatura na qual o processo é não espontâneo. Com isso, conclui-se que as condições reacionais são capazes de alterar a velocidade da reação enzimática apesar do seu equilíbrio já é bem definido.

Palavras-chave: adoçante, D-Tagatose, L-Arabinose Isomerase, isomerização, D-Galactose

ABSTRACT

D-Tagatose is a rare sugar with a low caloric value, similar to sucrose, which has 92% of sweetness, but only 38% of the caloric value, approximately $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cal}^{-1}$. It is considered an antihyperglycaemic agent, due to its low absorption and metabolism by the human organism. In addition, it has several benefits, such as its high antidiabetic potential for the treatment of type II diabetes and prebiotic effect. D-Tagatose can be produced by the enzymatic method from D-Galactose using as the biocatalyst the enzyme L-arabinose isomerase. The L-AI enzyme used in this work was obtained from *Enterococcus faecium* expressed in *Escherichia coli*. In order to optimize the production of D-Tagatose by biological processes the isomerization reaction was studied. An experimental design of type 2^3 with 3 replicates at the central point was carried out to analyze and find the best conditions of pH, temperature and initial concentration of substrate that achieve the highest conversion of D-Galactose in D-Tagatose. In addition, alternative techniques, such as the use of ultrasound and borate buffer were also analyzed. The concentration of D-Tagatose produced was determined by the colorimetric method using spectrophotometer. The results showed that there is a high influence of temperature and pH on the enzymatic reaction. The experimental design resulted in optimum D-Tagatose production at 55°C , pH 5.6 and substrate concentration of 164 mM reaching a yield of 29,77 %. It can also be seen that ultrasound increased the effect of temperature on the reaction. In addition, the work indicates that the enzymatic reaction of D-Galactose isomerization in D-tagatose occurs in the temperature range in which the process is non-spontaneous. Thus, it is concluded that the reaction conditions are capable of altering the speed of the enzymatic reaction, but its equilibrium is well defined.

Keywords: sweetener, D-Tagatose, L-Arabinose isomerase, isomerization, D-Galactose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação bidimensional das hexoses D-Frutose, D-Tagatose e D-Galactose.....	18
Figura 2	– Fluxograma simplificado do processo de produção de D-Tagatose.....	20
Figura 3	– Representação da estrutura molecular da ECAI.....	23
Figura 4	– Representação do perfil da atividade catalítica de algumas enzimas em função do pH.....	26
Figura 5	– Representação da temperatura ótima para a atividade da enzima.....	27
Figura 6	– Fluxograma do processo de produção do extrato enzimático.....	31
Figura 7	– Sistema de concentração Amicon®Pro Merck Millipore.....	33
Figura 9	– Fluxograma representativo do processo de produção da D-Tagatose a partir da reação de isomerização da D-Galactose por rota enzimática.....	36
Figura 8	– Sistema utilizado para a realização dos ensaios de solubilidade.....	38
Figura 10	– Banho ultrassônico.....	39
Figura 11	– Curva de solubilidade da lactose comparando os dados experimentais (■) com os dados obtidos por Brito (2007) (●).....	41
Figura 12	– Curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.....	43
Figura 13	– (A) fração molar e (B) coeficiente de atividade de D-Galactose em soro de leite em função da temperatura.....	44
Figura 14	– Perfil eletroforético do extrato enzimático (A) produzido por Sousa (2015). 1- Padrões de peso molecular e 8, 9, 10- Extrato transformado pela cepa E.coli BL21 (DE3) com o plasmídeo PET 29a(+) P 209 induzidas por IPTG; (B) produzido neste trabalho. 1 – Marcador de baixo peso molecular e 2 - Amostra do extrato enzimático produzido; (C) produzido por Manzo et al. (2019). 1 – Extrato bruto e 8 – Marcador padrão de peso molecular.....	46
Figura 15	– Perfil eletroforético. 1– Marcador; 2 – Extrato enzimático filtrado; 3 – Extrato enzimático bruto e 4 – Extrato enzimático concentrado.....	47
Figura 16	– Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para as reações ocorrendo a 40 °C (■), 50 °C(●) e 60 °C(▼). Reação ocorrendo com concentração de substrato 500 mM e pH 5,6.....	49

Figura 17	– (A) Rendimento obtido para as reações ocorrendo a 40 °C (■), 50 °C(●) e 60 °C(▲) e (B) atividade de isomerização para as reações a 40, 50 e 60°C.....	49
Figura 18	– Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para as reações ocorrendo com substrato D-Galatose 500 mM (■), D-Galatose 250 mM (●) e D-Galatose 250 mM sendo alimentada após 35 horas de reação com D-Galatose 250 mM (▲). Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.....	51
Figura 19	– Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para: (A) reação a 55 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (B) reação a 55 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (C) reação a 55 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (D) reação a 55 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●).....	53
Figura 20	– Gráfico de Pareto para os efeitos lineares e quadráticos do modelo obtido para o planejamento experimental.....	54
Figura 21	– Gráfico de contorno para a resposta obtida do planejamento experimental.....	57
Figura 22	– (A) Concentração de D-Tagatose produzida e rendimento obtido em função do tempo reacional para as reações em pH 7,0 (■) e em pH 5,6(●) e (B) atividade de isomerização para as reações em pH 5,6 e pH 7,0. Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM.....	58
Figura 23	– Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para reação ocorrendo em banho termostático (■) e em banho ultrassônico (●). Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.....	59
Figura 24	– (A) Rendimento obtido ao longo do tempo reacional para a reação com extrato concentrado (2,40 U.mL ⁻¹) (■) e para a reação com extrato bruto (1,27 U.mL ⁻¹) (●). (B) Concentração de D-Tagatose produzida ao longo do tempo reacional para a reação com extrato concentrado (■) e para a reação com extrato bruto (●). Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.....	60

Figura 25	– Atividade de isomerização para reação com extrato bruto ($1,27 \text{ U.mL}^{-1}$) e extrato concentrado ($2,40 \text{ U.mL}^{-1}$). Reação a 55°C , concentração de substrato 164 mM e $\text{pH } 5,6$	61
Figura 26	– Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para a reação utilizando D-Galactose em tampão acetato de sódio (■) e em tampão borato (●).....	63
Figura 27	– Cromatograma para (A) reação em tampão borato e (B) reação em tampão acetato de sódio. Tempo de retenção da D-Galactose: 15 minutos; Tempo de retenção da D-Tagatose: 20 minutos.....	64
Figura 28	– Gráfico de van't Hoff para a reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose.....	65
Figura 29	– Variação da energia livre de Gibbs para a reação de isomerização em função da temperatura.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–Exemplos de microrganismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos capazes de produzir a L-Arabinose Isomerase.....	22
Tabela 2	– Planejamento Experimental com os fatores e níveis naturais.....	35
Tabela 3	– Dados estatísticos da curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.....	43
Tabela 4	– Atividade, atividade específica e concentração de proteínas do extrato enzimático produzido neste trabalho e anteriormente por membros do grupo GpBio.	45
Tabela 5	– Atividade enzimática, atividade específica e concentração de proteínas do extrato bruto, concentrado e filtrado.....	47
Tabela 6	– Planejamento Experimental com efeitos e seus níveis naturais, resposta e rendimento obtido para cada experimento.....	52
Tabela 7	– Valores de Fcalculado e Ftabelado para os efeitos utilizados no planejamento experimental.....	55
Tabela 8	– Coeficiente de determinação (R^2), ajustado (aj) e predito (pred) e valor S para o modelo obtido.....	56
Tabela 9	– Concentração de D-Tagatose produzida para reação sem reuso e com o reuso do extrato enzimático. Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.	62
Tabela 10	– Concentração de D-Tagatose obtida no precipitado para substrato em tampão borato e tampão acetato de sódio.....	64
Tabela 11	– Valores aparentes de K_{eq} , ΔH , ΔS e ΔG em função da temperatura.....	66

LISTA DE SÍMBOLOS

GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	US Food and Drug Administration
L-AI	L-Arabinose Isomerase
IRSR	International Society of Rare Sugars
ECAI	L-Arabinose Isomerase de <i>Escherichia coli</i>
K_{eq}	Constante aparente de equilíbrio
ΔH	Varição de entalpia de van't Hoff
ΔS	Varição de entropia
ΔG	Varição de eenergia livre de Gibbs
T	Temperatura
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
O/N	Overnight
IPTG	Isopropil-1-thio- β -D-galactopiranosídeo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
X_g	Fração molar de D-Galactose
γ_g	Coefficiente de atividade da D-Galactose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	D-Tagatose: características, aplicações e produção	18
2.2	L-arabinoese isomerase: características e aplicações.	21
2.3	Equilíbrio químico: reação enzimática e condições do meio que alteram a velocidade de reação	24
2.3.1	<i>Efeito do pH</i>	25
2.3.2	<i>Efeito da temperatura</i>	26
2.3.3	<i>Parâmetros termodinâmicos</i>	27
3	METODOLOGIA	29
3.2	Produção da L-AI e obtenção do extrato enzimático	29
3.2.1	<i>Micro-organismo</i>	29
3.2.2	<i>Preparo do Inóculo</i>	29
3.2.3	<i>Condições de cultivo</i>	29
3.2.4	<i>Preparo do extrato enzimático</i>	30
3.3	Caracterização do extrato enzimático	32
3.3.1	<i>Quantificação de proteínas</i>	32
3.3.2	<i>Análise de massa molar</i>	32
3.3.3	<i>Atividade do extrato enzimático</i>	32
3.3.4	<i>Concentração do extrato enzimático</i>	33
3.4	Estudo da reação de conversão de D-Galactose em D-Tagatose	34
3.4.1	<i>Ensaio preliminares: efeito da temperatura na reação</i>	34
3.4.2	<i>Planejamento Experimental</i>	34
3.5	Curva de solubilidade da D-Galactose	37
3.6	Efeito do ultrassom	38
3.7	Efeito da concentração do extrato enzimático	39
3.8	Reuso do extrato enzimático	39
3.9	Efeito do tampão borato	40

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	Curva de solubilidade da D-Galactose	41
4.2	Caracterização do extrato enzimático	45
4.2.1	<i>Concentração do extrato enzimático</i>	46
4.3	Reação de conversão de D-Galactose em D-Tagatose	48
4.3.1	<i>Estudos preliminares: efeito da temperatura na reação enzimática</i>	48
4.3.2	<i>Planejamento Experimental</i>	51
4.4	Efeito do Ultrassom	58
4.5	Efeito da concentração do extrato enzimático	59
4.6	Reuso do extrato enzimático	61
4.7	Efeito do uso do tampão borato	62
4.8	Parâmetros termodinâmicos	65
5	CONCLUSÕES	68
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE	78

1 INTRODUÇÃO

A relação entre dieta e incidência de doenças crônicas tem levado a mudança nos hábitos alimentares e a busca por estilos de vida mais saudáveis. Além disso destaca-se o potencial dos alimentos para manter ou melhorar o estado de saúde dos consumidores. Esses alimentos são chamados de alimentos funcionais.

Alimentos funcionais são definidos como aqueles que fornecem benefícios adicionais aos da alimentação ao consumidor, podendo reduzir o risco de doenças, entretanto não podem ser destinados ao tratamento de doenças agudas ou à utilização de cuidados paliativos (BALDISSERA et al., 2011; JONES, 2002).

Dentro do mercado de alimentos funcionais, pode-se destacar a busca por adoçantes de baixa caloria visando a substituição da sacarose presente na alimentação. Existe uma extensa diversidade de adoçantes e edulcorantes menos calóricos no mercado, entretanto, ainda não foi produzido um adoçante que apresente tanto as propriedades similares às da sacarose, em termos de doçura, sabor, cor e odor quanto um baixo valor calórico. A D-Tagatose surge então como uma alternativa promissora.

A D-Tagatose é um monossacarídeo, epímero da frutose e uma cetohexose natural, classificada como *GRAS – Generally Recognized As Safe* pela *FDA – US Food and Drug Administration*, ou seja, é considerada uma substância segura (MEN et al., 2014; XU et al., 2016). Por ser um substituto da sacarose, possuindo sabor e poder de doçura semelhantes, porém com menos valor calórico, a D-Tagatose pode ser utilizada na indústria de alimentos, na produção de bebidas, sucos de frutas, doces, entre outros. (GUO et al., 2018; XU et al., 2011).

A D-Tagatose é produzida através da reação de isomerização da D-Galactose por rota química utilizando catalisador de cálcio, possuindo assim algumas desvantagens, como produção de subprodutos indesejáveis, geração de rejeito químico e necessidade de complexas etapas de purificação do produto. Assim, a produção de D-Tagatose a partir de D-Galactose, por rota enzimática, usando L-arabinose isomerase (L-AI) como biocatalisador tem sido estudada intensivamente nos últimos anos (HUNG et al., 2014; KIM et al., 2015, 2017; LAKSMI et al., 2018; LIU et al., 2014; MEN et al., 2014; TORRES et al., 2014; XU et al., 2011, 2012).

No entanto, a produção de D-Tagatose via rota enzimática ainda possui algumas desvantagens, como por exemplo, uma baixa produtividade para escala industrial

(SHIN et al., 2016). As enzimas não são plenamente utilizadas em escala industrial devido à instabilidade de suas estruturas ocasionada, principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em condições desnaturantes (pH e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos) (RODRIGUES, 2009; SOUSA, 2015) .

Visando amenizar os percalços da rota enzimática e aumentar a conversão da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose vários estudos sobre a modificação genética da enzima L-arabinose isomerase foram realizados. O estudo da modificação genética da enzima L-arabinose isomerase utilizada nesse trabalho foi realizado por Manzo e colaboradores, 2019.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos sobre a modificação genética da L-AI com o intuito de aumentar a produção de D-Tagatose, a reação ainda possui um baixo valor de conversão. Uma outra alternativa é então realizar o estudo das condições reacionais e do equilíbrio da reação, algo que é pouco abordado na literatura.

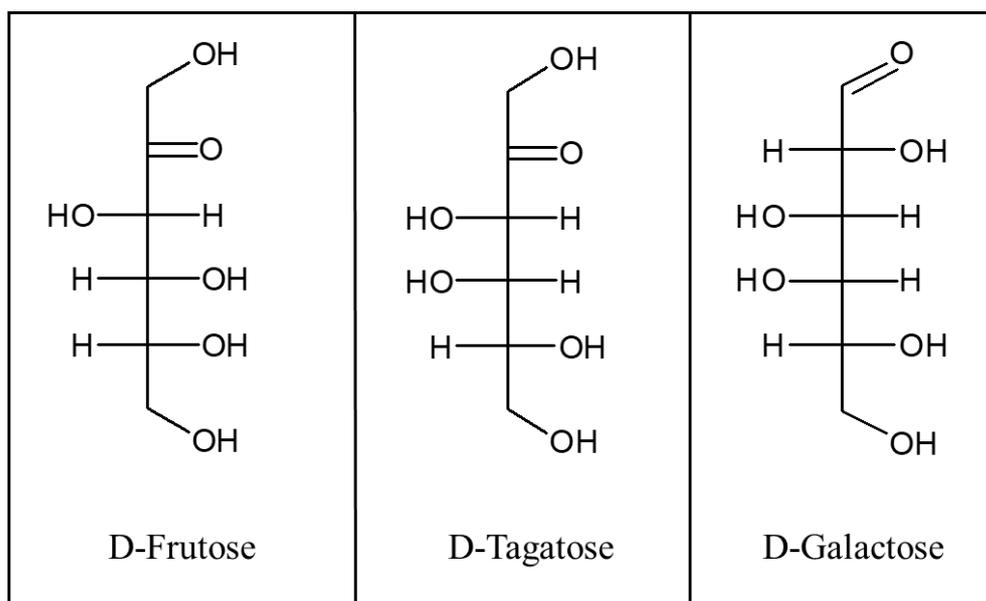
Neste contexto, o trabalho tem como objetivo o estudo das condições da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose utilizando a L-arabinose isomerase como biocatalisador visando o aumento do rendimento dessa reação. Para isso, serão estudados os efeitos do pH, temperatura e concentração inicial de substrato sob o equilíbrio da reação através de um planejamento experimental juntamente com uma abordagem termodinâmica dos resultados obtidos. Além disso, serão avaliadas rotas alternativas, como, por exemplo, o uso do ultrassom e da presença de tampão borato na reação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 D-Tagatose: características, aplicações e produção

A D-Tagatose é uma cetohexose natural, encontrada nos componentes da goma exsudada da árvore de cacau, *Sterculia Setigera*, e também detectada como um componente de um oligossacarídeo em líquenes da espécie *Rocella* (GUO et al., 2018; KAWAMURA, 2004). A D-Tagatose é um monossacarídeo, epímero da D-frutose, diferencia-se apenas pela posição do grupo hidroxila no quarto carbono, e isômero da D-Galactose (ROY et al., 2018; WANARSKA; KUR, 2012), como apresentado na Figura 1 abaixo.

Figura 1 – Representação bidimensional das hexoses D-Frutose, D-Tagatose e D-Galactose.



FONTE: Elaborada pela autora.

De acordo com (SALONEN et al., 2012), a D-Tagatose passou a ser comercializada nos Estados Unidos em 2003 como um adoçante de baixa caloria. A D-Tagatose não possui sabor residual e apresenta 92% do poder de dulçor quando comparada com a sacarose, porém com apenas 38% do valor calórico, aproximadamente $1,5 \text{ Kg.cal}^{-1}$ (FUJIMARU; PARK; LIM, 2012; JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017; LAKSMI et al., 2018; MEN et al., 2014; SON et al., 2018).

Segundo (KIM, 2004) a D-Tagatose possui efeito similar à sacarose e carameliza durante o cozimento obtendo a escurecimento desejado em alguns produtos alimentícios. Além disso, pode ser utilizada na forma de aditivos alimentares como edulcorantes, texturizador, estabilizador e umectantes. Considerando os seus benefícios nutricionais, pode ser usada em cereais, refrigerantes diets, sorvetes, iogurtes e suplementos dietéticos (KAWAMURA, 2004).

A D-Tagatose possui vários benefícios para saúde. Por ser pouco absorvida e metabolizada pelo organismo humano, a D-Tagatose possui alto potencial antidiabético para o tratamento de diabetes tipo II, causando perda de peso e aumento da lipoproteína de alta densidade, sendo assim, considerado um agente anti-hiperglicemante (Donner et al., 2010). Possui efeito prebiótico regulando a flora intestinal, prevenção de cáries dentárias, tratamento de obesidade, baixo colesterol e prevenção do câncer de colo (LU; LEVIN; DONNER, 2008; SALONEN et al., 2012; XU et al., 2011). Alguns trabalhos mostram que a D-Tagatose pode ser considerada um agente anti-biofilme e anti-halitose (LAKSMI et al., 2018; OH, 2007).

A D-Tagatose faz parte do grupo de açúcares raros, de acordo com a *International Society of Rare Sugars* (ISRS), e é o primeiro açúcar, que não provem do processo sucroalcooleiro, a ser produzido industrialmente (GUERRERO-WYSS; DURÁN AGÜERO; ANGARITA DÁVILA, 2018; XU et al., 2018).

A D-Tagatose é convencionalmente produzida através da rota química ou da rota enzimática utilizando como substrato a D-Galactose. A D-Galactose pode ser obtida através da hidrólise da lactose pura ou em materiais ricos em lactose, como o soro do leite, o qual é um subproduto de baixo custo das indústrias de laticínios e encontra-se em grandes quantidades (DRABO; DELIDOVICH, 2018; WANARSKA; KUR, 2012).

Ainda de acordo com Wanarska e Kur (2012) o método químico para a produção de D-Tagatose foi desenvolvido e patenteado por Biospherics Incorporated (USA). No método químico, segundo a patente, a D-Galactose pode ser isomerizada em D-Tagatose com hidróxido de cálcio e na presença de cloreto de cálcio como catalisador. Sob condições fortemente alcalinas e a uma temperatura relativamente baixa, o hidróxido de cálcio forma um complexo insolúvel com D-Tagatose. O tratamento da suspensão com ácido, preferencialmente dióxido de carbono, liberta a D-Tagatose do complexo. O sal de cálcio insolúvel é então removido por filtração. Os íons restantes são eliminados por

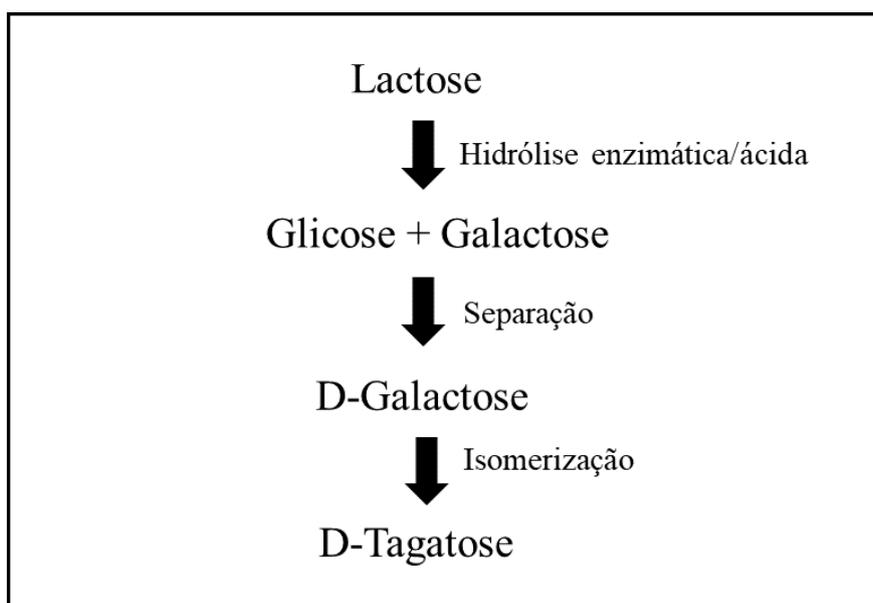
cromatografia de troca iônica. O xarope bruto é então concentrado e a D-Tagatose pura é recuperada por cristalização (BIOSPHERIES INCORPORATED, 1991).

Percebe-se então, que a produção de D-Tagatose pelo processo químico produz grande quantidade de subprodutos, necessitando assim de complexas etapas de purificação e alto custo de tratamento de efluentes (GUO et al., 2018; LIU et al., 2014; SOUSA, 2015). Por isso, o uso do método químico tem sido limitado, atraindo assim o interesse pelo método enzimático como uma alternativa viável.

O processo enzimático é um método viável e apresenta muitas vantagens sobre a isomerização química, tais como condições de reação mais brandas, menor formação de subprodutos indesejáveis, potencial para melhoria do catalisador via evolução molecular, alta especificidade, eficiência e sustentabilidade (KIM, 2004; ZHANG et al., 2017). No método enzimático a D-Tagatose é produzida a partir da D-Galactose utilizando como biocatalisador a enzima L-arabione isomerase, a qual mostrou a maior eficiência para D-Tagatose. (KIM et al., 2014, 2017; PATEL et al., 2017b; SHIN et al., 2016).

Em ambos os métodos utilizados, a produção de D-Tagatose a partir da isomerização da D-Galactose é normalmente constituída por duas etapas: 1) A hidrólise da lactose em uma mistura equimolar de Galactose e Glicose e 2) A isomerização da D-Galactose em D-Tagatose. Esse mecanismo é exemplificado no fluxograma da Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma simplificado do processo de produção de D-Tagatose.



FONTE: Elaborada pela autora.

Em 2007, a Nutrilab, uma subsidiária belga da empresa Damhert, iniciou a produção enzimática de D-Tagatose utilizando a enzima L-arabinose isomerase (L-AI) como catalisador. No entanto, os custos de produção ainda limitam o uso de D-Tagatose (BOUDEBBOUZE; MAGUIN; RHIMI, 2011). Diante disso, há a necessidade de tornar a produção de D-Tagatose mais viável economicamente.

2.2 L-arabinose isomerase: características e aplicações.

L-arabinose isomerase (L-AI; EC 5.3.1.4) é uma enzima intracelular capaz de catalisar reversivelmente a reação de isomerização de L-arabinose em L-ribulose. Essa enzima também é comumente conhecida como D-Galactose isomerase devido a sua capacidade de isomerizar, *in vitro*, D-Galactose em D-Tagatose (RHIMI et al., 2009; XU et al., 2011).

Diversos estudos mostram que a L-arabinose isomerase utilizada no processo de produção de D-Tagatose pode ser obtida a partir de vários microrganismos mesófilos, termofílicos e hipertermofílicos, dentre os quais pode-se citar cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus halodurans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Thermus sp.* IM6501, (PATEL et al., 2017a; WANARSKA; KUR, 2012). Mais de 30 tipos de L-AI foram identificados e caracterizados, e aproximadamente metade destes foram relatados nos últimos 05 anos (XU et al., 2018). A Tabela 1 a seguir apresenta alguns microrganismos nos quais a L-AI pode ser obtida.

A maioria das L-arabinose isomerases conhecidas necessitam de íons metálicos bivalentes, tais como, Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , sendo o Mn^{2+} e o Co^{2+} , os metais que possuem um maior efeito sobre a produção de D-Tagatose, aumentando significativamente a atividade e estabilidade térmica (JUNG; KIM; OH, 2005; MANZO et al., 2013; RHIMI; BEJAR, 2006; SOUSA, 2015). Os íons metálicos desempenham um papel importante, pois permitem a atividade catalítica e melhoram a estabilidade estrutural das L-AIs (XU et al., 2018).

Tabela 1 – Exemplos de microrganismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos capazes de produzir a L-Arabinose Isomerase.

	Microrganismos	Referência	
Mesófilos	<i>Escherichia coli</i>	(YOON; KIM; OH, 2003)	
	<i>Bacillus halodurans</i>	(LEE et al., 2005a)	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(CHOUAYEKH et al., 2007)	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(XU et al., 2011)	
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ,	(LEE et al., 2005b)	
	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	(KIM; OH, 2005)	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> US100	(RHIMI; BEJAR, 2006)	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> IAM11001	(CHENG; MU; JIANG, 2010)	
	Termófilos	<i>Alicyclobacillus Acidocaldarius</i>	(LEE et al., 2005b)
		<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	(LI et al., 2011)
<i>Thermus sp. IM6501</i>		(YOON; KIM; OH, 2003)	
<i>Acidothermus cellulolytics</i>		(CHENG et al., 2010)	
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>		(JØRGENSEN; HANSEN; STOUGAARD, 2004)	
<i>Thermoanaerobacter</i> <i>saccharolyticum</i>		(HUNG et al., 2014)	
Hipertermófilos		<i>Thermotoga neapolitana</i>	(KIM et al., 2002)
	<i>Thermotoga maritima</i>	(LEE et al., 2004)	

FONTE: Elaborada pela autora.

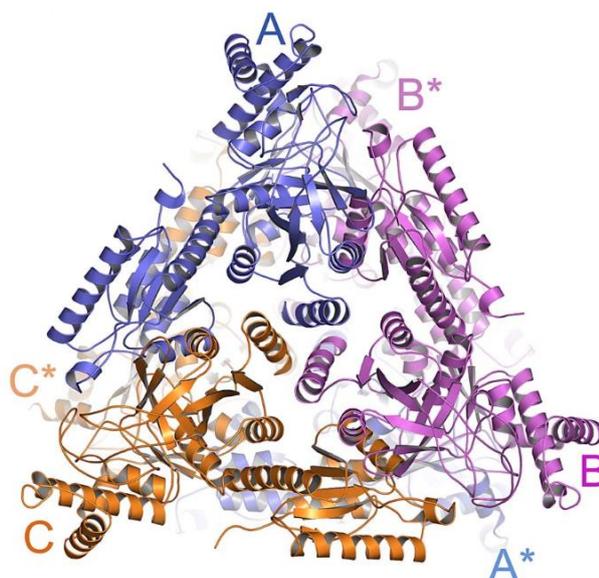
A L-arabinose isomerase (L-AI) é uma enzima não comercial, portanto, a grande maioria das L-AI são recombinantes, produzidas artificialmente a partir de genes clonados na tentativa de selecionar as melhores linhagens produtoras de L-AI envolvendo a expressão recombinante dos genes L-AI em hospedeiros favoráveis (CHOUAYEKH et al., 2007; JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017; LI et al., 2011; LIANG et al., 2012; SOUSA, 2015).

De acordo com Xu e colaboradores (2018), espera-se que a enzima L-AI se torne a segunda aldose isomerase mais adequada para aplicação industrial assim como a D-xilose isomerase (XU et al., 2018).

Vários estudos mostram que *Escherichia coli* expressando L-AI, originária de outras cepas bacterianas, tem sido usada como hospedeira para produção de D-Tagatose (CHENG; MU; JIANG, 2010; LI et al., 2011; SHIN et al., 2016; XU et al., 2011).

A *Escherichia coli* é considerada um hospedeiro dominante na produção de proteínas recombinantes por possuir uma produção protetora vantajosa, rápida, barata e de alto rendimento, assim como uma genética bem caracterizada e variedade de ferramentas moleculares disponíveis (COSTA et al., 2014; DEMAIN; VAISHNAV, 2011; FELIX, 2018). A Figura 3 a seguir, mostra a representação da superfície molecular da L-Arabinose isomerase de *Escherichia coli* (ECAI).

Figura 3 - Representação da estrutura molecular da ECAI.



FONTE: MANJASETTY E CHANCE (2006)

A ECAI possui uma arquitetura hexamérica (dímero de trímeros), em cada trímero os monômeros estão representados por cores diferentes, conforme visto na Figura 3. A unidade assimétrica da ECAI apresenta três subunidades que exibem estruturas gerais essencialmente idênticas e que estão relacionadas por simetria, assumindo a forma de triângulo equilátero.

A superfície externa do trímero aponta resíduos nas fendas entre as interfaces das subunidades adjacentes coincidindo com as três interfaces, localizados nas regiões de loops possibilitando ajustes estruturais que modulam a geometria da entrada do substrato no sítio ativo (FELIX, 2018; MANJASETTY; CHANCE, 2006).

A enzima utilizada neste estudo foi produzida através do auxílio da engenharia genética, onde o gene produtor da enzima L-AI contido na cepa de *Enterococcus faecium* foi expresso em *Escherichia coli*, BL21.

Apesar da L-arabinose isomerase ser a enzima mais viável para produção de D-Tagatose a partir de D-Galactose pela via enzimática, a taxa de conversão dessa reação não é alta o suficiente para escala comercial (CHOI et al., 2016). Por isso, além do estudo das técnicas de engenharia genética visando aumentar a seletividade e a produtividade da L-AI, se faz necessário também a avaliação das condições operacionais da reação de isomerização.

2.3 Equilíbrio químico: reação enzimática e condições do meio que alteram a velocidade de reação

Equilíbrio químico é o estado de um sistema reacional no qual não ocorrem variações na composição do mesmo ao longo do tempo. Portanto, a reação química atinge o equilíbrio quando as velocidades das reações direta e inversa se igualam, e as concentrações dos reagentes e produtos permanecem inalteradas (PAULA, 2018). Porém, esse estado de equilíbrio é vulnerável a alguns fatores que podem alterar uma dessas velocidades e, conseqüentemente, modificar as concentrações de reagentes e/ou produtos, provocando o deslocamento do equilíbrio (PAULA, 2018).

De acordo com Schmidell e colaboradores (2001) uma reação química pode ser analisada quanto à sua termodinâmica ou à sua cinética. A termodinâmica estuda a viabilidade e a reversibilidade das reações, partindo das análises de energia e dos estados

inicial e final de uma transformação. Porém, nada informa sobre a velocidade com que a transformação ocorre. Essa informação é fornecida pela cinética. Nos parâmetros termodinâmicos, os organismos não podem interferir, sua intervenção se dá exclusivamente sobre o aspecto cinético, ou seja, sobre a velocidade das reações (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001).

A velocidade das reações pode ser explicada pela teoria das colisões que estabelece que, para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir entre si e que a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir um estado reativo, chamado estado de transição. Essa quantidade de energia é definida como energia de ativação (SCHMIDELL et al., 2001).

Ainda segundo Schmidell e colaboradores (2001) a redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de catalisadores. Os catalisadores biológicos são proteínas chamadas enzimas e as reações catalisadas por enzimas têm velocidades muito altas, entre 10^6 a 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas e algumas ordens de grandeza maiores que as reações catalisadas por catalisadores inorgânicos (LIMA et al., 2001).

A estrutura e a forma dos sítios ativos da enzima podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica, tornando assim, a atividade enzimática dependente do meio no qual a enzima se encontra, destacando o pH e temperatura (LEHNINGER, 2002).

2.3.1 Efeito do pH

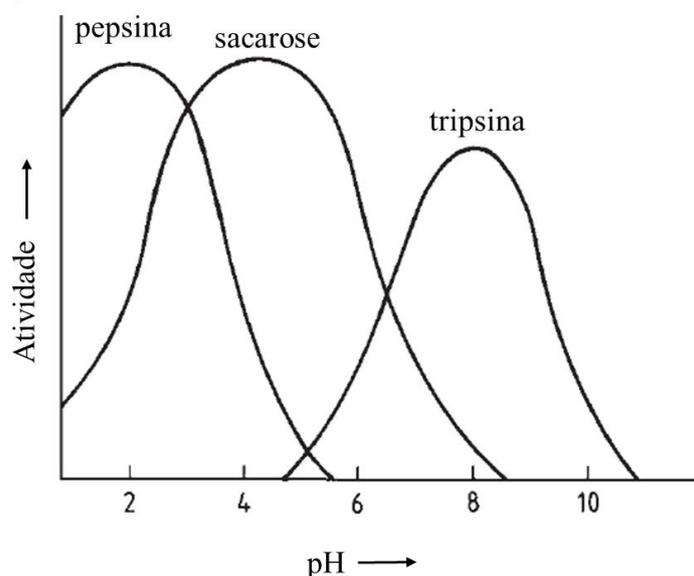
A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima, no qual a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima. A influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Existe uma concentração hidrogreniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico (LOURENÇO, 2004; SCHMIDELL et al., 2001).

Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga. A eficiência da catálise dependerá de encontrarem-

se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir sua interação (FURLONG, 2000; SCHMIDELL et al., 2001).

Todas as enzimas possuem um intervalo no qual o pH é ótimo e favorece a atividade enzimática. O ponto ótimo não depende somente do pH, mas também da força iônica e do tipo de tampão utilizado (AEHLE, 2007). A Figura 4 a seguir mostra alguns exemplos do perfil da atividade enzimática em função do pH.

Figura 4 - Representação do perfil da atividade catalítica de algumas enzimas em função do pH.



FONTE: Adaptado de Aehle, 2007.

2.3.2 Efeito da temperatura

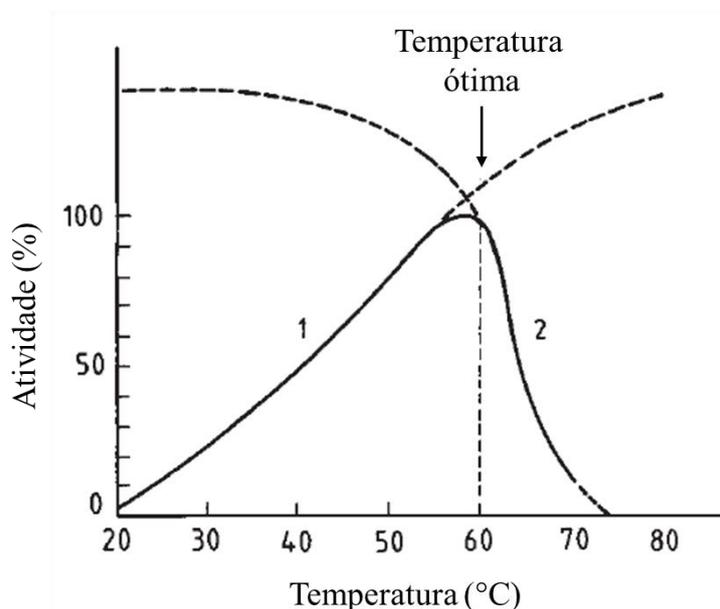
A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: em princípios, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas (NASCIMENTO, 2010; SCHMIDELL et al., 2001)

Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura dimensional. A temperatura que provoca desnaturação varia para cada enzima,

mas comumente, está pouco acima de sua temperatura ótima (LEHNINGER, 2002; SCHMIDELL et al., 2001).

Segundo Aehle (2007) a dependência da velocidade de reação com a temperatura forma um ponto ótimo porque a temperatura favorece o efeito da termodinâmica sobre a reação aumentando a taxa de reação, como mostrado na linha 1 na Figura 4, porém esse aumento é seguido de uma queda devido a desnaturação da enzima, como mostrado na linha 2 na Figura 5. A temperatura ótima geralmente ocorre entre 40 e 60 °C (AEHLE, 2007).

Figura 5- Representação da temperatura ótima para a atividade da enzima.



FONTE: Adaptado de Aehle, 2007.

2.3.3 Parâmetros termodinâmicos

Vários critérios podem ser estabelecidos para descrever um sistema em equilíbrio. A primeira e segunda lei da termodinâmica indicam que um sistema tende a caminhar para um estado de mínima energia e máxima entropia. Estas condições devem ser, portanto, satisfeitas para um sistema atingir o equilíbrio.

Para a reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose, pode-se considerar que alcançou-se o equilíbrio quando a produção de D-Tagatose não mostra alterações significativas na concentração ao longo do tempo para uma dada temperatura.

Considerando, a reação em uma única etapa, a constante de equilíbrio K_{eq} , pode ser calculada através da equação:

$$K_{eq} = \frac{[Tag]_{eq}}{[Galac]_{eq}} \quad (1)$$

Onde: K_{eq} é a constante de equilíbrio, $[Tag]_{eq}$ e $[Galac]_{eq}$ são as concentrações de D-Tagatose e D-Galactose, respectivamente, no equilíbrio.

A constante de equilíbrio K_{eq} pode ser calculada em várias temperaturas. A dependência de K_{eq} em reação a temperatura pode ser expressa de acordo com a equação de van't Hoff como:

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

Onde: ΔH é a variação de entalpia de van't Hoff ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$), ΔS é a variação de entropia ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), R é a constante dos gases ($8,3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

A variação da energia livre de Gibbs para uma reação ocorrendo em condições diferentes das condições padrões, pode ser determinada por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Deve-se perceber que uma mistura reacional tem uma tendência espontânea a evoluir no sentido da diminuição da energia livre de Gibbs. O estado de equilíbrio corresponde a um valor mínimo para ΔG . A espontaneidade de um processo pode ser avaliada através da variação da energia livre que acompanha o processo.

3 METODOLOGIA

Toda a parte experimental deste trabalho foi realizada nos laboratórios pertencentes ao GpBio – Grupo de pesquisa em processos biotecnológicos, localizados no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

3.1 Produção da L-AI e obtenção do extrato enzimático

3.1.1 *Micro-organismo*

A cepa utilizada neste estudo foi produzida através do auxílio da engenharia genética, onde o gene produtor da enzima L-AI contido na cepa de *Enterococcus faecium* foi expresso em *Escherichia coli*, BL21. Os trabalhos de clonagem e expressão foram realizados em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia-LemBiotech da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a Universidade Nacional do Litoral (UNL), em Santa Fé, Argentina.

3.1.2 *Preparo do Inóculo*

O meio de cultura Luria-Bertani, LB, (composição por litro: 10g tripton, 5g extrato de levedura e 5g NaCl) com pH ajustado para 7,0 foi utilizado para o crescimento celular. O mesmo foi esterilizado em autoclave à 121°C por 15 minutos. Em seguida, com o meio de cultura em temperatura ambiente, adicionou-se o antibiótico adequado para a seleção das bactérias transformadas, a ampicilina, com concentração final de 100µg/mL. As células cresceram em 10 mL LB+Ampicilina e mantidas sob agitação em agitador orbital (Tecnal – TE 422) a 37 °C e 200 rpm overnight (O/N) em frasco Erlenmeyer de 50 mL.

3.1.3 *Condições de cultivo*

Após o período de crescimento das células, 5 mL da cultura O/N foram transferidos e inoculados em frasco Erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultura

LB+Ampicilina. Incubados a 37 °C, 200 rpm até atingir a DO₆₀₀ entre 0,8 - 1,0. A indução foi realizada adicionando ao meio IPTG (Isopropil-1-thio-β-D-galactopiranosídeo) com concentração final de 0,5 mM. Após a adição do indutor, a incubação foi mantida a 20 °C, 200 rpm por 16 h.

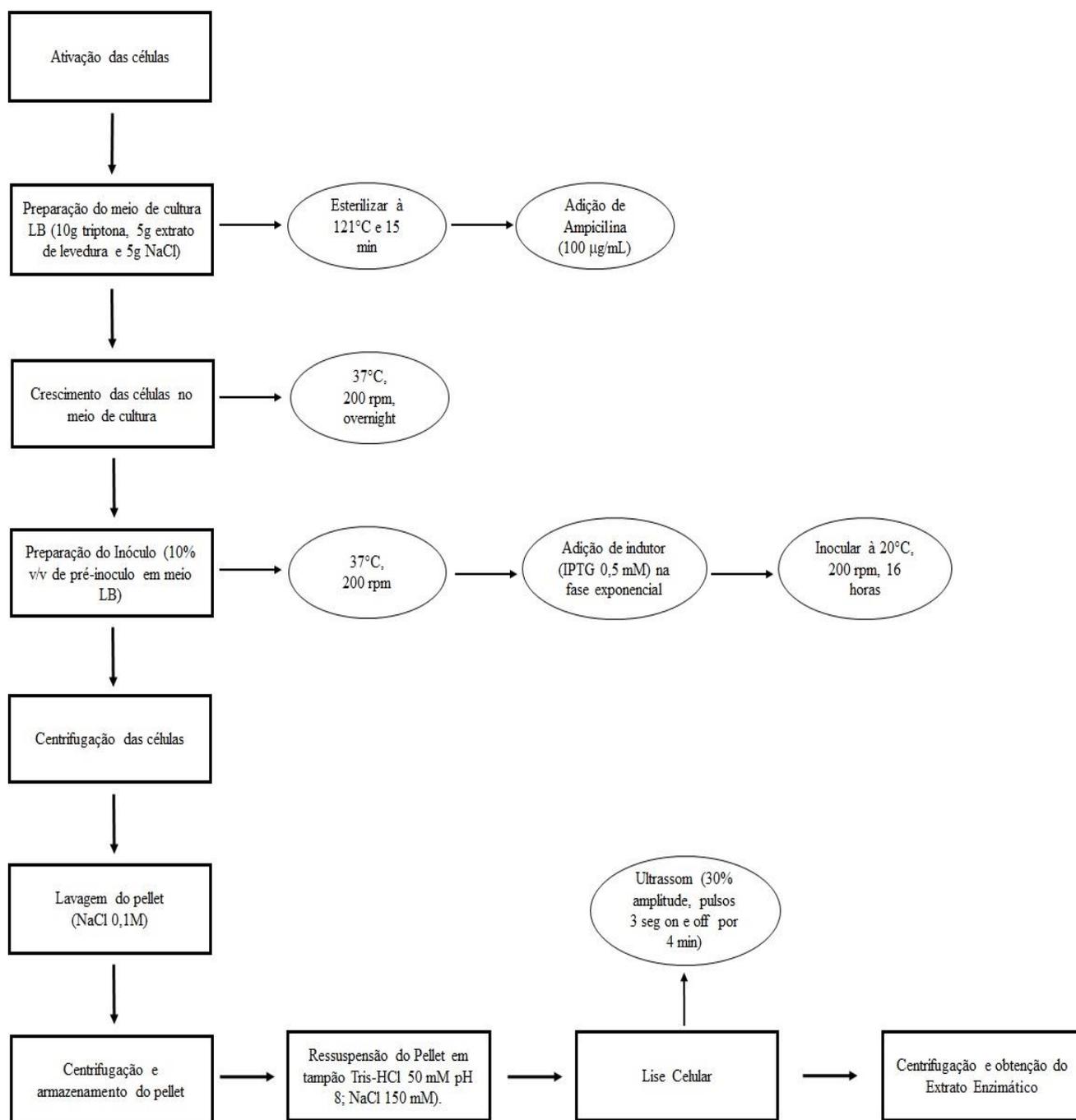
Em seguida, as células foram centrifugadas a 7000g, 4 °C por 30 min. O pellet foi lavado com solução de NaCl 0,1M e em seguida centrifugadas novamente a 7000g, 4 °C por 30 min. O pellet foi armazenado em freezer a -80°C.

3.1.4 Preparo do extrato enzimático

Para realizar a lise celular, o pellet foi ressuscitado no tampão de ressuspensão, Tris-HCl 50 mM pH 8 suplementado com NaCl 150 mM. As células foram submetidas à sonicação em gelo utilizando ponteira ultrassônica com amplitude de 30%, pulsos de 03 segundos on e 03 segundos off por um tempo de 04 minutos. Repetiu-se o processo 04 vezes. Após a lise celular, centrifugou-se o lisado por 15000 g, 4 °C por 30 min. Filtrou-se o sobrenadante em membrana 0,45 μm e o mesmo foi armazenado em geladeira.

A Figura 6 a seguir mostra a representação do processo de produção da enzima L-AI e obtenção do extrato enzimático.

Figura 6 - Fluxograma do processo de produção do extrato enzimático.



FONTE: Elaborada pela autora.

3.2 Caracterização do extrato enzimático

3.2.1 *Quantificação de proteínas*

A concentração de proteína presente no extrato enzimático foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford, usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

3.2.2 *Análise de massa molar*

As eletroforeses se realizaram em géis de acrilamida (SDS-PAGE) em condições de desnaturação na presença de SDS de acordo com o método de Schagger e Jagow (1987), que utiliza tricina como íon carreador para separar proteínas muito pequenas. As proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Blue G-250 (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). As amostras foram preparadas por desnaturação com 1% de SDS, 2,5% de mercaptoetanol, a 100 °C durante 10 minutos.

3.2.3 *Atividade do extrato enzimático*

A determinação da atividade enzimática da L-AI seguiu a metodologia de (HUNG et al., 2014). Utilizou-se como substrato uma solução de D-Galactose 500 nM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 suplementado com $MnCl_2$ 0,01M. As amostras contendo 0,4 mL de substrato e 0,1 mL de extrato enzimático foram incubadas a 50 °C por 1h. A quantidade de D-Tagatose foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método ácido sulfúrico cisteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. A curva de calibração utilizada encontra-se no Apêndice A.1. Uma unidade (U) de atividade da L-AI foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de D-Tagatose em 01 minuto nas condições de ensaio.

A atividade enzimática da enzima pode ser escrita conforme a Equação 4:

$$AE_{(U/mL)} = \frac{[TAG]_{(mM)} * Vr_{(mL)}}{Ve_{(mL)} * t_{(min)}} \quad (4)$$

Onde AE é a atividade enzimática (U. mL⁻¹) para a enzima livre, [TAG] é a concentração de D-Tagatose (mM), obtida através da curva calibração de D-Tagatose, Vr é o volume de reação (mL), Ve é volume de enzima (mL) e t é o tempo de reação (min).

3.2.4 Concentração do extrato enzimático

O extrato enzimático obtido como descrito no item 4.1.4 deste trabalho foi concentrado utilizando tubo de filtração com membrana de celulose com corte no peso molecular de 30 kDa (sistema de concentração Amicon® Pro da Merck Millipore, Figura 7). A centrifugação foi utilizada como força motriz para a filtração. O extrato enzimático foi centrifugado a 7000 g, 4 °C por 30 min.

Para avaliar se houve a concentração do extrato enzimático foram feitas a quantificação de proteínas, análise de massa molar e cálculo da atividade enzimática para amostras do extrato enzimático antes da filtração, filtrado e do concentrado.

Figura 7 – Sistema de concentração Amicon®Pro Merck Millipore.



FONTE: Elaborada pela autora.

3.3 Estudo da reação de conversão de D-Galactose em D-Tagatose

A reação enzimática foi realizada em batelada utilizando como substrato uma solução de D-Galactose 500 mM em tampão acetato de sódio suplementado com MnCl_2 0,01 M. A relação entre quantidade de substrato e atividade enzimática foi mantida constante em cada ensaio realizado, ou seja, a quantidade de extrato enzimático utilizado foi constante. A reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose ocorreu em temperatura constante por um período de 72 horas, na qual foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados para avaliar a conversão à medida que a reação ia ocorrendo. Todos os ensaios foram realizados em duplicada.

3.3.1 *Ensaio preliminares: efeito da temperatura na reação*

Tendo em vista analisar o comportamento da reação enzimática frente à diferentes temperaturas e determinar o intervalo que favorece a reação, ensaios preliminares foram realizados. Os ensaios ocorreram como descritos no item 3.4. deste trabalho nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. A concentração de D-Tagatose produzida foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*high performance liquid chromatography*), utilizando cromatógrafo equipado com detector de índice de refração e com a coluna Rezex™ RCM –Monossacarídeos Ca^{2+} (8%). Água ultrapura foi utilizada como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹, 85 °C e volume de injeção de 20 µL.

3.3.2 *Planejamento Experimental*

Após a realização dos ensaios preliminares, com a finalidade de otimizar a produção de D-Tagatose por processos biológicos, realizou-se um planejamento experimental para analisar e encontrar as melhores condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato que promovem a maior conversão de D-Galactose em D-Tagatose.

O planejamento experimental escolhido foi do tipo 2^3 com 3 repetições no ponto central. A Tabela 2 abaixo mostra o planejamento experimental com os níveis naturais e as condições nas quais os experimentos foram realizados.

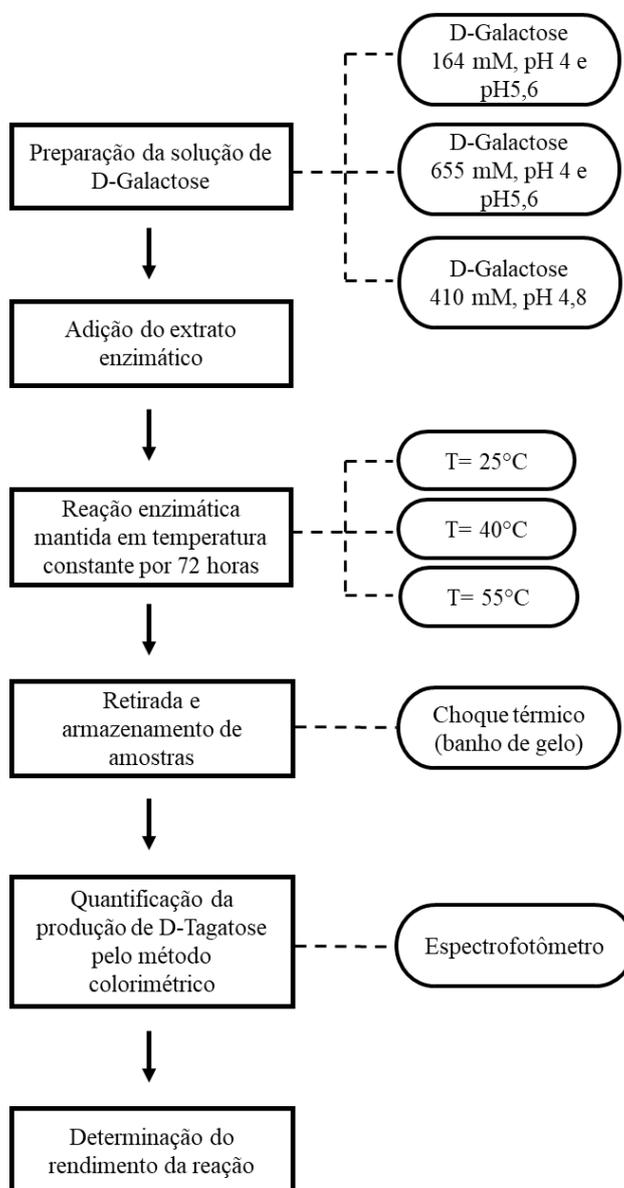
Tabela 2 – Planejamento Experimental com os fatores e níveis naturais.

Experimento	Tratamento	Efeito Fatorial		
		Temperatura (°C)	Concentração de Galactose (mM)	pH
1	0	25	164	4
2	Temp	55	164	4
3	Conc	25	655	4
4	Temp*Conc	55	655	4
5	pH	25	164	5,6
6	Temp*pH	55	164	5,6
7	Conc*pH	25	655	5,6
8	Temp*Conc*pH	55	655	5,6
9	Pto central	40	410	4,8
10	Pto central	40	410	4,8
11	Pto central	40	410	4,8

FONTE: Elaborada pela autora.

A quantidade de D-Tagatose produzida foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método ácido sulfúrico cysteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Após quantificada a D-Tagatose, pode-se então determinar o rendimento da reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose. A Figura 9 a seguir mostra o fluxograma do processo de obtenção da D-Galactose.

Figura 8 – Fluxograma representativo do processo de produção da D-Tagatose a partir da reação de isomerização da D-Galactose por rota enzimática.



FONTE: Elaborada pela autora.

O rendimento da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose foi determinado através da razão entre a quantidade de produto obtido e a quantidade que teoricamente seria obtida (conversão reacional de 100%). O rendimento pode ser obtido como descrito na Equação 5 abaixo:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{[Tag]}{[Galac]_{inicial}} * 100 \quad (5)$$

Onde: $[Tag]$ é a concentração de D-Tagatose produzida (mM) e $[Galac]_{inicial}$ é a concentração inicial de D-Galactose (mM) utilizada como substrato.

Após determinadas as condições ótimas nas quais ocorre o maior rendimento da reação de isomerização, realizou-se alguns testes em condições alternativas com o objetivo de aumentar a produção de D-Tagatose. Os testes realizados são descritos a seguir.

3.4 Curva de solubilidade da D-Galactose

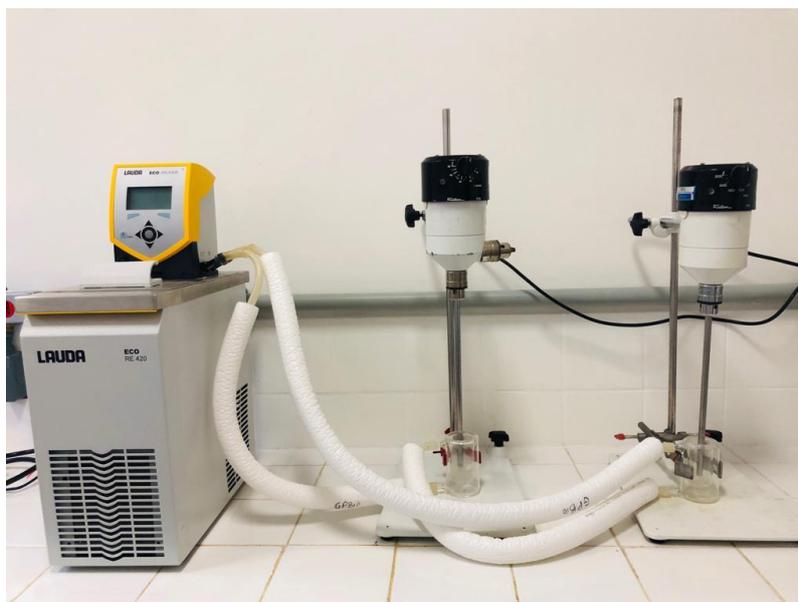
A curva de solubilidade da D-Galactose foi determinada com o intuito de investigar a concentração máxima de D-Galactose que pode ser obtida a partir do soro de leite. O procedimento para a obtenção dos pontos da curva de solubilidade consistiu na adição de uma pequena quantidade de massa de soluto a um reator de vidro encamisado, provido de agitador tipo hélice, contendo uma solução de soro de leite na concentração de 5 g.L^{-1} . Ao adicionar a massa, a temperatura do sistema foi mantida constante e deixou a mistura em agitação por um tempo de 20 minutos ou até total dissolução dos cristais de soluto na solução. Repetiu-se o processo de adição de soluto na solução até alcançar o ponto de saturação para aquela determinada temperatura.

Uma vez atingida a saturação, aumentava-se a temperatura e repetia-se o procedimento até a solução ficar novamente saturada. A curva de solubilidade foi avaliada no intervalo de temperatura de 5 a 75 °C, variando de 10 em 10 °C.

A quantidade de massa adicionada para cada temperatura foi anotada. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A partir destes dados, os pontos das curvas experimentais foram plotados e a curva foi traçada.

A Figura 8 a seguir mostra o sistema utilizado para a realização do estudo da solubilidade.

Figura 9 – Sistema utilizado para a realização dos ensaios de solubilidade.



FONTE: Elaborada pela autora.

3.5 Efeito do ultrassom

A cavitação gerada pelo ultrassom é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases, promovendo assim, a ativação de reações químicas (SANTOS, 2009). Neste contexto, o uso do ultrassom foi incorporado com intuito de avaliar o efeito do mesmo no equilíbrio da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose.

A reação enzimática foi realizada em batelada em banho ultrassônico (Figura 10). Uma solução de D-Galactose em tampão acetato de sódio 50 mM suplementado com $MnCl_2$ 0,01 M foi utilizada como substrato e a reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose ocorreu em temperatura constante ($55^\circ C$) por um período de 6 horas. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados. As condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato utilizadas foram obtidas através do planejamento experimental como descrito no item 3.4.2 deste trabalho.

Figura 10 – Banho ultrassônico.



FONTE: Elaborada pela autora.

3.6 Efeito da concentração do extrato enzimático

Com o propósito de verificar se a concentração da enzima influencia na produção de D-Tagatose, realizou-se um novo teste de conversão. A reação enzimática foi realizada em batelada em banho termostático utilizando como substrato uma solução de D-Galactose em tampão acetato de sódio 50 mM suplementado com $MnCl_2$ 0,01 M nas condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato obtidas no planejamento experimental como descrito no item 3.5.2 deste trabalho. A reação foi mantida em temperatura constante ($55^{\circ}C$) por um período de 24 horas, no qual foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados.

3.7 Reuso do extrato enzimático

Alguns ensaios foram feitos com o propósito de avaliar a reutilização do extrato enzimático. A reação enzimática foi realizada em batelada em banho termostático utilizando como substrato uma solução de D-Galactose em tampão acetato de sódio 50 mM suplementado com $MnCl_2$ 0,01 M. As condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato utilizados na reação enzimática foram obtidas através do planejamento

experimental como descrito no item 3.5.2. deste trabalho. A reação foi mantida em temperatura constante de 55°C por um período de 24 horas. Ao fim da reação uma amostra foi retirada para determinação da quantidade de D-Tagatose produzida.

A enzima foi capturada através de filtração com membrana de celulose com corte no peso molecular de 30 kDa.

Iniciou-se uma nova reação enzimática utilizando como extrato enzimático a enzima capturada na filtração. A nova reação também foi mantida em temperatura constante de 55°C por um período de 24 horas. Ao fim da reação uma amostra foi retirada e em seguida determinou-se a quantidade de D-Tagatose produzida através do método colorimétrico.

3.8 Efeito do tampão borato

Borato $[B(OH)_4^-]$ tem sido usado visando aumentar o rendimento das reações enzimáticas de isomerização para a produção de cetoses (KIM et al., 2008; KIM; KIM; OH, 2013; LIM; KIM; OH, 2007; ZHANG; JEYA; LEE, 2010). Além disso, borato mostrou formar um complexo mais forte com a D-Tagatose do que com a D-Galactose (SALONEN et al., 2013).

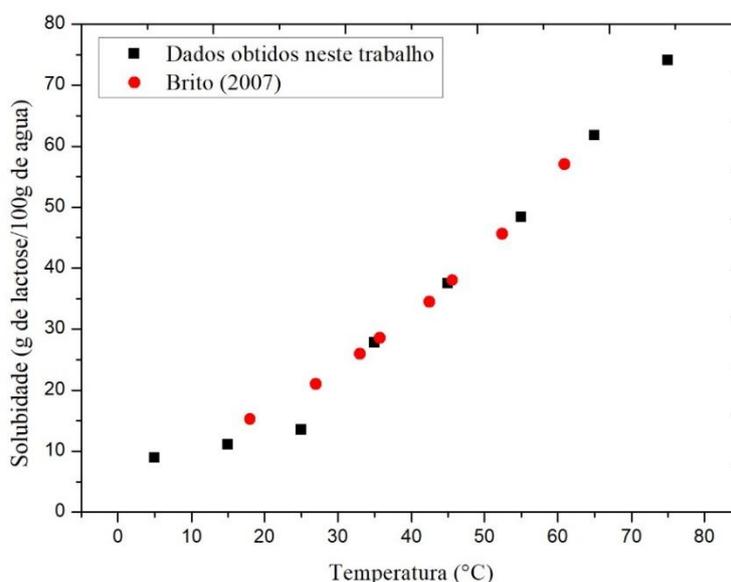
Com a finalidade de analisar o efeito do tampão borato na produção de D-Tagatose, realizou-se a reação na presença de tampão borato. A solução de D-Galactose 164 mM utilizada na reação foi feita em tampão borato 595 mM, pH 7,95 e suplementada com $MgCl_2$ 5mM. A reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose ocorreu em temperatura constante de 55 °C por um período de 72 horas, na qual foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados. A concentração de D-Tagatose produzida foi determinada através do método colorimétrico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Curva de solubilidade da D-Galactose

Não foi possível encontrar dados na literatura sobre a solubilidade da D-Galactose em soro de leite e para a solubilidade em água só foi possível obter dados para um pequeno intervalo de temperatura. Então, com a finalidade de comparar os dados experimentais obtidos e validar o método utilizado realizou-se a curva de solubilidade da lactose em água, uma vez que é possível encontrar vários estudos sobre a solubilidade da lactose. A Figura 11 a seguir mostra a comparação dos dados obtidos neste trabalho com os resultados descritos por Brito (2007).

Figura 11 – Curva de solubilidade da lactose comparando os dados experimentais (■) com os dados obtidos por Brito (2007) (●).



FONTE: Elaborada pela autora.

Pode-se perceber, a partir da análise da Figura 11, que os dados obtidos neste trabalho se assemelham aos resultados descritos por Brito (2007), o que nos permite concluir que o método utilizado para obtenção das curvas de solubilidades é eficaz e consegue descrever o comportamento da solubilidade, quando comparado com dados já

reportados na literatura. Dessa forma, realizou-se os experimentos para construção da curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.

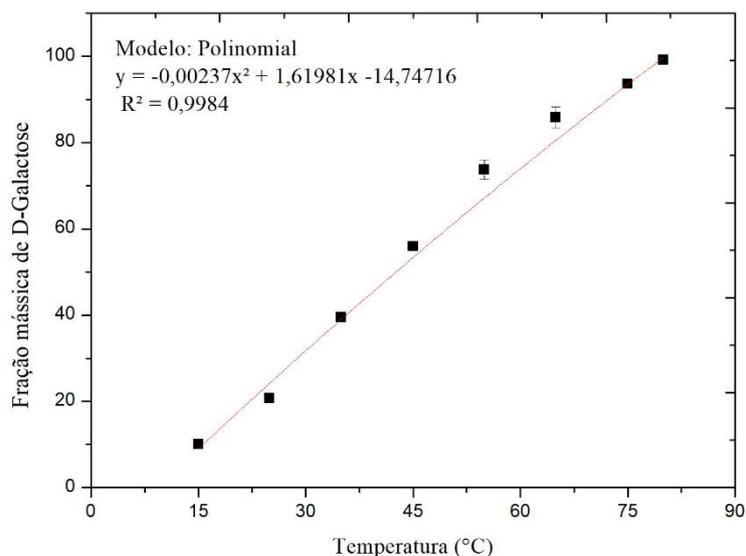
A D-Galactose, utilizada como substrato para a reação enzimática da produção de D-Tagatose, pode ser obtida através da hidrólise da lactose presente no soro de queijo. O soro de leite possui em sua composição uma concentração de lactose entre 44 e 56 g. L⁻¹.

Com o intuito de definir os limites de concentração que seriam utilizando no planejamento experimental, optou-se por partir do soro leite com alta concentração de lactose (56 g. L⁻¹). Então, considerando uma hidrólise total da lactose, na qual toda a lactose é convertida em uma mistura equimolar de glicose e galactose, temos que para o soro de leite com concentração de lactose de 56 g.L⁻¹ é possível obter uma concentração de D-Galactose de 29,55 g.L⁻¹, cerca de 164 mM, em termos de molaridade. Esse valor foi então estabelecido como o limite inferior do planejamento experimental. Para o limite superior, definiu-se uma concentração quatro vezes maior, ou seja, 117,82 g.L⁻¹ de D-Galactose ou 655 mM em termos de molaridade. Esse valor foi definido tendo como finalidade analisar se altos valores de concentração de D-Galactose conseguiriam alcançar maiores conversões, uma vez que estudos anteriores do grupo utilizando uma concentração de D-Galactose de 500 mM alcançaram resultados significantes.

Para verificar se os limites definidos anteriormente poderiam ser obtidos a partir de uma concentração do soro de leite, construiu-se a curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.

A Figura 12 a seguir apresenta o comportamento da solubilidade da D-Galactose em soro de leite e na Tabela 3 encontra-se a análise estatística da curva.

Figura 12- Curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.



FONTE: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Dados estatísticos da curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados (SQ)	Quadrado da Média (QM)	F _{calculado}	Valor-P
Modelo	2	84811,05	42405,52	600,96	1,10E-5
Erro Puro	4	282,25	70,56		
Total	6	85093,30			

FONTE: Elaborada pela autora.

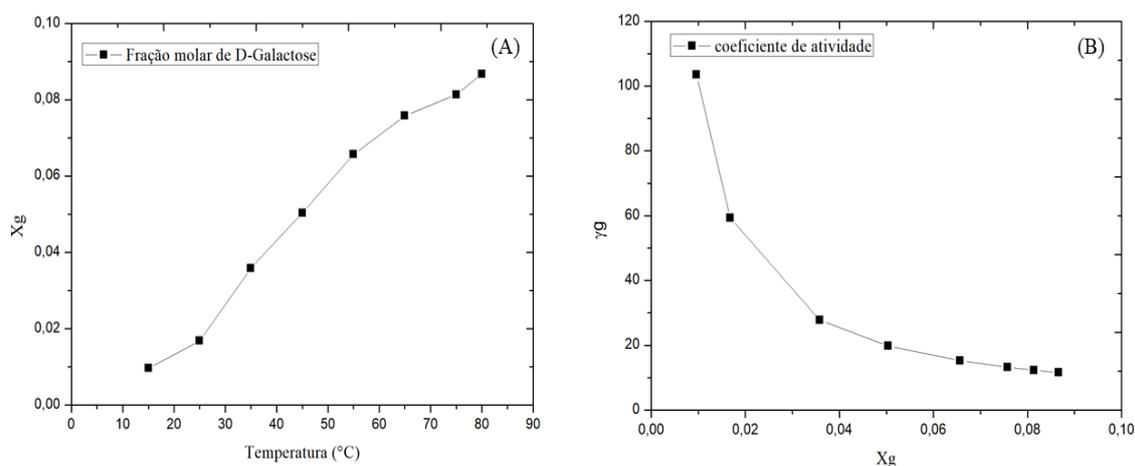
Observando os dados obtidos na Tabela 3 e na Figura 12 anteriormente apresentados, percebe-se que o gráfico é representativo, visto que o coeficiente de determinação, R^2 , é bem próximo a 1. Sabe-se que quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de determinação, tanto maior será a validade da regressão (RODRIGUES; IEMMA, 2014). A capacidade de solubilidade química de uma substância submetida à alteração de temperatura não é linear, por isso a escolha de um ajuste polinomial (MAGALHÃES, 2017). Além disso, como o valor do F é muito maior do que 1 e o valor-

P é menor do que o nível de confiança α de 5%, pode-se afirmar que há diferença significativa entre as amostras.

Pode-se ainda perceber a significância do ajuste obtido, uma vez que o valor do $F_{\text{calculado}}$ é muito maior do que o F_{tabelado} (6,944).

Pode-se também representar a solubilidade através dos gráficos da fração molar e coeficiente de atividade da D-Galactose. Os dados utilizados para a construção das curvas, encontram-se no APÊNDICE A.2. A Figura 13 a seguir, mostra esses perfis.

Figura 13 – (A) fração molar e (B) coeficiente de atividade de D-Galactose em soro de leite em função da temperatura.



FONTE: Elaborada pela autora.

Percebe-se que a fração molar de D-Galactose na mistura aumenta com o aumento da temperatura, o que indica que a solubilidade é favorecida. Além disso, a Figura 13 mostra que a curva para o coeficiente de atividade da D-Galactose na mistura segue um comportamento esperado. O coeficiente de atividade indica quanto o sistema se afasta da idealidade. No começo tem-se um alto valor do coeficiente de atividade visto que nesta conformação, normalmente a não idealidade do soluto é máxima, já que uma molécula do soluto está completamente envolvida pelas moléculas do solvente. Esse desvio da idealidade diminui ao passo que a quantidade de soluto aumenta na mistura.

4.2 Caracterização do extrato enzimático

Com o objetivo de analisar o extrato enzimático obtido com a produção da L-AI, determinou-se os parâmetros: atividade e atividade específica, quantidade de proteína e massa molecular. A Tabela 4 e a Figura 14 a seguir mostram os resultados obtidos.

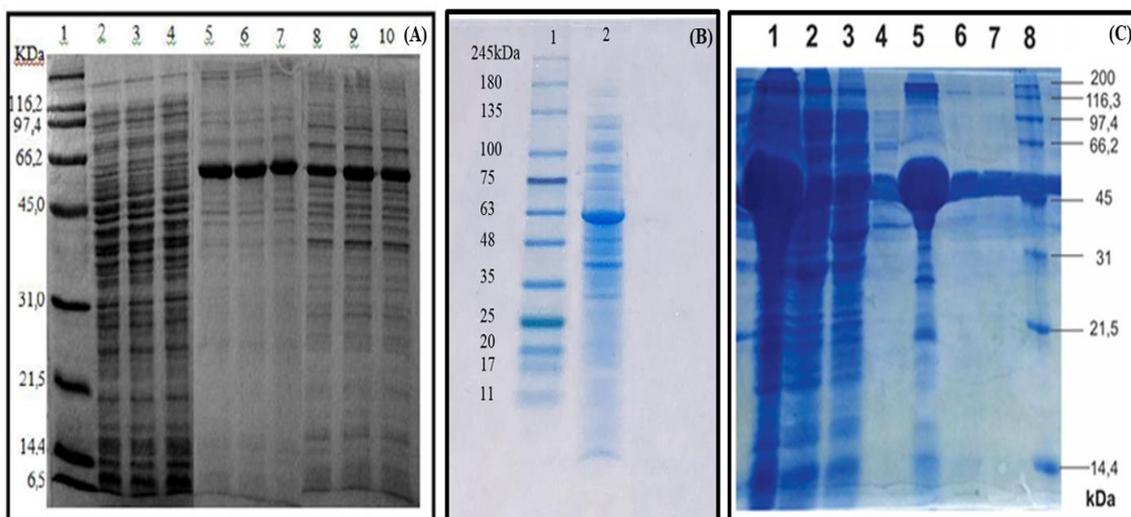
Tabela 4 – Atividade, atividade específica e concentração de proteínas do extrato enzimático produzido neste trabalho e anteriormente por membros do grupo GpBio.

Atividade (U.mL⁻¹)	Atividade Específica (U.mg⁻¹ de proteína)	Autor
1,43 ± 0,06	1,70 ± 0,74	PRÓPRIA AUTORA
-	0,75	MANZO et al., 2019
3,01	0,097	SOUSA, 2015
1,03	-	FELIX, 2018
2,63	0,035	FELIX, 2018

FONTE: Elaborada pela autora.

O extrato enzimático produzido possui uma alta atividade específica e atividade enzimática dentro do esperado quando comparado com resultados obtidos anteriormente por pesquisadores do grupo.

Figura 14 – Perfil eletroforético do extrato enzimático (A) produzido por Sousa (2015). 1- Padrões de peso molecular e 8, 9, 10- Extrato transformado pela cepa *E.coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo PET 29a(+) P 209 induzidas por IPTG; (B) produzido neste trabalho. 1 – Marcador de baixo peso molecular e 2 - Amostra do extrato enzimático produzido; (C) produzido por Manzo et al. (2019). 1 – Extrato bruto e 8 – Marcador padrão de peso molecular.



FONTE: Elaborada pela autora.

O extrato enzimático produzido possui características semelhantes às descritas por Manzo et al. (2019) e Sousa (2015), com bandas principais, sendo a mais significativa no peso molecular próximo a 55 KDa o que pode ser visto na Figura 14 acima. O perfil eletroforético, Figura 14, comprova que ocorreu a produção da enzima L-arabinose isomerase e que a mesma se encontra presente no extrato enzimático obtido.

4.2.1 Concentração do extrato enzimático

Com o objetivo de analisar se houve a concentração do extrato enzimático após a filtração, determinou-se os parâmetros: atividade e atividade específica, quantidade de proteína e massa molecular das amostras do extrato enzimático bruto, filtrado e concentrado. A Tabela 5 e a Figura 15 a seguir mostram os resultados obtidos.

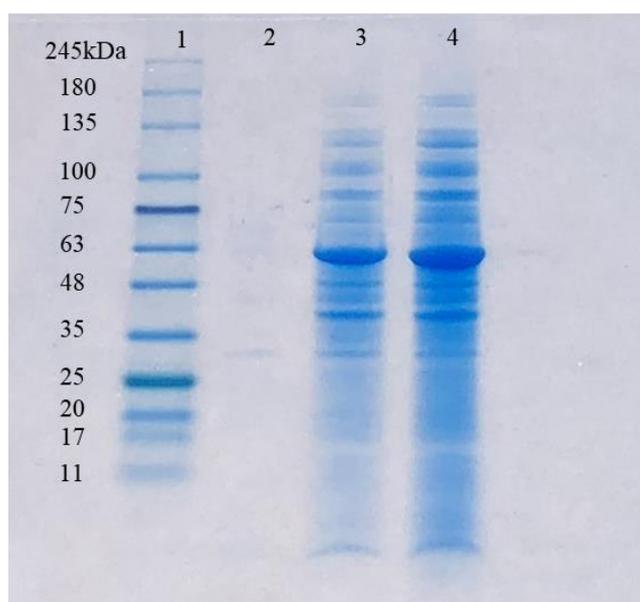
Tabela 5- Atividade enzimática, atividade específica e concentração de proteínas do extrato bruto, concentrado e filtrado.

Amostra	Atividade (U.mL⁻¹)	Concentração de proteínas (mg.mL⁻¹)	Atividade Específica (U.mg⁻¹ de proteína)
Extrato Bruto	1,27 ± 0,04	0,82 ± 0,14	1,55 ± 0,90
Concentrado	2,40 ± 0,94	2,03 ± 0,47	1,18 ± 2,02
Filtrado	0 ± 0,14	0 ± 0,05	6,25 ± 0,72

FONTE: Elaborada pela autora.

Nota-se que houve uma concentração do extrato enzimático, visto que a concentração de proteínas presentes no extrato triplicou após a filtração (Tabela 6). Essa concentração na quantidade de proteínas pode ser comprovada através dos perfis eletroforéticos das amostras do extrato enzimático antes e após filtração apresentado na Figura 15 a seguir.

Figura 15 – Perfil eletroforético. 1- Marcador; 2 – Extrato enzimático filtrado; 3 – Extrato enzimático bruto e 4 – Extrato enzimático concentrado.



FONTE: Elaborada pela autora.

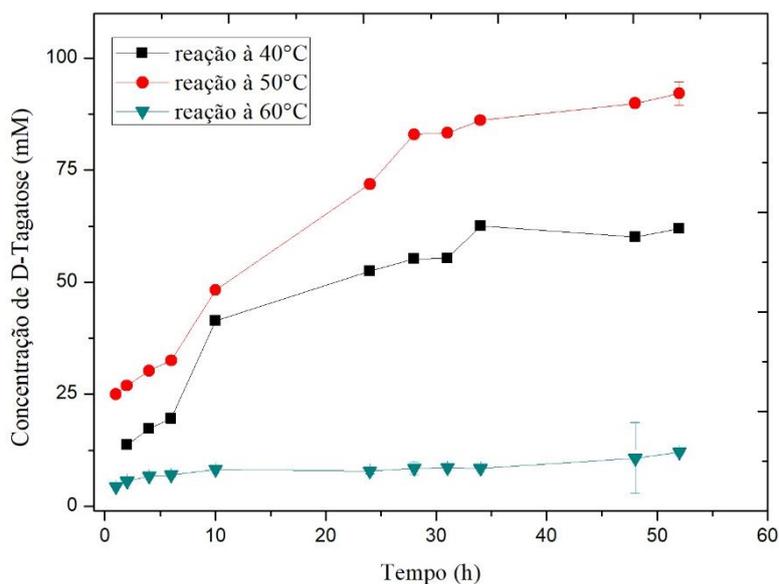
Pode-se observar que as bandas estão mais intensas no poço 4, quando comparadas com o poço 3, o que caracteriza a concentração das proteínas presentes no extrato enzimático. Já no poço 2, nota-se a praticamente ausência de proteínas nas bandas, o que significa que o filtrado é composto basicamente por solução aquosa. Além disso, percebe-se que essa concentração favoreceu a atividade enzimática, uma vez que a mesma praticamente dobrou de valor (Tabela 6).

4.3 Reação de conversão de D-Galactose em D-Tagatose

4.3.1 Estudos preliminares: efeito da temperatura na reação enzimática

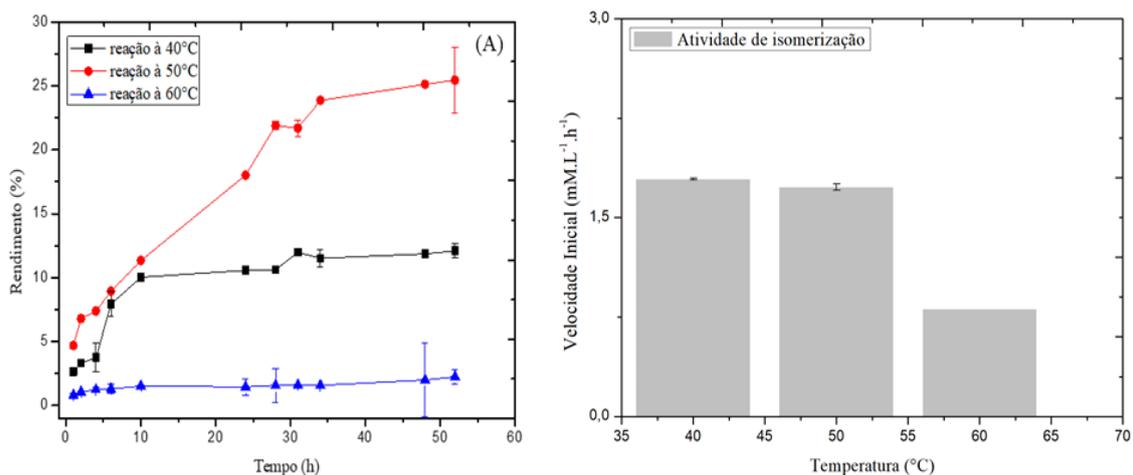
Com o intuito de verificar a influência da temperatura na reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose, realizou-se ensaios variando a temperatura na qual a reação era mantida. O perfil de produção de D-Tagatose para cada ensaio pode ser visto na Figura 16 a seguir. O rendimento e a atividade de isomerização para os ensaios preliminares são apresentados na Figura 17.

Figura 16 – Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para as reações ocorrendo a 40 °C (■), 50 °C(●) e 60 °C(▼). Reação ocorrendo com concentração de substrato 500 mM e pH 5,6.



FONTE: Elaborada pela autora.

Figura 17 - (A) Rendimento obtido para as reações ocorrendo a 40 °C (■), 50 °C(●) e 60 °C(▲) e (B) atividade de isomerização para as reações a 40, 50 e 60°C.



FONTE: Elaborada pela autora.

Nota-se que para a reação mantida a 60 °C, a enzima desnatura devido alterações sofrida em sua estrutura dimensional ocorridas com o aumento da temperatura,

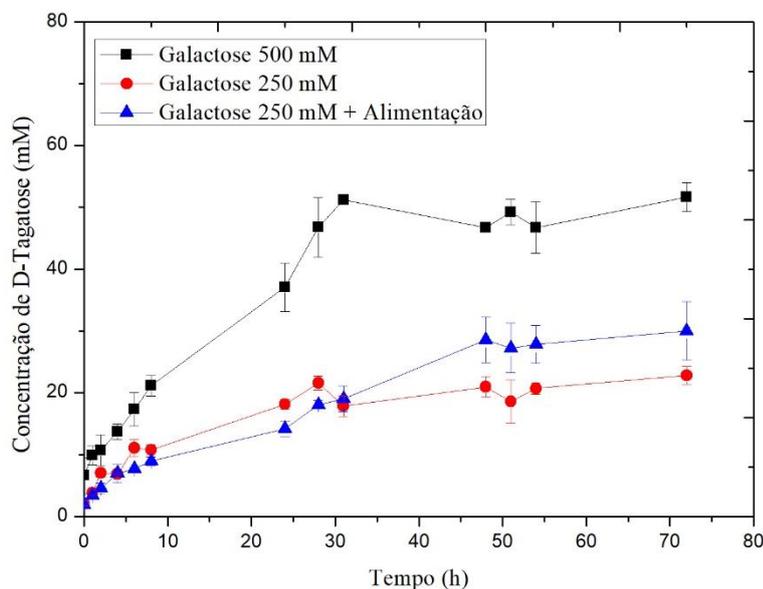
fazendo com que a enzima perca sua atividade catalítica e assim, proporcionando uma baixa conversão de D-Galactose em D-Tagatose (Figura 16). Ainda analisando a Figura 16, pode-se perceber que o aumento da temperatura favorece a reação, tendo uma temperatura ótima, na qual a produção de D-Tagatose atinge o seu máximo, porém após esse ponto, o aumento da temperatura leva a uma desnaturação da enzima, diminuindo a formação de produtos. Portanto, existe um intervalo de temperatura no qual obtêm-se uma melhor atividade catalítica da enzima.

A perda da atividade enzimática para a reação mantida a 60 °C pode ser confirmada através da baixa atividade de isomerização, obtendo também um baixo rendimento, como pode ser visto nas Figuras 17 (A) e (B).

Além disso, a Figura 17 (A) indica que o equilíbrio é alcançado após o período de 35 horas de reação. Então, visando promover uma perturbação do equilíbrio, realizou-se experimento com a reação sendo alimentada com substrato no tempo o qual o equilíbrio é atingido.

A reação enzimática foi realizada em batelada em banho termostático utilizando como substrato uma solução de D-Galactose 250 mM. A reação foi mantida em temperatura constante de 55 °C por um intervalo de tempo de 72 horas, na qual foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados. Após 35 horas de reação, adicionou-se à reação quantidade de massa de substrato D-Galactose equivalente a concentração de 250 mM, obtendo uma concentração final de D-Galactose aproximadamente 500 mM, sem levar em consideração a quantidade reagida. Para comparar os resultados obtidos com a reação ocorrendo em batelada alimentada, realizou-se a reação utilizando D-Galactose com concentração inicial de 250mM e 500mM. A Figura 18 a seguir representa o perfil de produção de D-Tagatose para as reações.

Figura 18 - Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para as reações ocorrendo com substrato D-Galactose 500 mM (■), D-Galactose 250 mM (●) e D-Galactose 250 mM sendo alimentada após 35 horas de reação com D-Galactose 250 mM (▲). Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.



FONTE: Elaborada pela autora.

Analisando a Figura 18, percebe-se que a adição de substrato no decorrer da reação não favorece a conversão de D-Galactose em D-Tagatose, uma vez que a reação com concentração inicial de substrato de 500 mM obtém uma concentração de D-Tagatose praticamente duas vezes maior do que a reação ocorrendo com a alimentação de substrato. Um possível motivo seria a falta de agitação no meio reacional, dificultando a transferência de massa.

Com as informações obtidas nas figuras anteriores, se faz necessário um estudo das condições reacionais para identificar o ponto no qual tem-se a maior produção de D-Tagatose. Por isso, realizou-se um planejamento experimental onde variou-se os parâmetros temperatura, pH e concentração de substrato e seus efeitos sobre a reação foram analisados.

4.3.2 Planejamento Experimental

O intervalo de concentração de substrato utilizado no planejamento experimental foi obtido a partir de uma possível concentração do soro e verificados na

curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite. O intervalo de temperatura foi obtido através dos ensaios preliminares, já a faixa de pH utilizada no planejamento experimental foi baseada em estudos de Manzo et al. (2019).

O planejamento experimental com os seus fatores, níveis e as respostas encontradas para cada ensaio é descrita na Tabela 6 a seguir. Os experimentos foram realizados em duplicata, com exceção do ponto central que foi realizado em triplicata, sendo um total de 19 experimentos realizados.

Tabela 6 – Planejamento Experimental com efeitos e seus níveis naturais, resposta e rendimento obtido para cada experimento.

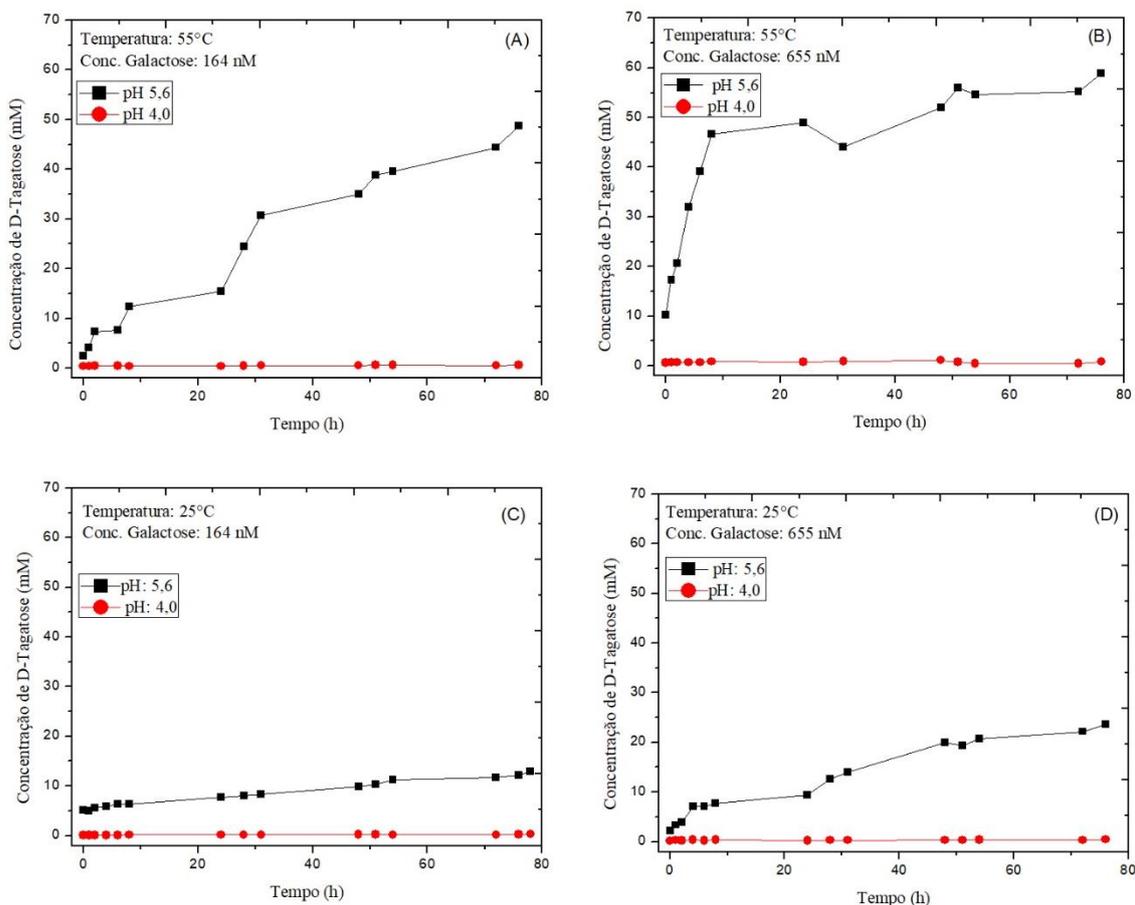
Exp	Tratamento	Efeito Fatorial			Resposta	Rendimento (%)
		Temp (°C)	Conc. Galactose (mM)	pH	Conc. Tagatose (mM)	
1	0	25	164	4	0,27 ± 0,02	0,17 ± 0,02
2	Temp	55	164	4	0,54 ± 0,36	0,33 ± 0,21
3	Conc	25	655	4	0,44 ± 0,14	0,07 ± 0,02
4	Temp*Conc	55	655	4	1,12 ± 0,06	0,17 ± 0,01
5	pH	25	164	5,6	12,89 ± 0,68	7,86 ± 0,42
6	Temp*pH	55	164	5,6	48,81 ± 1,77	29,77 ± 1,08
7	Conc*pH	25	655	5,6	24,51 ± 1,25	3,74 ± 0,19
8	Temp*Conc*pH	55	655	5,6	65,97 ± 1,54	10,07 ± 0,23
9	Pto central	40	410	4,8	13,38 ± 0,06	3,26 ± 0,01
10	Pto central	40	410	4,8	13,47 ± 0,34	3,28 ± 0,08
11	Pto central	40	410	4,8	15,44 ± 0,06	3,77 ± 0,01

FONTE: Elaborada pela autora.

Pode-se notar que o aumento da concentração de substrato favorece a produção de D-Tagatose, porém o mesmo não acontece com o rendimento. Isso se dá porque o rendimento é definido como razão entre a quantidade de produto obtido e a quantidade que teoricamente seria obtida e o aumento da concentração de D-Galactose aumenta a quantidade teórica de D-Tagatose produzida, porém não altera significativamente a quantidade de fato obtida.

Além disso, é possível perceber que existe um aumento significativo na concentração de D-Tagatose obtida quando ocorre um aumento no pH. Esse comportamento é observado quando comparados os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 da Tabela 7. O aumento da temperatura também favorece a produção de D-Tagatose (experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8 da Tabela 7). As Figuras 19 (A); (B); (C) e (D) a seguir mostram claramente esse comportamento.

Figura 19 – Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para: (A) reação a 55 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (B) reação a 55 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (C) reação a 55 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (D) reação a 55 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●).

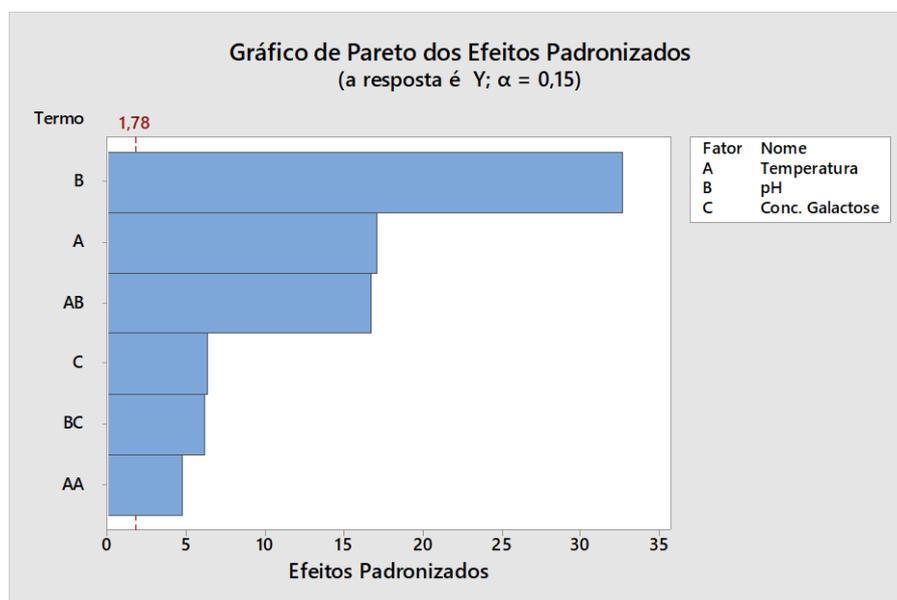


FONTE: Elaborada pela autora.

É notório o aumento da produção de D-Tagatose tanto com o aumento do pH da reação quanto com o aumento da temperatura (Figura 19). Isso ocorre provavelmente porque a temperatura ambiente a energia cinética das moléculas da enzima é menor do que em temperaturas mais elevadas, diminuindo a agitação e possibilidade de choques entre si que favorecem a reação. Uma baixa conversão da reação em pH 4,0 já era esperada com base nos estudos e resultados obtidos por Manzo et al. 2019.

A partir dos dados apresentados na Tabela 7 e com auxílio do software Minitab® 18 pode-se avaliar estatisticamente os resultados obtidos. A Figura 20, mostra o gráfico de Pareto para os fatores utilizados no planejamento experimental.

Figura 20 – Gráfico de Pareto para os efeitos lineares e quadráticos do modelo obtido para o planejamento experimental.



FONTE: Elaborada pela autora.

A partir da análise do gráfico de Pareto (Figura 20) percebe-se que todos os fatores escolhidos influenciam na reação, uma vez que todos os efeitos cruzam a linha de referência (1,78). Estes fatores são estatisticamente significativos ao nível 0,05 com os termos do modelo atual, sendo pH e temperatura os parâmetros que mais afetam, comprovando o resultado visto na Tabela 7. Essa influência já era prevista, uma vez que as enzimas são bastante sensíveis a mudanças de pH e temperatura.

A Equação 3 a seguir, representa a equação de regressão obtida no software Minitab® 18 a partir das respostas do planejamento experimental.

$$[Tagatose] = 95,0 - 5,025 Temp - 15,83 pH - 0,0718[Galactose] + 0,02321Temp^2 + 0,7961Temp * pH + 0,01805pH * [Galactose] \quad (3)$$

Onde [Tagatose]: é a concentração de D-Tagatose (mM) produzida ao final da reação; Temp é a temperatura (°C) na qual a reação ocorre; pH é o pH no qual a reação é mantida e [Galactose] é a concentração de D-Galactose (mM) utilizada como substrato na reação enzimática.

As Tabelas 7 e 8 mostram os valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ para os efeitos utilizados no planejamento experimental e o ajuste do modelo obtido, respectivamente. Os dados da análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos com o planejamento experimental estão apresentados no APÊNDICE A. 2.

Tabela 7 – Valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ para os efeitos utilizados no planejamento experimental

	GL	Valor $F_{calculado}$	Valor $F_{tabelado}$	Valor-P
Modelo	6	292,60	19,353	0,000
Linear	3	471,50	19,164	0,000
Temperatura	1	294,63	18,513	0,000
pH	1	1078,00	18,513	0,000
Conc. Galactose	1	41,85	18,513	0,003
Quadrado	1	22,85	18,513	0,009
Temperatura*Temperatura	1	22,85	18,513	0,009
Interação com 2 Fatores	2	159,14	19,000	0,000
Temperatura*pH	1	280,56	18,513	0,000
pH*Conc. Galactose	1	37,71	18,513	0,004
Erro	4			
Falta de ajuste	2	2,83		0,261
Erro puro	2	*	*	*
Total	10			

FONTE: Elaborada pela autora.

Percebe-se que todos os efeitos são significantes para um nível de confiança de 5%, visto que o Valor-P para todos os efeitos é menor do que 0,05. Isso também pode ser visto através do teste F, uma vez que todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram maiores do que F_{tabelado} . Essa significância pode ser confirmada através do coeficiente de determinação, R^2 , do modelo obtido, que comprova que a equação obtida (Equação 2) consegue descrever bem os dados e também pode ser representativa para novos ensaios devido ao valor do R^2 (pred) ser próximo a 100%. Além disso, um baixo valor de S mostra que o modelo representa bem os resultados encontrados. A Tabela 8 a seguir apresenta os dados dos coeficientes de determinação do modelo obtido.

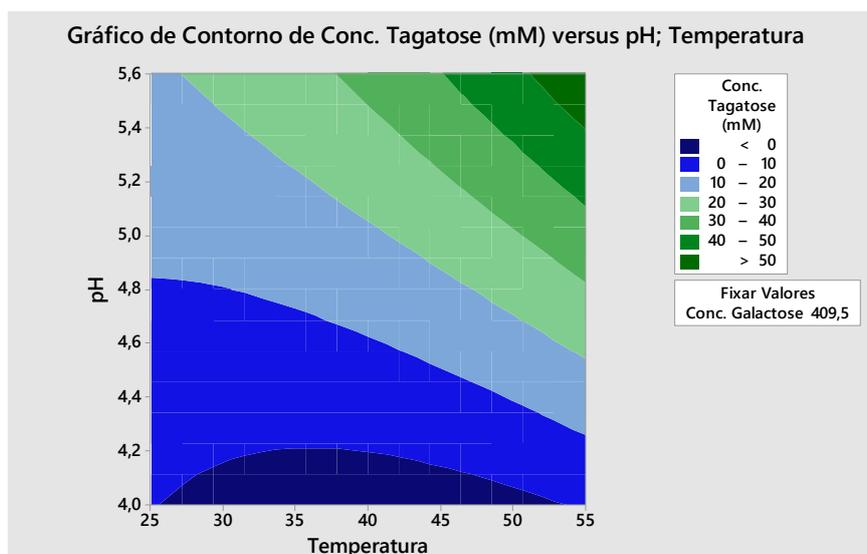
Tabela 8 – Coeficiente de determinação (R^2), ajustado (aj) e predito (pred) e valor S para o modelo obtido.

S	R^2	$R^2(\text{aj})$	$R^2(\text{pred})$
1,61326	99,77%	99,43%	97,18%

FONTE: Elaborada pela autora.

Com o objetivo de verificar como a variável resposta, concentração de D-Tagatose produzida, se relaciona com as variáveis manipuladas, pH e Temperatura, construiu-se o gráfico de contorno, representado na Figura 21.

Figura 21 – Gráfico de contorno para a resposta obtida do planejamento experimental.

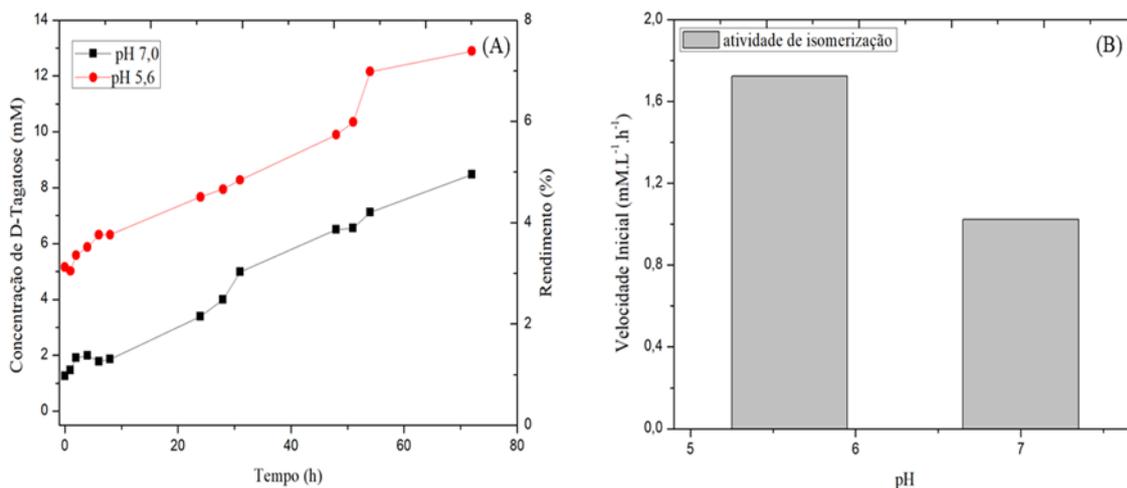


FONTE: Elaborada pela autora.

Analisando o gráfico de contorno (Figura 21) verifica-se que o aumento de pH e temperatura favorecem a produção de D-Tagatose, sendo o ponto extremo do planejamento experimental a condição mais favorável para a reação enzimática. Como os ensaios preliminares de temperatura mostraram que ocorre uma perda significativa da atividade catalítica da enzima a 60 °C, admitiu-se como ponto ótimo de operação a temperatura de 55 °C.

Com o intuito de verificar se um valor de pH acima de 5,6 favorece a reação, realizou-se um ensaio com a reação em pH 7,0. A reação foi mantida na temperatura de 25 °C durante 72 horas. A Figura 22 a seguir mostra o perfil de produção de D-Tagatose para a reação em pH 5,6 e 7,0.

Figura 22 – (A) Concentração de D-Tagatose produzida e rendimento obtido em função do tempo reacional para as reações em pH 7,0 (■) e em pH 5,6(●) e (B) atividade de isomerização para as reações em pH 5,6 e pH 7,0. Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM.



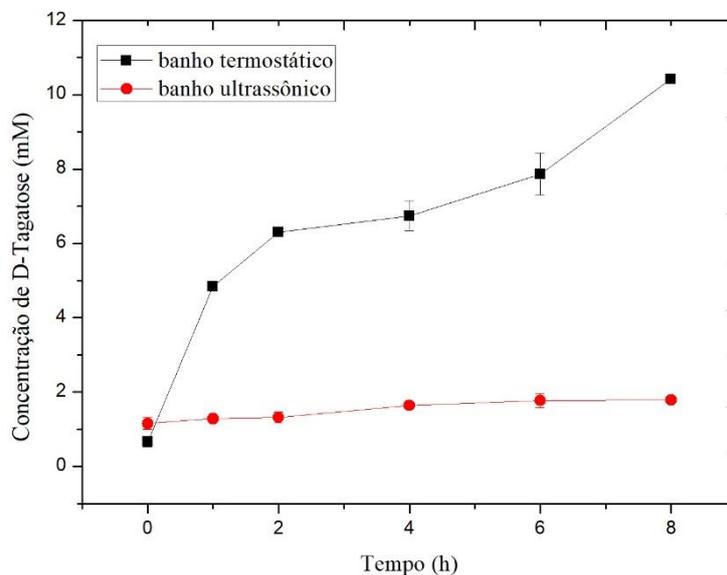
FONTE: Elaborada pela autora.

Como houve uma menor produção de D-Tagatose para reação em pH 7,0, admitiu-se como ponto ótimo o pH 5,6. Pode-se perceber, com auxílio da Figura 22, que na reação ocorrendo em pH 7,0 tem-se uma menor atividade de isomerização ocasionando uma menor produção de D-Tagatose e conseqüentemente um menor rendimento da reação. Logo, assumiu-se temperatura de 55 °C, pH 5,6 e concentração de D-Galactose de 164 mM como as condições ótimas. Todos os ensaios a seguir foram realizados nesta condição.

4.4 Efeito do Ultrassom

Com o intuito de investigar se o ultrassom afetaria o equilíbrio da reação, realizou-se ensaios em banho ultrassônico e banho termostático. As reações ocorreram nas mesmas condições de temperatura, pH e concentração de substrato. A Figura 23 apresenta o perfil de produção de D-Tagatose para as reações com substrato em tampão acetato de sódio e em tampão borato.

Figura 23 – Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para reação ocorrendo em banho termostático(■) e em banho ultrassônico(●). Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.



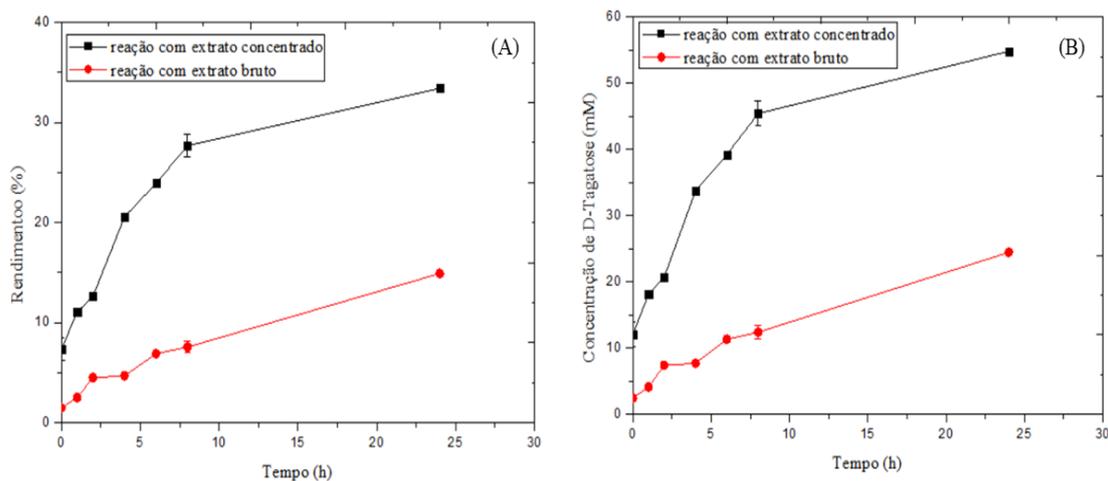
FONTE: Elaborada pela autora.

Com a análise da Figura 23 é possível visualizar que o banho ultrassônico amplia o efeito da temperatura, visto que a enzima sofre desnaturação a 55°C, o que não ocorre para o banho termostático sem ultrassom. Esse efeito pode ser explicado porque ultrassom é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases, denominado cavitação, e essa implosão libera grande quantidade de calor e pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido (SANTOS, 2009; MARTINES; DAVOLOS; JAFELICCI, 2000).

4.5 Efeito da concentração do extrato enzimático

Para verificar se o aumento de atividade enzimática obtido com a concentração do extrato iria afetar a produção de D-Tagatose, realizou-se uma nova reação enzimática utilizando o extrato concentrado. A reação ocorreu durante um período de 24 horas e nas condições descritas no item 4.4 deste trabalho. A Figura 24 a seguir mostra o comportamento da produção de D-Tagatose para a reação com o extrato concentrado e com o extrato bruto ao longo do tempo de reação e o rendimento obtido.

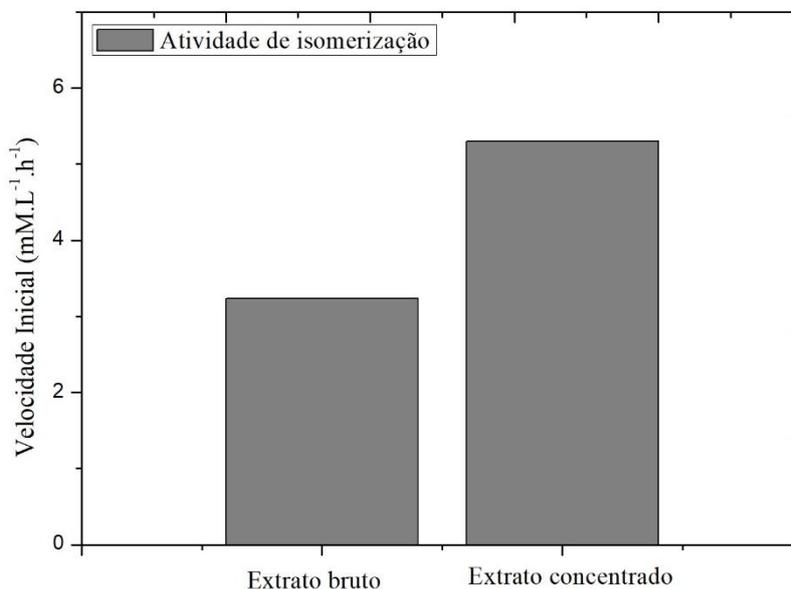
Figura 24 – (A) Rendimento obtido ao longo do tempo reacional para a reação com extrato concentrado ($2,40 \text{ U.mL}^{-1}$) (■) e para a reação com extrato bruto ($1,27 \text{ U.mL}^{-1}$) (●). (B) Concentração de D-Tagatose produzida ao longo do tempo reacional para a reação com extrato concentrado (■) e para a reação com extrato bruto (●). Reação a 55°C , concentração de substrato 164 mM e pH $5,6$.



FONTE: Elaborada pela autora.

Analisando a Figura 24 percebe-se que o perfil de produção D-Tagatose é semelhante para ambos os casos, porém ocorre uma maior produção com a concentração do extrato enzimático. Ao final da reação, obtêm-se um rendimento de $14,90\%$ com o uso do extrato bruto, enquanto que para a reação com o extrato concentrado, o rendimento aumentou mais do que o dobro, chegando a $33,42\%$. Além disso, pode-se notar que a concentração do extrato enzimático altera apenas a velocidade da reação, o que é comprovado na Figura 25 a seguir, mas não influencia no equilíbrio da reação, uma vez que o perfil de produção é semelhante para ambas as situações.

Figura 25 – Atividade de isomerização para reação com extrato bruto ($1,27 \text{ U.mL}^{-1}$) e extrato concentrado ($2,40 \text{ U.mL}^{-1}$). Reação a 55°C , concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.



FONTE: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que a reação com o extrato concentrado possui uma velocidade inicial maior do que a reação com o extrato bruto, o que já era esperado tendo em vista que o extrato concentrado possui uma maior atividade enzimática, favorecendo assim a conversão de D-Galactose em D-Tagatose.

4.6 Reuso do extrato enzimático

A enzima L-Arabinose isomerase é uma enzima multimérica, sensível a mudanças no meio, uma vez que qualquer alteração na estrutura das suas subunidades afeta a capacidade catalítica dessa enzima. Com isso, torna-se difícil a imobilização da mesma. Portanto, torna-se interessante o uso de reator de membrana para a separação da enzima do meio reacional e assim um possível reuso da mesma.

Diante do exposto, com o objetivo de tentar reutilizar o extrato enzimático, realizou-se experimento no qual ocorreu a filtração da reação enzimática em filtro de membrana com tamanho de corte (30 kDa), uma vez que as moléculas de D-Galactose e D-Tagatose são menores do que o tamanho do poro e a molécula da L-AI é maior, pode-se ocorrer a separação e assim reutilizar a enzima. A Tabela 9 a seguir mostra a quantidade

de D-Tagatose produzidas com e sem reuso do extrato enzimático após 24 horas de reação.

Tabela 9 – Concentração de D-Tagatose produzida para reação sem reuso e com o reuso do extrato enzimático. Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM e pH 5,6.

Reação	Concentração de D-Tagatose (mM)
Sem reuso	12,11 ± 0,16
Com reuso	10,57 ± 0,23

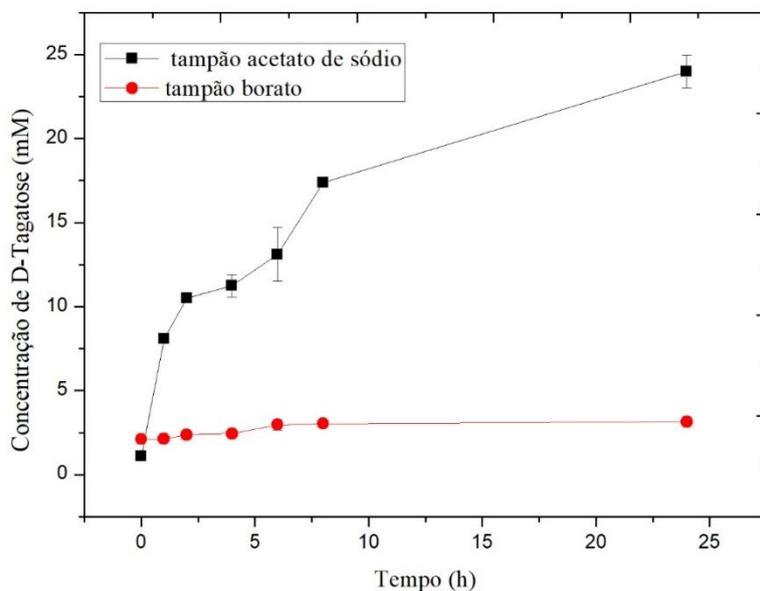
FONTE: Elaborada pela autora.

É possível observar que não ocorre um decréscimo significativo na produção de D-Tagatose com o reuso do extrato enzimático, portanto novos testes serão realizados visando determinar a quantidade de ciclos reutilizando a enzima é possível até ocorrer uma perda significativa na atividade catalítica da mesma.

4.7 Efeito do uso do tampão borato

Afim de verificar se o tampão borato favorece a produção de D-Tagatose realizou-se ensaios utilizando uma solução de D-Galactose preparada em tampão borato. A Figura 26 a seguir mostra o perfil de produção de D-Tagatose para as reações ocorrendo na presença de tampão borato e tampão acetato de sódio.

Figura 26 – Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para a reação utilizando D-Galactose em tampão acetato de sódio (■) e em tampão borato (●).

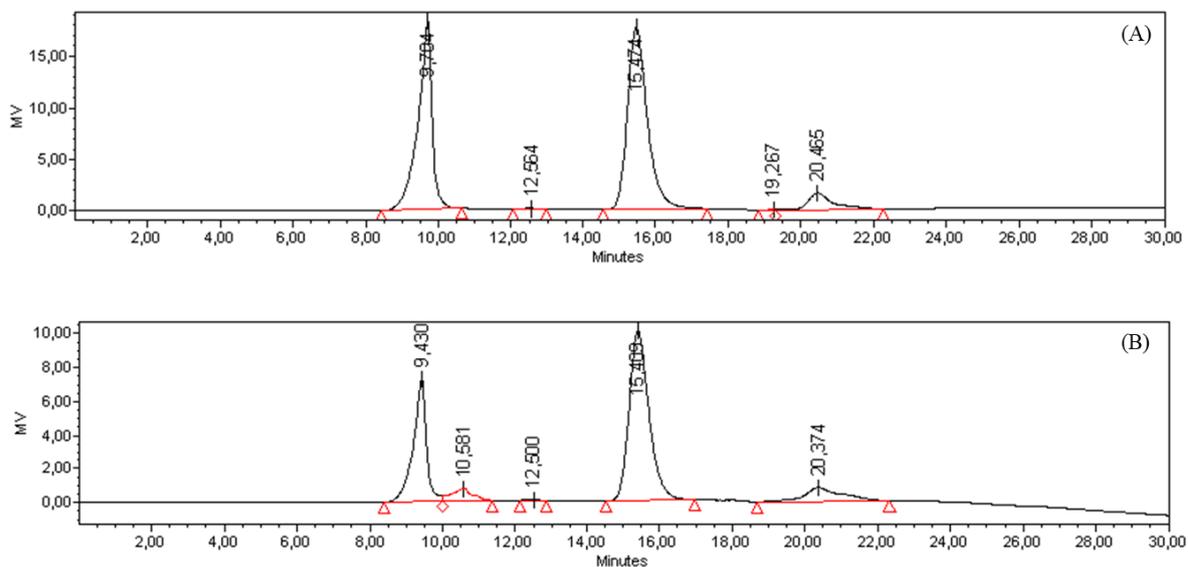


FONTE: Elaborada pela autora.

Observa-se que a reação com substrato em tampão borato possui uma menor produção de D-Tagatose em solução (Figura 26). Porém, baseado nos estudos de Salomen (2013), o tampão borato favorece a precipitação da D-Tagatose, então é possível que a baixa concentração de D-Tagatose ocorra devido a mesma ter precipitado.

Durante a reação verifica-se que existe a formação de precipitado, portanto, na tentativa de quantificar a D-Tagatose presente no precipitado, realizou-se um novo teste, no qual as reações com tampão borato e tampão acetato de sódio foram mantidas em temperatura constante de 55 °C por um período de 24 horas. Ao fim da reação, a solução reacional foi centrifugada, o precipitado então foi separado e ressuspensionado em água ultrapura, filtrado e em seguida foi analisado em HPLC. As Figuras 27 (A) e (B) mostram o cromatograma para ambos os casos e a Tabela 10 mostra a quantidade de D-Tagatose produzida.

Figura 27 - Cromatograma para (A) reação em tampão borato e (B) reação em tampão acetato de sódio. Tempo de retenção da D-Galactose: 15 minutos; Tempo de retenção da D-Tagatose: 20 minutos.



FONTE: Elaborada pela autora

É possível visualizar que os picos obtidos para a D-Tagatose (tempo de 20,465 e 20,374 na Figura 27. (A) e (B)) são praticamente do mesmo tamanho para ambas as condições, o que pode ser confirmado na Tabela 10 com os valores das concentrações de D-Tagatose obtidos no precipitado sem levar em consideração a diluição realizada anteriormente para leitura no HPLC.

Tabela 10- Concentração de D-Tagatose obtida no precipitado para substrato em tampão borato e tampão acetato de sódio.

Tampão Utilizado	Área do Pico	Concentração D-Tagatose (mM)
Tampão borato	77623	1,55
Tampão acetato de sódio	60399	1,21

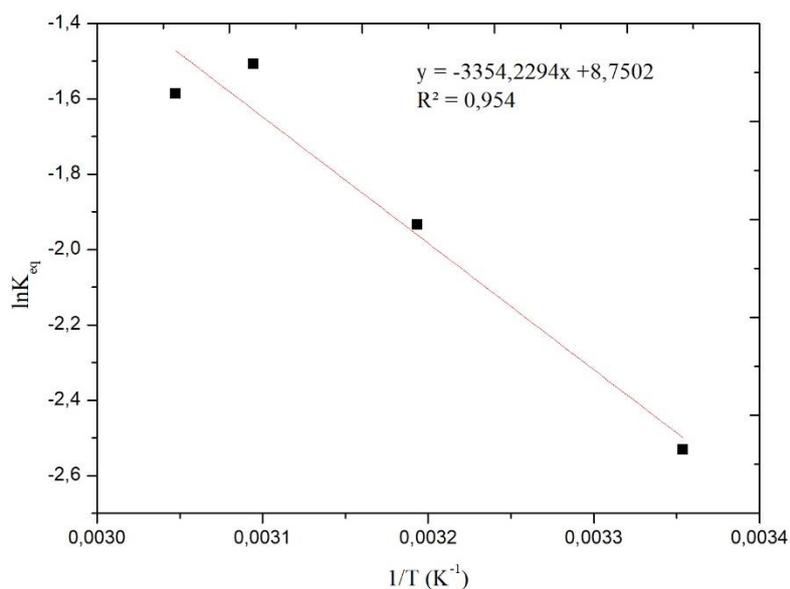
FONTE: Elaborada pela autora.

Percebe-se que tem um pequeno aumento na produção de D-Tagatose utilizando o tampão borato, porém se faz necessário o uso de um método mais eficaz para quantificar o efeito do mesmo.

4.8 Parâmetros termodinâmicos

Utilizando a equação de van't Hoff foi possível determinar as variações aparentes de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) a partir do coeficiente angular e da interseção da reta, respectivamente, obtida através do gráfico de $\ln K_{eq}$ versus $1/T$, Figura 28 a seguir.

Figura 28 - Gráfico de van't Hoff para a reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose.



FONTE: Elaborada pela autora.

Os valores obtidos para as variações de entalpia e entropia foram posteriormente utilizados para calcular a variação de energia livre de Gibbs, ΔG , usando a equação 03. O valor de ΔG indica a espontaneidade do processo de isomerização. Um alto valor positivo reflete em um processo energeticamente não favorável. A Tabela 11 mostra os valores para os parâmetros termodinâmicos obtidos no intervalo de temperatura estudado e indica que a reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose, nesse intervalo, é não espontânea.

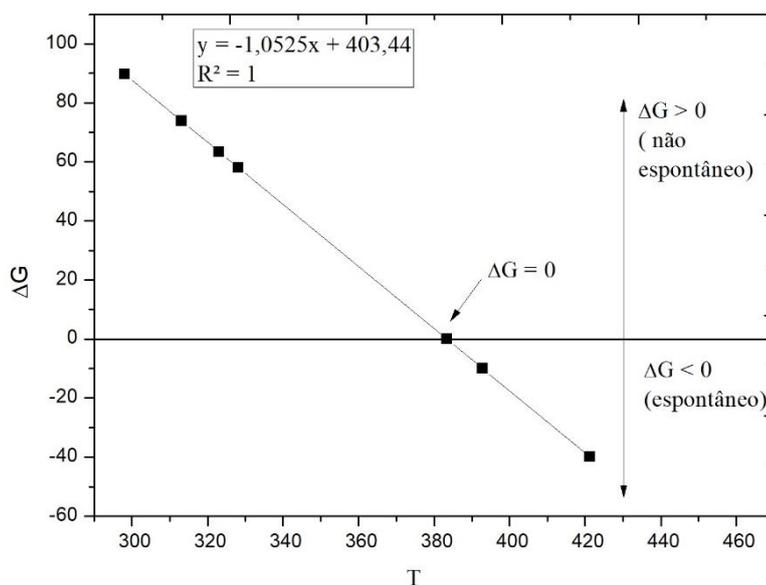
Tabela 11 - Valores aparentes de K_{eq} , ΔH , ΔS e ΔG em função da temperatura.

T (K)	K_{eq}	$\ln K_{eq}$	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)
298,15	0,080	-2,5309	403,44	105,25	89,6473
313,15	0,1444	-1,9351			73,8603
323,15	0,2213	-1,5081			63,3357
328,15	0,2044	-1,5877			58,0734

FONTE: Elaborada pela autora.

O gráfico da variação da energia livre de Gibbs para a reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose em função da temperatura é representado na Figura 29 a seguir. A dependência da temperatura fica evidente com a análise do gráfico. Os valores de ΔG foram calculados assumindo que ΔH e ΔS , determinados anteriormente, são constantes no intervalo de temperatura utilizado. A Figura 29 mostra que $\Delta G = 0$ ocorre em 383 K (ou 110 °C), o que significa que nessa temperatura a energia dos produtos e dos reagentes estão em equilíbrio.

Figura 29 - Variação da energia livre de Gibbs para a reação de isomerização em função da temperatura.



FONTE: Elaborada pela autora.

De acordo com a Figura 28, os valores de G são positivos para o intervalo de 298,15 a 328,15 K indicando que o processo de isomerização não é favorecido nesse intervalo de temperatura. A extrapolação do gráfico mostra que a reação é espontânea para valores acima de 110 °C (383 K).

Percebe-se então que para a rota enzimática a reação não ocorre na faixa de temperatura na qual o processo é espontâneo, sendo necessário o uso de rotas alternativas para favorecer a produção de D-Tagatose. Porém, a rota enzimática continua apresentando vantagens devido ao seu baixo consumo energético e sua maior especificidade.

5 CONCLUSÕES

Torna-se evidente a influência da temperatura e do pH na reação enzimática, bem como a influência da concentração inicial de substrato no rendimento obtido, alcançando o ponto ótimo de produção de D-Tagatose para a reação ocorrendo nas condições de 55 °C, pH 5,6 e concentração de substrato de 164 mM, obtendo um rendimento de 29,77 %.

Também foi observado que o uso do extrato enzimático altera a velocidade de reação, sendo possível obter um rendimento de 33,27 % em apenas 24 horas, ou seja, o tempo de reação reduz em 04 vezes.

O uso do ultrassom na reação ampliou o efeito da temperatura sobre a enzima, alterando o ponto ótimo de temperatura encontrado para a reação sem ultrassom. Portanto, novos ensaios serão realizados afim de determinar a melhor temperatura para a reação em banho ultrassônico e assim verificar se o ultrassom consegue alterar a velocidade e/ou o equilíbrio da reação enzimática.

Pode-se observar que é possível reutilizar o extrato enzimático através da separação do mesmo por membranas, o que torna viável a utilização de reator de membrana como rota alternativa ao processo de imobilização.

A reação enzimática de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose ocorre dentro da faixa de temperatura na qual o processo é não espontâneo ($\Delta G > 0$). Portanto, para a rota enzimática torna-se inviável a reação ocorrendo na faixa de temperatura na qual o processo é espontâneo ($T > 110$ °C), sendo necessário o uso de rotas alternativas para favorecer a produção de D-Tagatose.

De maneira geral, conclui-se que as condições reacionais alteram a velocidade da reação enzimática, porém o seu equilíbrio já é bem definido e se faz necessário um estudo termodinâmico mais aprofundado para tentar conseguir o seu deslocamento.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar o estudo do efeito do banho ultrassônico no comportamento da temperatura e verificar sua influência na reação de isomerização.

Avaliar as melhores condições para utilizar o tampão borato na reação bem como formas de quantificar a precipitação da D-Tagatose no meio reacional.

Determinar a quantidade possível de ciclos reutilizando a enzima na reação.

Realizar o estudo da solubilidade da D-Tagatose, assim como o estudo termodinâmico.

Realizar o estudo da influência do cofator na reação enzimática.

REFERÊNCIAS

AEHLE, Wolfgang. Industrial Enzymes: Overview of Industrial Enzyme Applications. **Enzymes In Industry**, [s.l.], p.257-262, 29 out. 2003. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/3527602135.ch5d>.

BALDISSERA, Ana Carolina et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1497-1512, 19 out. 2011. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1497>.

BIOSPHERIES INCORPORATED (Estados Unidos). James R. Beadle; James P. Saunders; Thomas J. Wajda, Jr. **Process for Manufacturing Tagatose**. US nº 5002612, 19 jul. 1989, 26 mar. 1991.

BOUDEBBOUZE, Samira; MAGUIN, Emmanuelle; RHIMI, Moez. Bacterial L-Arabinose Isomerases: Industrial Application for D-Tagatose Production. **Recent Patents On Dna & Gene Sequences**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.194-201, 1 dez. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187221511797636248>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRITO, Ana Beatriz Neves. **Estudo da cristalização de lactose em diferentes solventes**. 2007. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

CHENG, Lifang et al. An L-arabinose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: cloning, expression, purification, and characterization. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.1089-1097, 17 nov. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2322-z>.

CHENG, Lifang; MU, Wanmeng; JIANG, Bo. Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 90, n. 8, p.1327-1333, 29 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3938>.

CHOI, Jin Myung et al. Structure of the thermophilic l-Arabinose isomerase from *Geobacillus kaustophilus* reveals metal-mediated intersubunit interactions for activity and thermostability. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 596, p.51-62, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.033>.

CHOUAYEKH, Hichem et al. Characterization of an l-arabinose isomerase from the *Lactobacillus plantarum* NC8 strain showing pronounced stability at acidic pH. **Fems**

Microbiology Letters, [s.l.], v. 277, n. 2, p.260-267, dez. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00961.x>.

COSTA, Sofia et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5:63, n. Feb 19, p.1-20, 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>.

PAULA, Camila Salgado de. **Fatores que alteram o equilíbrio químico**. Disponível em: <<http://educacao.globo.com/quimica/assunto/equilibrio-quimico/fatores-que-alteram-o-equilibrio-quimico.html>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

DEMAIN, Arnold L.; VAISHNAV, Preeti. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.297-306, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.

DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 192, n. 2, p. 583–587, 1951.

DRABO, Peter; DELIDOVICH, Irina. Catalytic isomerization of galactose into tagatose in the presence of bases and Lewis acids. **Catalysis Communications**, [s.l.], v. 107, p.24-28, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2018.01.011>.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira. **Imobilização direcionada e reversível da l-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em agarose através do domínio lectina β -trebol (LSLt)**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

FUJIMARU, Tomomi; PARK, Jin-hee; LIM, Juyun. Sensory Characteristics and Relative Sweetness of Tagatose and Other Sweeteners. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 77, n. 9, p.323-328, 21 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02844.x>.

FURLONG, E. B. **Bioquímica: um enfoque para alimentos**. 1. ed. Rio Grande: EDGRAF Editora e Grafica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2000. v. 1. 172p

GUERRERO-WYSS, Marion; AGÜERO, Samuel Durán; DÁVILA, Lisse Angarita. D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2018, p.1-7, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8718053>.

GUO, Qi et al. Enhanced d-tagatose production by spore surface-displayed l-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 247, p.940-946, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.187>.

HUNG, Xing-guang et al. Characterization of a thermophilic l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Biochemical Engineering**

Journal, [s.l.], v. 83, p.121-128, fev. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.026>.

JAYAMUTHUNAGAI, J. et al. D -Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 235, p.250-255, jul. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.123>.

JONES, Peter J.. Clinica nutrition: 7. Functional foods - more than just nutrition. **Cmaj**. [Canadá], v. 166, n. 12, p. 1555-1563. 11 jun. 2002.

JØRGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P.. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 64, n. 6, p.816-822, 1 jun. 2004. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1578-6>.

JUNG, Eun-sook; KIM, Hye-jung; OH, Deok-kun. Tagatose Production by Immobilized Recombinant *Escherichia coli* Cells Containing *Geobacillus stearothermophilus*-Arabinose Isomerase Mutant in a Packed-Bed Bioreactor. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.1335-1340, 5 set. 2008. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1021/bp050078p>

KAWAMURA, Yoko. D-Tagatose. In: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 61., 2004, Estados Unidos. **Chemical and Technical Assesment**. Estados Unidos: Fao, 2004. p. 1 - 3.

KIM, Byoung-chan et al. Cloning, expression and characterization of l-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of d-galactose to d-tagatose using the enzyme. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 212, n. 1, p.121-126, jun. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11254.x>.

KIM, Baek-joong et al. Characterization of a F280N variant of l-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans* identified as a d-galactose isomerase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 98, n. 22, p.9271-9281, 1 jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5827-z>.

KIM, Hye-jung; OH, Deok-kun. Purification and characterization of an l-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing d-tagatose. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 120, n. 2, p.162-173, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.004>.

KIM, Ho Myeong et al. Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 175, p.128-134, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.050>.

KIM, Ho Myeong et al. Production of D -tagatose and bioethanol from onion waste by an intergrating bioprocess. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 260, p.84-90, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.013>.

KIM, N.-h. et al. Conversion Shift of D-Fructose to D- Psicose for Enzyme-Catalyzed Epimerization by Addition of Borate. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 74, n. 10, p.3008-3013, 31 mar. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00249-08>.

KIM, Pil. Current studies on biological tagatose production using l-arabinose isomerase: a review and future perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.243-249, 10 jul. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1665-8>.

KIM, Yeong-su; KIM, Jung-eun; OH, Deok-kun. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 128, p.809-812, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.060>.

LAKSMI, Fina Amreta et al. Improved substrate specificity for D-galactose of L-arabinose isomerase for industrial application. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1866, n. 11, p.1084-1091, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.09.002>.

LEE, D.-w. et al. Characterization of a Thermostable L-Arabinose (D-Galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.1397-1404, 1 mar. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.3.1397-1404.2004>.

LEE, Dong-woo et al. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the l-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 434, n. 2, p.333-343, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.004>.

LEE, Dong-woo et al. A thermodynamic study of mesophilic, thermophilic, and hyperthermophilic l-arabinose isomerases: The effects of divalent metal ions on protein stability at elevated temperatures. **Febs Letters**, [s.l.], v. 579, n. 5, p.1261-1266, 26 jan. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.027>.

LEHNINGER, Albert L. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

LI, Yanjun et al. Identification and characterization of a novel l-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in d-tagatose production. **Extremophiles**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.441-450, 23 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-011-0375-2>.

LIANG, Min et al. Bioconversion of d-galactose to d-tagatose: continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable l-arabinose isomerase and efficient purification by selective microbial degradation. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, [s.l.], v. 93, n. 4, p.1469-1474, 26 out. 2011. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3638-z>.

LIM, B.-c.; KIM, H.-j.; OH, D.-k. High Production of D-Tagatose by the Addition of Boric Acid. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.824-828, 3 ago. 2007. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1021/bp070056y>.

LIMA, Urgel de Almeida et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. 3 v.

LIU, Yi et al. Efficient Production of d-Tagatose Using a Food-Grade Surface Display System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 28, p.6756-6762, 8 jul. 2014. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/jf501937j>.

LORENÇO, Clarissa Müller. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose**. 2004. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004

LU, Y.; LEVIN, G. V.; DONNER, T. W. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s.l.], p.109-134, 17 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00799.x>.

MAGALHÃES, Lana. **Solubilidade**. 2017. Disponível em:
<<https://www.todamateria.com.br/solubilidade/>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

MANJASETTY, Babu A.; CHANCE, Mark R. Crystal Structure of Escherichia coli L-Arabinose Isomerase (ECAI), the Putative Target of Biological Tagatose Production. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 360, n. 2, p.297-309, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.040>.

MANZO, R. M. et al. Screening and selection of wild strains for L-arabinose isomerase production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.711-720, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-66322013000400003>.

MANZO, Ricardo Martín et al. Biochemical Characterization of Heat-Tolerant Recombinant L-Arabinose Isomerase from Enterococcus faecium DBFIQ E36 Strain with Feasible Applications in d-Tagatose Production. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], p.1-15, 27 mar. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00161-x>.
MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JÚNIOR, Miguel. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.251-256, abr. 2000. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422000000200017>.

MEN, Yan et al. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: Cloning, overexpression and characterization of l-arabinose isomerase from *Pediococcus*

pentosaceus PC-5. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 169, n. 2-3, p.171-178, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.001>.

NASCIMENTO, Diego Sampaio. **Aplicação de inulinases de leveduras isoladas do semi-árido para a produção de concentrados de frutose**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

OH, Deok-kun. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.1-8, 10 maio 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0981-1>.

PATEL, Manisha J. et al. A single and two step isomerization process for d-tagatose and l-ribose bioproduction using l-arabinose isomerase and d-lyxose isomerase. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 97, p.27-33, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.001>.

PATEL, Sanjay K.s. et al. Biological methanol production by immobilized *Methylocella tundrae* using simulated biohythane as a feed. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 241, p.922-927, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.160>.

RHIMI, Moez et al. Rational design of *Bacillus stearothermophilus* US100 l-arabinose isomerase: Potential applications for d-tagatose production. **Biochimie**, [s.l.], v. 91, n. 5, p.650-653, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.01.014>.

RHIMI, Moez; BEJAR, Samir. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive l-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1760, n. 2, p.191-199, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.11.007>.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014. 358 p.

RODRIGUES, Roberta da Silva Bussamara. **Produção de caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais**. 2009. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROY, Sohini et al. Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 83, n. 11, p.2699-2709, 18 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14358>.

SALONEN, Noora et al. *Bifidobacterium longum* l-Arabinose Isomerase—Overexpression in *Lactococcus lactis*, Purification, and Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 168, n. 2, p.392-405, 5 jul. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9783-8>.

SALONEN, Noora et al. D-Tagatose production in the presence of borate by resting *Lactococcus lactis* cells harboring *Bifidobacterium longum* l-arabinose isomerase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.489-497, 18 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-012-0805-2>.

SANTOS, Francisco Francielle Pinheiro dos. **Produção de biodiesel assistida por ultra-som**. 2009. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SCHÄGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 166, n. 2, p.368-379, nov. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. 560 p. 2 v.

SHIN, Kyung-chul et al. Increased Production of Food-Grade d-Tagatose from d-Galactose by Permeabilized and Immobilized Cells of *Corynebacterium glutamicum*, a GRAS Host, Expressing d-Galactose Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 43, p.8146-8153, 21 out. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03588>.

SON, Yang-ju et al. Anti-blooming effect of maltitol and tagatose as sugar substitutes for chocolate making. **Lwt**, [s.l.], v. 88, p.87-94, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.018>.

SOUSA, Marylane de. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-Tagatose por L-Arabinose Isomerase**. 2015. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015

TORRES, Pedro R. et al. Purification of an l-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 102, p.99-105, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.023>.

WANARSKA, Marta et al. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting β -D-galactosidase from *Arthrobacter chlorophenolicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter* sp. 22c. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.113-128, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-113>.

XU, Wei et al. L -arabinose isomerases: Characteristics, modification, and application. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 78, p.25-33, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.016>.

- XU, Zheng et al. A novel l-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for d-tagatose production: Gene cloning, purification and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 70, n. 1-2, p.1-7, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.01.010>.
- XU, Zheng et al. Production of d-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 Cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 166, n. 4, p.961-973, 28 dez. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9484-8>.
- XU, Zheng et al. Construction and co-expression of polycistronic plasmids encoding thermophilic l -arabinose isomerase and hyperthermophilic β -galactosidase for single-step production of d -tagatose. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 109, p.28-34, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.015>.
- YOON, Sang-hyun; KIM, Pil; OH, Deok-kun. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.47-51, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1022575601492>.
- ZHANG, Yao et al. D-Tagatose production by *Lactococcus lactis* NZ9000 Cells Harboring *Lactobacillus plantarum* L-arabinose Isomerase. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.288-294, 15 mar. 2017. EManuscript Services. <http://dx.doi.org/10.5530/ijper.51.2.34>.
- ZHANG, Ye-wang; JEYA, Marimuthu; LEE, Jung-kul. L-Ribulose production by an *Escherichia coli* harboring l-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 6, p.1993-1999, 22 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2600-9>.

APÊNDICE**APÊNDICE A.1 Curva de calibração da D-Tagatose para o método colorimétrico ácido sulfúrico-cisteína-carbazol.**

Concentração de D-Tagatose (mM)	Absorbância
0,02	0
0,035	0,0210
0,05	0,0320
0,075	0,1115
0,1	0,1615
0,125	0,1690
0,15	0,2600
0,175	0,2903
0,2	0,3355
0,35	0,6600
0,5	0,8440

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE A.2 Dados utilizados para a determinação do coeficiente de atividade da D-Galactose.

Temperatura (K)	Solubilidade	X_{molar}	$T_{\text{fusão}}$ (K)	R
	D-Galactose (g. mL ⁻¹)	D-Galactose		
288,15	0,5025	0,0096	440,15	8,314
298,15	0,883	0,0168		
308,15	1,923	0,0359		
318,15	2,742	0,0504		
328,15	3,636	0,0657		
338,15	4,2395	0,0758		
348,15	4,58	0,0814		
353,15	4,9065	0,0867		

FONTE: Elaborada pela autora.

Para determinar a entalpia de fusão $\Delta_{\text{fus}}H$ admitiu-se que a dependência da temperatura não é muito alta. Portanto, podemos usar a equação a seguir:

$$\Delta_{\text{fus}}H = R \left[\frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2} \right] \ln \left[\frac{S_1}{S_2} \right]$$

Uma vez calculada a entalpia média de fusão e admitindo que a contribuição do ΔC_p é negligenciável, podemos calcular o coeficiente de atividade da D-Galactose através da equação abaixo:

$$\gamma_G = \frac{1}{x_s} \exp \left\{ -\frac{\Delta_{\text{fus}}H}{RT} \left[1 - \frac{T}{T_{\text{fus}}} \right] \right\}$$

Com isso, obtemos os seguintes dados:

Temperatura (K)	X_{molar} D-Galactose	$\Delta_{fus}H$	$\Delta_{fus}H_{\text{médio}}$	γ_G
288,15	0,0096	40,2656	26,9910	103,4987
298,15	0,0168	59,4516		59,3510
308,15	0,0359	28,9194		27,8014
318,15	0,0504	24,4944		19,8018
328,15	0,0657	14,1668		15,1829
338,15	0,0758	7,5614		13,1675
348,15	0,0814	14,0781		12,2661
353,15	0,0867			11,5178

FONTE: Elaborada pela autora.

APÊNDICE A.3 Dados estatísticos para o modelo do planejamento experimental obtido no software Minitab®.

	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	6	4569,16	761,53	292,60	0,000
Linear	3	3681,34	1227,11	471,50	0,000
Temperatura	1	766,82	766,82	294,63	0,000
pH	1	2805,60	2805,60	1078,00	0,000
Conc. Galactose	1	108,92	108,92	41,85	0,003
Quadrado	1	59,48	59,48	22,85	0,009
Temperatura*Temperatura	1	59,48	59,48	22,85	0,009
Interação com 2 Fatores	2	828,34	414,17	159,14	0,000
Temperatura*pH	1	730,20	730,20	280,56	0,000
pH*Conc. Galactose	1	98,15	98,15	37,71	0,004
Erro	4	10,41	2,60		
Falta de ajuste	2	7,69	3,85	2,83	0,261
Erro puro	2	2,72	1,36	*	*
Total	10	4579,57			

FONTE: Elaborada pela autora.