



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

# IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE de *Enterococcus faecium* PARA A PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE

M. SOUSA<sup>1</sup>, L. S. CAVALCANTE<sup>1</sup>, C. S. BEZERRA<sup>1</sup>, B. C. PESSELA<sup>2</sup>, L. R. B. GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidad Autonoma de Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

E-mail para contato: marylaneufc@gmail.com

**RESUMO** – Algumas estratégias de imobilização e estabilização da estrutura da enzima multimérica L-arabinose isomerase (L-AI) recombinante de *Enterococcus faecium* foram avaliadas. Para estabilizar este tipo de enzima foram necessários estudos que possibilitem a união de todas as subunidades de forma que não ocorra a dissociação das mesmas. Avaliaram-se dois suportes a base de agarose, a saber: Epoxy-Glyoxyl-Agarose, por ligação covalente e MANAE-Agarose, por adsorção iônica reversível. A imobilização foi conduzida a 25 °C por 12 h, sob agitação constante, seguida de reticulação com glutaraldeído 0,03, 0,15 e 0,5%. Os resultados foram avaliados através dos parâmetros de imobilização, rendimento de imobilização e atividade recuperada. Foi possível verificar valores de atividade recuperada da ordem de 110% e após reticulação com glutaraldeído de 89,6%.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção bioquímica de D-tagatose a partir de D-galactose usando L-arabinose isomerase (L-AI) tem sido estudada intensivamente nos últimos anos (Torres *et al.*, 2014; Men *et al.*, 2014; Hung *et al.*, 2014). A biotransformação, através da síntese enzimática, é cada vez mais interessante como um processo industrial (Gonçalves *et al.*, 2000). A D-tagatose tem grande potencial para uso como um substituto do açúcar (sacarose) em alimentos, de sabor e propriedades edulcorantes semelhantes, com menor valor calórico, uma vez que é pouco degradada pelo corpo humano tornando-o um agente anti-hiperglicemiante, possui potenciais aplicações em muitos produtos em que a sacarose é utilizada, por exemplo, em doces, sorvetes, refrigerantes (Hong *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 1995; Livesey e Brown, 1996; Mazur, 1989).

No entanto, a rota enzimática ainda apresenta gargalos que precisam ser vencidos. Segundo Rodrigues (2009), 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

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

de solventes orgânicos), e sua recuperação, na forma solúvel, após o uso seria economicamente inviável.

Segundo Pessela (2002), apesar da grande evolução de métodos de imobilização, ainda não há metodologias gerais para imobilização em qualquer sólido e para qualquer enzima, que utilize de uma forma rápida, simples e qualitativa, ou seja, apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. A imobilização e estabilização de enzimas é uma etapa muito importante, pois permite evitar a desvantagem da perda da enzima ou de subunidades da enzima em meio aquoso e da instabilidade operacional no uso industrial de enzimas, tornando-as catalisadores ideais para a produção, seja na indústria alimentícia, de química fina ou farmacêutica (Becaro, 2008).

A inativação enzimática segue um caminho reacional que inclui dissociação de subunidades de enzimas multiméricas, desnaturação de estruturas secundárias ou terciárias, agregação e coagulação. Geralmente, enzimas multiméricas são naturalmente mais estáveis comparadas com as monoméricas, devido sua maior rigidez, proveniente da associação de suas subunidades, com boas propriedades (Almeida, 2011). No entanto, as proteínas multiméricas são enzimas muito complexas (Adriano, 2008; Almeida, 2011; Pessela *et al.*, 2007; Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Vieira, 2009; Cardoso *et al.*, 2009) cujo centro ativo pode ser determinado pela exata união das suas subunidades. Desta forma, seria interessante imobilizar estas enzimas utilizando diferentes protocolos, envolvendo diferentes regiões da proteína, a imobilização pode produzir pequenas distorções sobre a associação das subunidades, alterando a forma do centro ativo e produzindo enzimas imobilizadas com propriedades distintas (Pessela *et al.*, 2007). A inativação deste tipo de enzima pode ser fortemente influenciadas a alguma dissociação de suas subunidades (Pessela *et al.*, 2008), já que o monômero associado apresenta uma certa estabilização pela soma das interações multipontuais que estabilizam a estrutura multimérica (Pessela, 2002). Então, para estabilizar este tipo de enzima são necessários estudos que possibilitem a união de todas as subunidades de forma que não ocorra a dissociação das mesmas. Caso contrário, mudanças conformacionais promovidas, pelo calor, pH e agentes oxidantes sobre os monômeros podem ser rápidas e intensas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Pessela, 2002).

Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas imobilizadas, como a imobilização multipontual que pode favorecer a estabilização de enzimas multiméricas, promovendo o aumento da rigidez da molécula da enzima tornando-a mais resistente a mudanças conformacionais, o processo quando bem controlado poderá prevenir a inativação da enzima, não ocorrendo a dissociação de suas subunidades (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Kaddour *et al.*, 2008; Pessela *et al.*, 2008). No entanto, existem casos em que a união simultânea de todas as subunidades da enzima ao suporte possa ser muito difícil devido problemas geométricos. Fernández-Lafuente *et al.* (1999), propuseram que após uma intensa imobilização covalente multipontual, os derivados fossem reticulados com polímeros polifuncionais.

Neste contexto, para este trabalho, estudou-se a imobilização e estabilização da enzima multimérica L-arabinose isomerase recombinante de *Enterococcus faecium* em suportes a base de agarose.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Enzima

Extratos enriquecidos em L-arabinose isomerase (L-AI) foram produzidos utilizando cepas recombinantes de *E. coli*, DH10B e BL21 (DE3), como descrito por Sousa (2015) e foram nomeadas neste trabalho, respectivamente, de LAI-DH10B e LAI-BL21.

### 2.2. Ensaios de Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática da L-AI seguiu-se segundo Hung *et al.* (2014). Utilizou-se como substrato uma solução de 0,4 M de D-galactose (Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 suplementado com 1 mM  $MnCl_2$ . As amostras foram incubadas a 50 °C, por 30 min. A quantidade de D-tagatose foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método ácido sulfúrico cysteína-carbazol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade (U) de atividade da L-AI foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de D-tagatose em 1 min nas condições de ensaio.

### 2.3. Preparação dos Suportes a Base de Agarose

Neste trabalho avaliaram-se dois suportes a base de agarose, a saber: Epoxy-Glyoxyl-Agarose e MANAE-Agarose, um por ligação covalente multipontual e outro por ligação iônica, ambos favorecem uma forte ligação com a enzima (Sousa, 2015).

#### 2.3.1. Suportes MANAE-Agarose

A preparação do suporte MANAE-agarose, seguiu-se segundo Fernandez-Lafuente *et al.* (1993), 10 g do suporte glyoxyl-agarose foram suspensos em 100 mL de solução Etilenodiamina 2%, pH 8,5. A suspensão foi gentilmente agitada por 2 h. Posteriormente, 10  $mg \cdot mL^{-1}$  de borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ ) foi adicionado e a suspensão foi reduzida, por mais 2 h. O gel reduzido foi filtrado e lavado com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 5,0, com 100 mL tampão bicarbonato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 10. Finalmente, lavou-se com 500 mL de água destilada.

#### 2.3.2. Suportes Epoxy-Glyoxyl-Agarose

A preparação do suporte Epoxy-Glyoxyl-Agarose, seguiu-se segundo Bolivar *et al.* (2010). Utilizando epícloridrina, a metodologia consistiu na adição de uma solução contendo 32,8 g de NaOH e 2 g  $NaBH_4$  em 440 mL de água destilada à 100 g de agarose 4BCL, previamente lavada com água destilada. Preparou-se uma solução de 110 mL de epícloridrina e 160 mL de acetona, a frio, que foi adicionada lentamente à solução anterior. Manteve-se sob suave agitação por 16 h a temperaturas em torno de 25 °C. Depois deste tempo, o suporte foi lavado com 2 L de água destilada e seco a vácuo. Para conseguir o grau de ativação desejado, é necessário ter um controle

estrito dos tempos e da temperatura de reação na ativação do suporte. Finalmente o suporte foi oxidado com 100 mM de periodato de sódio, por 90 min.

## 2.4. Procedimento de Imobilização das L-AIs em MANAE-Agarose e Epoxy-Glyoxyl-Agarose seguida de Reticulação com Glutaraldeído

Ressuspendeu-se 1 g de suporte em 10 mL de uma solução composta pela proteína de interesse em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 para imobilização por ligação iônica e em tampão bicarbonato de potássio 100 mM, pH 10, para a imobilização covalente. A imobilização foi conduzida a 25 °C por 12 h, sob agitação constante. Ofereceram-se 10 U.g<sup>-1</sup> de solução de enzima aos suportes. Em paralelo aos ensaios, conduziu-se um experimento controle, para se avaliar a provável desativação da enzima nas mesmas condições de imobilização. As condições operacionais de temperatura e agitação foram mantidas constantes durante os experimentos. O gel de agarose então é filtrado e seguiu-se para a etapa de reticulação, onde o derivado é suspenso no tampão de imobilização e reticulado com glutaraldeído (0,03; 0,15 e 0,50 %), por 1 h. A seguir, o derivado é lavado com água destilada e novamente suspenso em tampão de atividade e as atividades medidas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Imobilização da L-arabinose isomerase em Suportes a Base de Agarose

As enzimas LAI-DH10B e LAI-BL21, que possuem uma sequência de poli His em seus extremos N-terminal (LAI-DH10B) e C-terminal (LAI-BL2), foram imobilizadas em suportes Epoxy-Glyoxyl-Agarose, por ligação covalente e em MANAE-Agarose, por adsorção iônica reversível. Foram oferecidas, igualmente, 10 U.g<sup>-1</sup> de solução de enzima a cada um dos suportes. Os resultados da imobilização podem ser observados na Tabela 1. Observou-se que todos os derivados apresentaram altos valores de rendimento de imobilização, acima de 70 %. Maiores porcentagens na atividade recuperada foram obtidos com os derivados em suportes MANAE-Agarose, com 110,4 % e 53,0 % para as imobilizações das LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Observou-se também uma diferença nos resultados de imobilização entre as enzimas L-AIs, possivelmente motivada essencialmente pelo fato da enzima possuir uma calda de histidinas em cada um dos extremos, podendo interagir com o suporte de forma diferente, mesmo sendo a mesma enzima e o mesmo gene de partida.

As enzimas imobilizadas covalentemente ao suporte Epoxy-Glyoxyl-Agarose, apresentaram uma menor atividade recuperada, 19,8 % e 42,1 % para os dois derivados das LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Esta menor atividade recuperada na imobilização covalente, pode ter sido a uma redução da atividade enzimática a pH em torno de 10,0, este fato se deve a instabilidade da L-AI a pH 10,0 (Sousa, 2015). Além do efeito de impedimento estérico causado pela imobilização por ligações covalentes, mudanças conformacionais e distorções na estrutura tridimensional da molécula da enzima, especialmente no sítio ativo, provavelmente tornaram o centro ativo menos acessível, causando uma redução da atividade catalítica decorrente desta imobilização multipontual (Cardoso *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em suportes heterofuncionais (Epoxy-Glyoxyl-Agarose) e (MANAE-Agarose). Sendo rendimento de imobilização ( $R_I$ ), atividade recuperada ( $At_R$ ).

Enzimas	Suportes	$R_I$ (%)	$At_R$ (%)
LAI-DH10B	Epoxy-Glyoxyl-Agarose	70,2	19,8
	MANAE-Agarose	93,5	110,4
LAI-BL21	Epoxy-Glyoxyl-Agarose	85,9	42,1
	MANAE-Agarose	80,8	53,0

### 3.2. Imobilização da (L-AI) em Epoxy-Glyoxyl-Agarose e MANAE-Agarose, seguida de Reticulação com Glutaraldeído

A fim de estabilizar a proteína multimérica L-AI no suporte após imobilização, estudaram-se estratégias utilizando glutaraldeído como agente reticulador. O glutaraldeído tem sido muito utilizado para introduzir ligações intramoleculares em proteínas ou para modificar proteínas que foram adsorvidas em suportes aminados (Vieira, 2009; Betancor *et al*, 2006; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1999).

Nota-se que nas imobilizações das L-AIs conduzidas covalentemente em Epoxy-Glyoxyl-Agarose e posteriormente reticuladas com glutaraldeído, foi possível verificar valores de atividade recuperada da ordem de 11,1 - 25,3 % e 26,6 - 64,4 % para as LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente (Tabela 2), observando-se uma redução significativa da atividade recuperada de acordo com o aumento da concentração do agente de reticulação para 0,15 % e 0,50 %. Segundo Vieira (2009) quanto maior a concentração de glutaraldeído provavelmente ocasiona maior distorção da enzima, resultando em uma atividade recuperada reduzida, devido à alta reatividade do glutaraldeído. Nos valores de atividade recuperada para os derivados reticulados com 0,03 % de glutaraldeído (Tabela 2), ocorreu um acréscimo na atividade recuperada para 25,3 % e 64,4 % para as LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente, comparados com atividade recuperada inicial (Tabela 1).

Para a LAI-DH10B adsorvida em suporte MANAE-Agarose após a reticulação do sistema enzima-suporte com glutaraldeído verificou-se que com o crescente aumento da concentração do agente de reticulação (0,03, 0,15 e 0,50 %), a atividade recuperada decresceu de 110,4 % para 89,6, 61,0 e 55,3 %, respectivamente. Para LAI-BL21 adsorvida em suporte MANAE-Agarose e reticulada com glutaraldeído, nas concentrações 0,03 e 0,50 %, favoreceram para o aumento da atividade recuperada na ordem de 53,0% para 65,7 e 63,9 %, respectivamente. No entanto, os valores de atividade recuperada para os derivados reticulados com 0,15 % de glutaraldeído, apresentaram um pequeno decréscimo em sua atividade para 48,2 %.

Tabela 2 - Influência da concentração de glutaraldeído na reticulação dos derivados em (Epoxy-Glyoxyl-Agarose) e (MANAE-Agarose). Sendo atividade recuperada ( $At_R$ ).

Enzimas	Suportes	Concentração de glutaraldeído (%)	$At_R$ (%)
LAI-DH10B	Epoxy-Glyoxyl-Agarose	0,03	25,3
		0,15	17,5
		0,50	11,1
LAI-BL21		0,03	64,4
		0,15	26,6
		0,50	35,2
LAI-DH10B	MANAE-Agarose	0,03	89,6
		0,15	61,1
		0,50	55,3
LAI-BL21		0,03	65,8
		0,15	48,2
		0,50	63,9

## 4. CONCLUSÃO

Com o intuito de obter derivados mais estáveis foi empregada a técnica de entrecruzamento da enzima com glutaraldeído, após a imobilização. De acordo com os resultados obtidos, após o entrecruzamento, foi verificado que, utilizando maiores concentrações do agente reticulador, a atividade recuperada algumas vezes decresceu mostrando que a etapa de reticulação distorceu a estrutura ativa da enzima. No entanto, a melhor condição para esse estudo foi utilizando menores concentrações de glutaraldeído (0,03%), observado pelo percentual de retenção da enzima no suporte, com melhores resultados utilizando o suporte MANAE-Agarose.

## 5. REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S. Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. Tese de doutorado em engenharia química, *Universidade Federal De São Carlos – SP*, 2008.

ALMEIDA, G. G. Estudo de N-metilformamida em Meio não Aquoso. O caso NMF-Acetona. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Estadual Paulista-UNESP, 2011.

BECARO, A.A. Imobilização/Estabilização de D-hidantoinase para a produção de N-Carbamoil-D-Fenilglicina. Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGOS, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, M.J. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877-882, 2006.



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

BOLÍVAR, J. M.; ROCHA-MARTIN, J.; GODOY, C.; RODRIGUES, R. C. AND GUISÁN, J. M. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Process Biochemistry*, 45: 107-113, 2010.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSSELL, C. M.; RODRÍGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISAN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* 15:546-550, 1993.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARÍNO, A.; OVSEJEVI, K.; FRANCISCO BATISTA; GUISAN, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7: 181-189, 1999.

GONÇALVES, L. R. B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., GIORDANO, R. L. C. A Kinetic Study of Synthesis of Amoxicillin Using Penicillin G Acylase Immobilized on Agarose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84–86: 931-944, 2000.

HONG Y. H.; LEE D. W.; LEE S. J.; CHOE E. A.; KIM S. B.; LEE Y. H.; CHEIGH C. I.; PYUN Y. R. production of d-tagatose at high temperatures using immobilized *Escherichia coli* cells expressing L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnol Lett.* 29: 569–574, 2007.

HUNG, X-G., TSENG, W-C., LIU, S-M., TZOU, W-S., FANG, T-Y. Characterization of a thermophilic L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biochemical Engineering J.* 83, 121–128, 2014.

KADDOUR, S.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; SADOON, T.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Preparation of an immobilized-stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: the effect of Zn<sup>2+</sup> on enzyme stability. *J Mol Catal B: Enzym.* 55: 142–145, 2008.

LEVIN, G. V.; ZEHNER, L. R.; SAUNDERS, J. P.; BEADLE, J.R. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1161S–1168S, 1995.

LIVESEY, G.; BROWN, J. C. D-Tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. *J. Nutr.* 126:1601–1609, 1996.

MARZUR, A. W. Functional sugar substitutes with reduced calories. (1989) EP 341062.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F; ET AL. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol.* 39: 274–80, 2006.

MEN, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, L.; KANG, Z.; IZUMORI, K.; SUN, Y.; MA, Y. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. *Microbiol Res.* 169 (2):171–178, 2014.

PESSELA, B.C.C. Ingeniería de Biocatalizadores y Bioprocesos:  $\beta$ -Galactosidasa de *Thermus sp.*, Cepa T2. Tese de doutorado em Ciências Químicas, *Universidad Politécnica de Madrid*, Espanha, 2002.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; FILHO, M.; CARRASCOSA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: purification, reversible

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

immobilization and stabilization of thermophilic and galactosidases. *Enzyme Microb Technol.* 40:242–8, 2007.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; FILHO, M.; CARRASCOSA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. *Process Biochem.* 43:193–8, 2008.

RODRIGUES, R. S. B. Produção e caracterização de um biocatalizador heterogêneo para ser utilizados em aplicações industriais. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, 2009.

SOUSA, M. Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de d-tagatose por l-arabinose isomerase. Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Engenharia Química, 2015.

TORRES, P. R., MANZO, R. M., RUBIOLO, A. C., BATISTA-VIEIRA, F. D., MAMMARELLA, E. J. Purification of an L-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 102: 99–105, 2014.

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. *Universidade Federal de São Carlos*, SP, 2009.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

