



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)

CAMILLA SALVIANO BEZERRA ARAGÃO

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E L-ARABINOSE ISOMERASE EM
AGAROSE VISANDO A PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE**

FORTALEZA

2018

CAMILLA SALVIANO BEZERRA ARAGÃO

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E L-ARABINOSE ISOMERASE EM
AGAROSE VISANDO A PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

- A67li Aragão, Camilla Salviano Bezerra.
Imobilização de β -galactosidase e L-arabinose isomerase em agarose visando a produção integrada de D-tagatose / Camilla Salviano Bezerra Aragão. – 2018.
93 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Imobilização. 2. β -galactosidase. 3. L-arabinose isomerase. 4. Agarose. 5. Co-imobilização. I. Título.

CDD 572

CAMILLA SALVIANO BEZERRA ARAGÃO

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E L-ARABINOSE ISOMERASE EM
AGAROSE VISANDO A PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 23/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

À Deus.

AGRADECIMENTOS

Para que eu pudesse chegar até este momento tão especial e dedicar meus agradecimentos, muita luta e obstáculos foram vencidos. Mas eu nada conseguiria sem a força que me levanta em todos os momentos e que vem do meu Senhor Deus misericordioso.

Aos meus pais, Ilma e Henrique Salviano, meu agradecimento eterno pelo amor, orgulho e apoio em todos os momentos. Com vocês aprendi a sempre buscar ser uma pessoa melhor a cada dia, sempre com muita honestidade, caráter e índole.

Ao meu querido irmão, exemplo de pesquisador e professor em minha vida, bem como obrigada pelo presente maior que me deu: Nicolas!

Ao meu amado marido Ricardo, que sempre muito sábio e paciente me ensinou muito e perseverou junto comigo todo e qualquer desafio que surgisse. Sua bondade me inspira a cada dia, me tornando uma pessoa melhor.

Ao presente e milagre de Deus em minha vida, Sofia. Minha filha, não sou capaz de expressar qualquer sentimento sem me emocionar devido tamanho amor que tenho por você. Sua vida trouxe mais brilho, alegria e amor para todos, mas em especial, trouxe motivação para que eu sempre faça o melhor por você!

À minha avó, tias, tios, primos, sogros, cunhadas e sobrinhos, muito obrigada.

À Professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa GPBIO me dando a oportunidade de crescer como pesquisadora, professora e mulher. Muitos foram os momentos que me fez acreditar que seria possível, sempre com seu jeito delicado, mas ao mesmo tempo firme. Todo meu carinho e respeito pela orientadora sábia, bondosa e paciente que sempre foi.

Ao Professor Dr. Wellington Sabino Adriano por todo conhecimento e amizade durante meu mestrado, perdurando por toda minha vida.

Aos membros da banca: Professora Dra. Valderez Ponte, Professora Dra. Sueli Rodrigues, Professora Dra. Rílvia Santiago e Professor Dr. José Cleiton.

Aos queridos amigos que fiz no Programa RENORBIO, em especial Karine e Rosane.

Ao GPBIO por todo acolhimento, troca de conhecimentos e parcerias. Lugar onde me desenvolvi como pesquisadora além de firmar grandes amizades, em especial: Marylane, Jessyca, Jocélia, Ticiane, Carlinha, Kamilly e Kênia.

Aos funcionários, amigos, colegas e professores do DEQ/UFC, pela ótima convivência.

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano pelo incentivo à qualificação do servidor, concedendo afastamento integral para a conclusão deste curso. Meu muito obrigada a todos os colegas e amigos do Campus Salgueiro.

À FUNCAP e CNPq pelo financiamento com bolsa e investimentos para este estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 23038.027432/2009-82.

À Universidade Federal do Ceará, RENORBIO e Departamento de Engenharia Química, por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de doutora.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

O objetivo desta tese foi imobilizar as enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (LAC) e L-arabinose isomerase *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B (LAI) em agarose como proposta para produção integrada de D-tagatose. Seguiu-se com duas estratégias: imobilização das enzimas LAC e LAI em suportes a base de agarose, DEAE (Dietilaminoetil) e MANAE (Monoaminoetil-N-Etil), e por último, Glioxil agarose 6 BCL (6 % de partículas de agarose reticulada). A primeira etapa da pesquisa consistiu em imobilizar as enzimas separadamente por adsorção em suportes DEAE e MANAE em tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7, suplementado com MnCl_2 0,1 mM, sob pH 7,0 e temperatura ambiente. Os biocatalisadores apresentaram Rendimento de Imobilização acima de 89 %, com destaque para os biocatalisadores imobilizados em MANAE. O uso deste suporte também se mostrou mais vantajoso ao observar uma maior taxa de bioconversão, tanto para LAC como LAI (98,7 e 6,6 %, respectivamente). Os biocatalisadores LAC e LAI apresentaram valores superiores para $V_{\text{máx}}$, 1,3 e 0,09 $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente, quando imobilizados em MANAE e DEAE, respectivamente. Na segunda etapa desta tese, as enzimas LAC e LAI foram imobilizadas via ligação multipontual em suporte Glioxil agarose 6BCL com concentrações de grupamentos aldeído nos suportes de 75 e 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, em tampão bicarbonato de potássio 100 mM suplementado com 0,1 M de KCl e 0,1 mM de MgCl_2 , sob pH 10,0. A metodologia vislumbrou a aplicação dos biocatalisadores em ensaios de co-imobilização, uma vez que apresentou rendimento de imobilização acima de 98 %, bem como $t_{1/2}$ 100 e 900 min e bioconverções de 96 e 5,8 % para as enzimas LAC e LAI, respectivamente. As enzimas co-imobilizadas foram analisadas quanto à produção integrada de D-tagatose a partir de D-lactose como também soro de queijo, atingindo em ambos os casos 1,4 mM de D-tagatose produzida. Assim, o estudo alcança novas vertentes para a obtenção de D-tagatose.

Palavras-chave: imobilização; β -galactosidase; L-arabinose isomerase; agarose; co-imobilização.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to immobilize the enzymes *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase (LAC) and *Enterococcus faecium* L-arabinose isomerase expressed in *E. coli* DH10B (LAI) onto agarose as a proposal for D-tagatose integrated production. Followed by two strategies: immobilization enzymes LAC and LAI onto agarose-based supports, DEAE (diethylaminoethyl) MANAE (Monoaminoethyl-N-Ethyl), and lastly, 6 BCL glyoxyl agarose (6 % cross-linked agarose particles). The first step of the research consisted in immobilizing the enzymes separately by adsorption on DEAE and MANAE supports in 5 mM potassium phosphate buffer, pH 7, supplemented with 0.1 mM MnCl_2 at pH 7.0 and room temperature. The biocatalysts presented immobilization yield above 89 %, especially the biocatalysts immobilized in MANAE. This support was also more advantageous when observing a higher rate of bioconversion for both LAC and LAI (98.7 and 6.6 %, respectively). The LAC and LAI biocatalysts presented higher values for V_{\max} , 1.3 and 0.09 $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively, when immobilized in MANAE and DEAE, respectively. In the second step, the enzymes LAC and LAI were immobilized via multipoint binding in support of Glyoxyl-agarose 6BCL with concentrations of aldehyde groups of 75 and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, in 100 mM potassium bicarbonate buffer supplemented with 0.1 M KCl and 0.1 mM MgCl_2 , at pH 10.0. The methodology manifested the application of biocatalysts in co-immobilization assays, since it presented immobilization yield above 98 %, and $t_{1/2}$ 100 and 900 min and 96 and 5.8 % bioconversions for LAC and LAI enzymes, respectively. The co-immobilized enzymes were analyzed for the integrated production of D-tagatose from D-lactose as well as cheese whey, reaching in both cases 1.4 mM of D-tagatose. Thus, the study reaches new approaches for obtaining D-tagatose.

Keywords: immobilization; β -galactosidase; L-arabinose isomerase; agarose; co-immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural da molécula de D-lactose.....	25
Figura 2 – Representação estrutural da molécula de D-tagatose.....	26
Figura 3 – Esquema representativo de reação enzimática em cascata paralela.....	28
Figura 4 – Bioconversão de D-lactose em D-galactose catalisada pela enzima β -galactosidase.....	29
Figura 5 – Bioconversão de D-galactose em D-tagatose catalisada pela enzima L-arabinose isomerase.....	30
Figura 6 – Métodos de imobilização de enzimas. E = Enzima.....	32
Figura 7 – Efeito da co-imobilização na cinética de um processo multi-enzimático...	35
Figure 8 – Fluxograma demonstrativo do processo de co-imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suporte Glioxil-agarose 6 BCL.....	44
Figura 9 – Curso de imobilização (%) das enzimas β -galactosidase (A) e L-arabinose isomerase (B) em suportes DEAE-Agarose e MANAE-Agarose por um período de incubação de 30 minutos a 3 horas. DEAE-LAC (■), MANAE-LAC (□), DEAE-LAI (▲) e MANAE-LAI (Δ).....	54
Figura 10 – Rendimento de imobilização (%) das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em DEAE-Agarose e MANAE-Agarose. Carga enzimática imobilizada (■) e concentração de proteínas imobilizada (■), ao final de 3 h (DEAE-LAC e MANAE-LAC) e 1 h (DEAE-LAI e MANAE-LAI) de incubação.....	56
Figura 11 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam pontos experimentais e as linhas o ajuste de um modelo sigmoidal (A, C e D) e hiperbólico (B), usando o software Origin 8.1. DEAE-LAC (A) e MANAE-LAC (B) incubados em D-lactose, DEAE-LAI (C) e MANAE-LAI (D) incubados em D-galactose, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$, sob 50 °C.....	59
Figura 12 – Bioconversão de D-lactose (■) em D-galactose (●) através do uso de DEAE-LAC (A) e MANAE-LAC (B); Bioconversão de D-galactose (●)	61

- em D-tagatose (▲) através do uso de DEAE-LAI (C) e MANAE-LAI (D).....
- Figura 13 – Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), a 12%, para verificar desprendimento de subunidades das proteínas que não foram estabilizadas aos suportes DEAE e MANAE. M- Padrão de baixo peso molecular, 1- Derivado DEAE-LAC, 2- Derivado DEAE-LAI, 3 - MANAE-LAC, 4 - MANAE-LAI..... 63
- Figura 14 – Síntese enzimática de D-galactose através dos derivados GLI-6BCL-LAC com (A) 75 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e (B) 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Tempo de imobilização: (■) 3 e (○) 5 h. Substrato D-lactose 146 mM (5 %, m/v) em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante..... 67
- Figura 15 – Síntese enzimática de D-tagatose através dos derivados GLI-6BCL-LAI com (A) 75 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e (B) 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Tempo de imobilização: (■) 3 e (○) 5 h. Substrato D-galactose 50 mM em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante..... 68
- Figura 16 – Estabilidade ao pH dos biocatalisadores (■) GLI-6BCL-LAC_{200/5} e (○) GLI-6BCL-LAI_{200/5}, incubados em pH 5,5 a 10,0, por 24 horas, sob temperatura ambiente (25 °C)..... 73
- Figura 17 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam pontos experimentais e as linhas o ajuste de um modelo hiperbólico usando o software Origin 8.1. (A) GLI-6BCL-LAC_{200/5} e (B) GLI-6BCL-LAI_{200/5} incubados em D-lactose e D-galactose, respectivamente, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m , mM). Velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$, mM.min⁻¹) 75
- Figura 18 – Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), a 12%, para verificar desprendimento de subunidades das proteínas que não foram estabilizadas ao suporte Glioxil-Agarose. M- Padrão de baixo peso molecular, 1- Derivado GLI-6BCL-LAC_{200/5}, 2- Derivado GLI-6BCL-LAI_{200/5}..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização de β -galactosidase e L-arabinose isomerase em DEAE-Agarose e MANAE-Agarose. Solução tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7, suplementado com $MnCl_2$ 0,1 mM. Rendimento de imobilização (RI, %), atividade recuperada (At_r , %) e atividade do derivado (At_d , $U.g^{-1}$ de suporte).....	56
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores DEAE-LAC e DEAE-LAI em D-lactose, MANAE-LAC e MANAE-LAI em D-galactose, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$, sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m), Velocidade máxima de reação (V_{max})	58
Tabela 3 – Parâmetros de imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suportes GLI-6BCL com 75 e 200 $\mu mol.mL^{-1}$ de grupos aldeído, com 3 e 5 h de incubação. Carga oferecida de 40 e 20 mg de proteína. g^{-1} suporte, LAC e LAI, respectivamente, em tampão 100 mM bicarbonato de potássio suplementado com 0,1 M de KCl e 0,1 mM de $MgCl_2$, pH 10,0. Rendimento de imobilização (RI, %) e atividade do derivado (At_d , $U.g^{-1}$ de suporte)	65
Tabela 4 – Estabilidade térmica das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase imobilizadas em suportes GLI-6BCL com 75 e 200 $\mu mol.mL^{-1}$ de grupos aldeído, com 3 e 5 h de incubação. Incubação sob 50 e 60 °C em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$. Constante de desativação (K_d , min^{-1}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min)	70
Tabela 5 – Estabilidade ao pH dos biocatalisadores GLI-6BCL-LAC _{200/5} e GLI-6BCL-LAI _{200/5} , incubados em pH 5,5 a 10,0, por 24 horas, sob temperatura ambiente (25 °C)	74
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores GLI-6BCL-LAC _{200/5} e GLI-6BCL-LAI _{200/5} , em D-lactose e D-galactose, respectivamente,	76

em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$, sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m),
Velocidade máxima de reação (V_{max})

Tabela 7 – Análise comparativa dos derivados desenvolvidos a partir do suporte glioxil-agarose com $200 \mu mol.mL^{-1}$ de grupos aldeído, em 3 e 5 horas de incubação das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO	Demanda Bioquímica por Oxigênio
DEAE-LAC	β -galactosidase imobilizada em suporte Agarose-DEAE
DEAE-LAI	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose-DEAE
DQO	Demanda Química por Oxigênio
E	Enzima
ϵ	Coefficiente de extinção molar, cm^2 .
FAO	Food and Agriculture Organization / Organização de Agricultura e Alimentação
GLI-6BCL-LAC	β -galactosidase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL
GLI-6BCL-LAC _{200/3}	β -galactosidase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído , por 3 horas de incubação
GLI-6BCL-LAC _{200/5}	β -galactosidase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído , por 5 horas de incubação
GLI-6BCL-LAC _{75/3}	β -galactosidase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído , por 3 horas de incubação
GLI-6BCL-LAC _{75/5}	β -galactosidase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído , por 5 horas de incubação
GLI-6BCL-LAI	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL
GLI-6BCL-LAI _{200/3}	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, por 3 horas de incubação
GLI-6BCL-LAI _{200/5}	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, por 5 horas de incubação
GLI-6BCL-LAI _{75/3}	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, por 3 horas de incubação
GLI-6BCL-LAI _{75/5}	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Glioxil-Agarose 6BCL com $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, por 5 horas de incubação

	incubação
GRAS	Generally Recognized as Safe / Geralmente Reconhecido como Seguro
LAC	β -galactosidase
LAI	L-arabinose isomerase
MANAE-LAC	β -galactosidase imobilizada em suporte Agarose-MANAE
MANAE-LAI	L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose-MANAE
ONPG	o-nitrophenil β -D-galactopiranosido
P1	Produto número 1
P2	Produto número 2
S1	Substrato número 1
S2	Substrato número 2

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	20
2	CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Soro de queijo.....	24
2.2	Lactose.....	24
2.3	Tagatose.....	26
2.4	Enzimas.....	27
2.4.1	<i>β-galactosidase</i>.....	28
2.4.2	<i>L-arabinose isomerase</i>.....	30
2.5	Imobilização de enzimas.....	31
2.5.1	<i>Co-imobilização de enzimas</i>.....	35
2.6	Suportes para imobilização de enzimas.....	36
3	CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Material.....	40
3.2	Métodos.....	40
3.2.1	<i>Suporte Agarose-MANAE</i>.....	40
3.2.1.1	<i>Preparação do suporte Agarose-Epóxido</i>.....	40
3.2.1.2	<i>Preparação do suporte Agarose-Epóxido-Glioxil</i>.....	41
3.2.1.3	<i>Preparação do suporte Agarose-MANAE</i>.....	41
3.2.2	<i>Preparação do suporte Agarose 6 BCL-Glioxil</i>.....	41
3.2.3	<i>Imobilização das enzimas em Agarose-DEAE e Agarose-MANAE</i>.....	42
3.2.4	<i>Imobilização das enzimas no suporte glioxil-agarose 6 BCL</i>.....	43
3.2.5	<i>Análise de atividade da enzima β-galactosidase livre e imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE</i>.....	45
3.2.6	<i>Análise de atividade da enzima L-arabinose isomerase livre e imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE</i>.....	45
3.2.7	<i>Análise de atividade da enzima β-galactosidase livre e imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil</i>.....	46
3.2.8	<i>Análise de atividade da enzima L-arabinose isomerase livre e imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil</i>.....	47
3.2.9	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em</i>	47

	<i>suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....</i>	
3.2.10	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	48
3.2.11	<i>Hidrólise de D-lactose com a enzima β-galactosidase imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....</i>	48
3.2.12	<i>Isomerização de D-galactose com a enzima L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....</i>	49
3.2.13	<i>Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose da enzima β-galactosidase imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	49
3.2.14	<i>Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-galactose da enzima L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	49
3.2.15	<i>Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose e D-galactose das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	50
3.2.16	<i>Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	50
3.2.17	<i>Estabilidade ao pH das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	51
3.2.18	<i>Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil.....</i>	51
3.2.19	<i>Ensaio de SDS-PAGE.....</i>	51
4	CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Imobilização das enzimas em Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....	54
4.2	Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....	58
4.3	Hidrólise de D-lactose com a enzima β-galactosidase e isomerização de D-galactose com a enzima L-arabinose isomerase imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....	61
4.4	Estudo da interação das enzimas imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE.....	63
4.5	Imobilização das enzimas no suporte glioxil-agarose 6 BCL.....	64
4.6	Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose e D-galactose.....	67

4.7	Estabilidade térmica.....	69
4.8	Estabilidade ao pH.....	71
4.9	Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Glioxil-Agarose.....	74
4.10	Determinação da taxa de bioconversão direta de D-lactose em D-tagatose com biocatalisadores GLI-6BCL-LAC _{200/5} e GLI-6BCL-LAI _{200/5}	77
4.11	Determinação da taxa de bioconversão direta de D-lactose em D-tagatose com β -galactosidase e L-arabinose isomerase co-imobilizadas.....	78
4.12	Estabilidade operacional.....	80
4.13	Validação dos métodos de imobilização através de eletroforese SDS-PAGE.....	81
5	CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....	83
6	CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

No cenário atual, percebe-se o número crescente de pessoas em busca de mudança alimentar, investindo em produtos que auxiliem nesta necessidade, sobre tudo para àqueles que apresentam quadro clínico que os façam aderir a esta nova rotina, como por exemplo, portadores de diabetes. Neste viés, chama-se atenção para o uso de edulcorantes, os quais são adoçantes isentos de calorias ou ainda de baixa caloria, considerados como benéficos à saúde uma vez que comunicam o sabor doce com baixas calorias e isento de efeitos glicêmicos (MEYER-GERSPACH; WÖLNERHANSEN; BEGLINGER, 2016).

Dentre os seis edulcorantes aprovados pela FDA como GRAS (Generally Recognized as Safe), compostos geralmente considerados seguros, pode-se destacar o monossacarídeo D-tagatose (Meyer-Gerspach *et al.*, 2016), uma rara hexo-cetose natural, sendo sua produção maciça dependente de síntese, a qual já é realizada (800 toneladas por ano) por via enzimática (Imobilização da enzima L-arabinose isomerase) pela empresa Belga Nutrilab NV (XU *et al.*, 2014, 2016) a partir de D-galactose obtida de soro de queijo, por exemplo (FRANÇOIS *et al.*, 2013). Frente a estas características, o uso de D-tagatose tem sido inserido cada vez mais nas indústrias de alimentos e bebidas (XU *et al.*, 2014), além de poder ser considerado como um fármaco no auxílio ao tratamento de diabetes do tipo II diante dos seus benefícios (Lu, *et al.*, 2008).

Como mencionado, para a obtenção de D-tagatose pode-se proceder com a síntese via enzimática a partir da isomerização de D-galactose através da enzima intracelular multimérica L-arabinose isomerase (EC 5.3.1.4) (Manzo *et al.*, 2015; De Sousa, 2015). Esta via biológica para obtenção de D-tagatose proporciona vantagens com relação ao processo químico, haja vista se tratar de um processo mais simples, com maiores rendimentos, ambientalmente favorável e de menor custo, com potencial de aplicação em indústrias alimentícias e farmacêuticas (BORTONE; FIDALEO, 2015; NETA *et al.*, 2012; RHIMI *et al.*, 2007).

Substrato para produção de D-tagatose, D-galactose é um monossacarídeo com baixo poder de doçura quando comparado ao anterior, o qual pode ser considerado como uma fonte barata, uma vez que sua obtenção pode ocorrer a partir da hidrólise da D-lactose, presente no soro de leite, por exemplo (BORTONE; FIDALEO, 2015; XU *et al.*, 2016), com

o emprego da enzima multimérica β -galactosidase (EC 3.2.1.23), a qual é extensivamente utilizada em outros estudos (BEZERRA, 2012; DE ALBUQUERQUE et al., 2016; LIMA et al., 2013). Por sua vez, o efeito da aplicação desta enzima permite ainda o consumo de produtos livres de lactose por pessoas intolerantes a este monossacarídeo (HAIDER; HUSAIN, 2009).

Atualmente existem estudos com o uso destas enzimas de interesse em suas formas solúvel e imobilizada (Bezerra, 2012; Lima *et al.*, 2013; Manzo *et al.*, 2015; De Sousa, 2015; Xu *et al.*, 2016), contudo, como foco desta tese, destaca-se o uso de enzimas imobilizadas devido vantagens como: fácil operação e controle do reator, mais fácil recuperação e purificação do produto, escolha mais ampla de reatores, reuso do biocatalisador e diminuição nas despesas do processo (GUISAN, 2006; KATCHALSKI-KATZIR, 1993; KIRTHIGA et al., 2016).

Neste âmbito, percebe-se que estudos que viabilizem a aplicação de biocatalisadores das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em um processo direto, ou seja, produção de D-tagatose a partir de D-lactose, podem gerar grandes impactos econômicos, tecnológicos e ambientais nos processos industriais. Um processo direto proporciona, por exemplo, economia de tempo e custo em menos etapas operacionais, diminuição ou extinção de efeitos de inibição pelo produto D-galactose e geração de um co-produto (D-tagatose) a partir do soro de leite, o qual é considerado desperdício industrial devido ao alto custo de seu tratamento não viabilizar sua utilização.

O Grupo de Pesquisas em Processos Biotecnológicos – GPBio vem desenvolvendo pesquisas com as enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase desde 2008, através da imobilização em diferentes suportes. Fontes comerciais e não comerciais da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* tem sido abordadas em diferentes estudos (BEZERRA, 2012; DE ALBUQUERQUE et al., 2016; LIMA et al., 2013), sendo a fonte comercial, Lactozime 2600 L (Sigma) a mais estudada recentemente.

Estudos iniciais eram realizados com a enzima L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* em sua forma nativa, fornecendo baixas atividades catalíticas, mesmo quando imobilizadas (MANZO et al., 2015; TORRES et al., 2014). Em 2014, através de colaboração do Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos (CSIC, Madri, Espanha), modificações na forma nativa da enzima L-arabinose isomerase foram realizadas

através da expressão em *E. coli*, promovendo incremento na atividade enzimática do biocatalisador (DE SOUSA et al., 2017). Com isso, estudos de imobilização foram realizados para transformar a enzima de sua forma solúvel para insolúvel.

Como progresso dos estudos acerca destas enzimas, a co-imobilização vem como estratégia promissora para obtenção do monossacarídeo alvo do estudo, D-tagatose. Além deste potencial, a metodologia tem destaque devido seu caráter inédito, uma vez que a co-imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose não é relatada em trabalhos científicos.

Assim, a presente tese teve como objetivo desenvolver biocatalisadores das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suportes a base de agarose voltados para sua aplicação na forma de co-imobilizados em busca da produção integrada de D-tagatose a partir de D-lactose presente em soro de leite, o qual muitas vezes é lançado ao meio ambiente sem o tratamento adequado, gerando prejuízos econômicos e ambientais. Neste intuito, espera-se a obtenção de um produto de alto valor agregado, visto o elevado valor comercial do edulcorante D-tagatose, a partir de um rejeito da própria indústria de alimentos, soro de leite.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soro de queijo

O queijo é vastamente produzido em todo o mundo, alcançado a marca de 20,4 milhões de toneladas ao longo do ano de 2012 (MIKKELSEN, 2014). O Brasil detém um amplo mercado de indústrias de processamento de queijo, o qual atingiu 699 mil toneladas em 2012 (MIKKELSEN, 2014). Esta elevada produção cada vez mais crescente gera paralelamente o soro de queijo, o qual representa um potencial rejeito industrial. Cerca de 47 % de soro produzido em um ano, durante a fabricação de queijo, é descartado em todo o mundo (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008).

O soro de queijo apresenta elevado valor de Demanda Bioquímica por Oxigênio (DBO), em torno de 30 a 60 kg/m³, e Demanda Química por Oxigênio (DQO), entre 60 e 80 kg/m³, devido em grande parte a porção de massa do dissacarídeo D-lactose presente (4,5 a 5,0 %), configurando-se como um rejeito poluente (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018; GRBA et al., 2002; HATZINIKOLAOU et al., 2005). Desta forma, requer-se um tratamento de resíduos para que o impacto ambiental seja amenizado, o que se torna um processo extra e oneroso, principalmente para pequenas indústrias fabricantes de queijo. Quando este procedimento é negligenciado, o soro de queijo pode causar poluição ao penetrar nas correntes de águas locais (SEN; RAY; CHATTOPADHYAY, 2012).

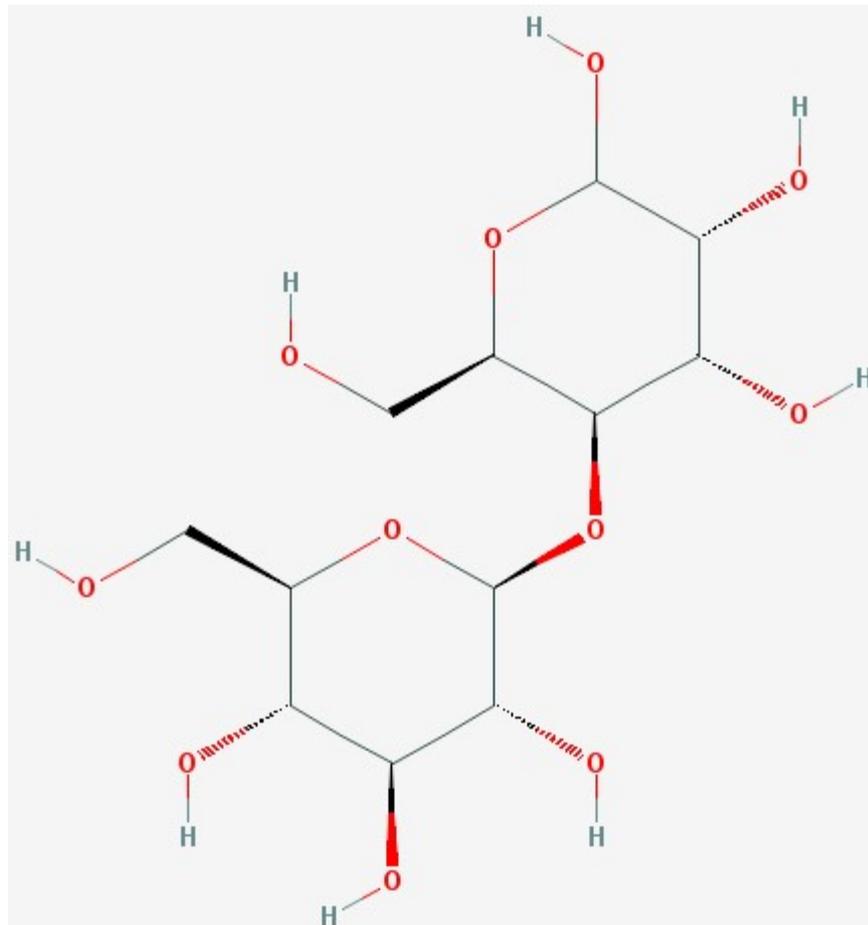
O aproveitamento deste subproduto, soro de queijo, além de amenizar o impacto ambiental, pode transformá-lo em um co-produto, agregando valor ao produto final (MISSON et al., 2016). Através da hidrólise do soro de queijo, fonte de açúcares de baixo custo, renováveis e fermentáveis, diversas aplicações podem ser feitas com os monossacarídeos obtidos (D-galactose e D-glicose), como produção de moléculas de valor agregado ou produtos livres de D-lactose (OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011; SAINI et al., 2017; SEN; RAY; CHATTOPADHYAY, 2012).

2.2 Lactose

Lactose (D-lactose), conhecido como açúcar do leite, majoritariamente presente no soro de queijo (GRBA et al., 2002), está representado pela Figura 1. Sua estrutura é

composta por dois monossacarídeos, D-galactose e D-glicose, unidos através de uma ligação glicosídica β -L-4 (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; SHENDURSE; KHEDKAR, 2016).

Figura 1 – Representação estrutural da molécula de D-lactose



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2018a).

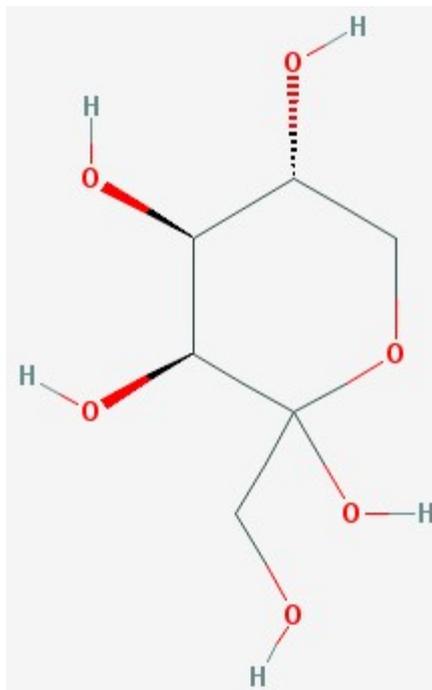
Por apresentar baixa solubilidade na maioria dos solventes e ser um açúcar higroscópico e formar cristalização indesejada em preparos, o uso de lactose torna-se inviável para muitas aplicações industriais. Além disso, seu consumo não é permitido por pessoas intolerantes à lactose, devido à ausência da enzima lactase, deficiência que afeta grande parcela da população mundial (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018; SEN; RAY; CHATTOPADHYAY, 2012; SILVÉRIO et al., 2018).

A partir da hidrólise de D-lactose, pelo uso da enzima β -galactosidase, pode-se obter açúcares de maior poder de doçura e melhor solubilidade, permitindo uma adequada aplicação no processamento de diversos alimentos (SILVÉRIO et al., 2018).

2.3 Tagatose

Tagatose (D-tagatose) é uma rara hexocetose natural, isômera do monossacarídeo D-galactose (Figura 2) (OH, 2007). Dado o seu baixo valor calórico, $1,5 \text{ kcal.g}^{-1}$, é considerada um edulcorante, sem sabor residual ou efeito de resfriamento (MANJASETTY; CHANCE, 2006; OH, 2007; PATEL et al., 2017). Seu poder de doçura equivale a 92 % ao da sacarose, açúcar de alto valor calórico (40 kcal.g^{-1}), em solução 10 % (m/v) (LEVIN, 2002; MANJASETTY; CHANCE, 2006).

Figura 2 – Representação estrutural da molécula de D-tagatose



Fonte: National Center For Biotechnology Information (2018b).

O consumo de D-tagatose é permitido desde 2001 pela Food and Agriculture Organization (FAO) por ser considerado um alimento seguro (Generally Recognized As Safe

– GRAS) (LEVIN, 2002), podendo ser aplicado tanto individualmente, como também combinado com outros edulcorantes em alimentos e bebidas, visando redução de calorias. Seu uso também pode ser aplicado a cosméticos e medicamentos (LEE et al., 2004; OH, 2007).

Devido à compatibilidade do monossacarídeo D-Tagatose em uma extensa quantidade de alimentos e suplementos dietéticos com ricos benefícios para a saúde, uma imediata bioprodução comercial de d-tagatose é necessária (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017). Uma via de obtenção que tem sido largamente estudada é a rota enzimática com o uso da enzima L-arabinose isomerase (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017; LIM; KIM; OH, 2008; MANZO et al., 2015; OH et al., 2001). Segundo Torres et al. (2014) os processos biotecnológicos para bioconversão de D-tagatose requerem o desenvolvimento de estratégias simples de purificação deste produto.

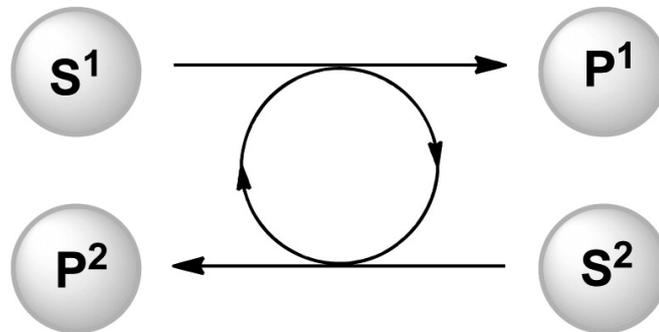
2.4 Enzimas

Enzimas são catalisadores naturais presentes em animais, plantas e micro-organismos, as quais catalisam diversas transformações vitais para o funcionamento dos organismos com alta seletividade e especificidade (HOMAEI et al., 2013; LOPEZ-GALLEGO; SCHMIDT-DANNERT, 2010). Avanços recentes em biotecnologia, principalmente em engenharia de proteínas, têm desenvolvido eficientemente o melhoramento das propriedades das enzimas, conferindo novas aplicações e sínteses químicas mais eficientes e mais limpas, adequadas com a química verde. (HOMAEI et al., 2013).

Estas bioconversões podem ser alcançadas por uma enzima, a qual realiza uma reação específica de cada vez, ou mais de uma enzima realizando diversas conversões para obter o produto desejado, promovendo reações em cascata (LOPEZ-GALLEGO; SCHMIDT-DANNERT, 2010; OSMAN et al., 2014; SIMON et al., 2014).

A Figura 3 apresenta esquema de um dos tipos de reação em cascata, com formação de dois produtos concomitantemente.

Figura 3 – Esquema representativo de reação enzimática em cascata paralela



Fonte: (SIMON et al., 2014)

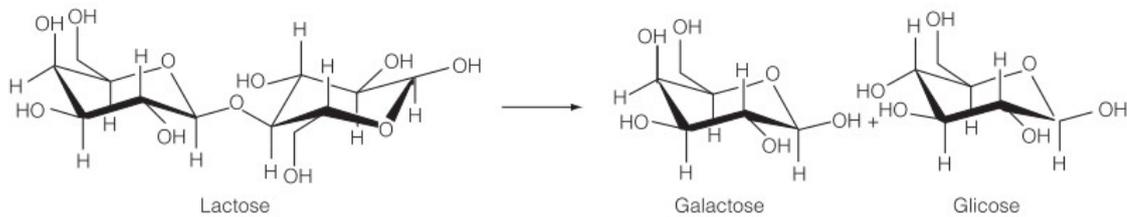
Reações enzimáticas em cascata têm sido de grande interesse, uma vez que encurtam etapas de síntese convencional de forma eficiente e sofisticada, gerando menor tempo de reação, menos manipulações e reduzindo o desperdício, dentre outras vantagens (JI et al., 2016).

A aplicação de duas enzimas em uma mesma reação é conveniente em uma reação de cascata, porém, promove esquemas de síntese de alta robustez e complexidade (LOPEZ-GALLEGO; SCHMIDT-DANNERT, 2010; ZAAK et al., 2017). Por este fato, torna-se necessário que ambos biocatalisadores comuniquem estabilidade e atividade enzimática sob as mesmas condições de operação (ZAAK et al., 2017). Esta adequação também deve ser compatível com a estabilidade e solubilidade dos substratos e produtos envolvidos na reação, para que o equilíbrio termodinâmico seja deslocado pra direção desejada, (ZAAK et al., 2017).

2.4.1 β -galactosidase

β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma exoglicosidase, também conhecida como lactase, amplamente utilizada na hidrólise de D-lactose em D-galactose e D-glicose, desempenhando benefícios para a saúde e em aplicações industriais (CHANALIA et al., 2018; MARTINS; BURKERT, 2009; SILVÉRIO et al., 2018). A rota de hidrólise de D-lactose pela enzima β -galactosidase (LAC) pode ser vista na Figura 4.

Figura 4 – Bioconversão de D-lactose em D-galactose catalisada pela enzima β -galactosidase



Fonte: .MARTINS; BURKERT (2009)

Além de ser vastamente disponível na natureza, a enzima β -galactosidase (LAC) pode ser obtida a partir de diversas fontes de micro-organismos. Devido a isso, distintas propriedades (estabilidade térmica ao pH, atividade enzimática e condições ideais de ensaio, por exemplo) serão influenciadas de acordo com o micro-organismo de origem (SEN; RAY; CHATTOPADHYAY, 2012).

Micro-organismos como fonte desta enzima possuem maior facilidade e rendimento de obtenção, além de ser mais importante tecnologicamente, quando comparados às fontes animal e vegetal (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008; RUBIO-TEXEIRA, 2006). Dentre os micro-organismos fonte da enzima β -galactosidase podemos citar *Kluyveromyces lactis* (BEZERRA, 2012; LIMA et al., 2016), *Kluyveromyces fragillis* (VIEIRA et al., 2013), *Aspergillus oryzae* (DE ALBUQUERQUE et al., 2016).

β -galactosidases de origem de leveduras, como *Kluyveromyces*, são intituladas como Geralmente Reconhecidos como Seguros (Generally Recognized As Safe – GRAS), sendo considerado como uma vantagem para seu uso, especialmente para uso em indústrias de alimentos e farmacêuticas (RUBIO-TEXEIRA, 2006). Com relação à legislação brasileira, apenas fontes microbianas são liberadas para uso em indústrias de alimentos, dentre elas destaca-se a *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2014)

Reações hidrolíticas com β -galactosidases de *Kluyveromyces lactis* requerem condições ótimas brandas de pH e temperatura, 7,0 e 37 °C, respectivamente, o que influencia positivamente sua aplicação (BEZERRA, 2012; RAFAEL, 2014). β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, enzima tetramérica com peso molecular de 119 kDa (JOCHEMS et al., 2015; PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012), necessita ser suplementada com co-fatores para conferir melhor desempenho catalítico, como íons de Mn e Mg. A ocorrência de inibição

Uma das classificações dada às enzimas LAI é de acordo com a temperatura ótima de reação: mesófilas (30 a 50 °C), termófilas (60 a 80 °C) e hipertermófilas (85 a 90 °C) (OH, 2007). LAI mesófilas, assim como as termófilas, requerem suplementação com Mn^{2+} como co-fator para potencializar a taxa de reação de isomerização (PATRICK; LEE, 1969).

LAI de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B, é uma D-galacase isomerase hexamérica, com peso molecular de cada subunidade em torno de 66 kDa; apresenta Mn^{+2} como co-fator potencial devido a estabilização da estrutura da proteína durante sua aplicação; atinge sua atividade ótima sob a temperatura de 50 °C (devido sua origem mesófila); alcança valores de atividade máxima em pH 5,6 e 7,0. (DE SOUSA, 2015).

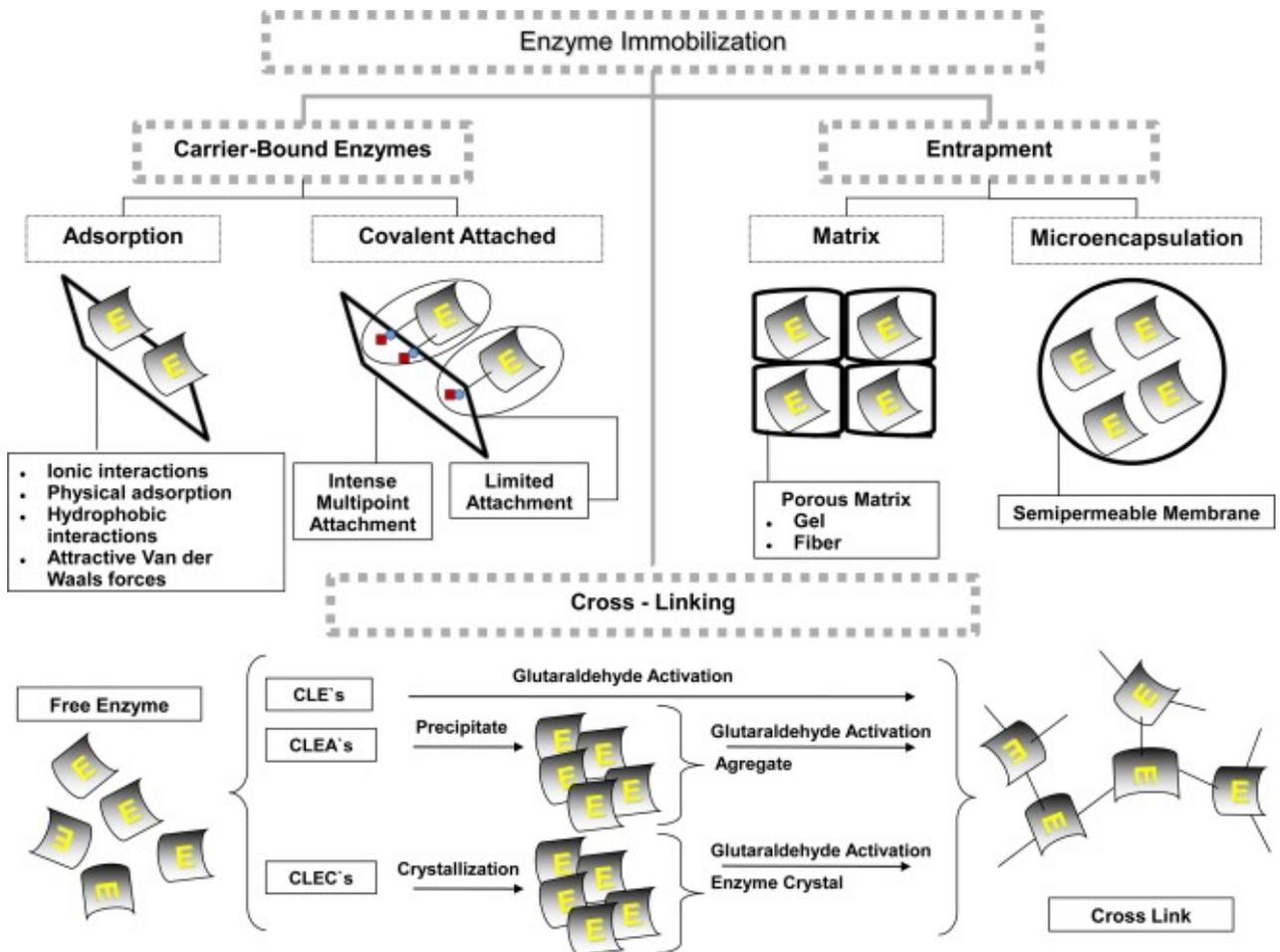
2.5 Imobilização de enzimas

Enzimas livres são relativamente sensíveis e instáveis, e não podem ser recuperadas e reutilizadas de forma eficiente. Estas características trazem desvantagens para sua aplicação em processos catalíticos. Assim novas estratégias vêm sendo buscadas, sendo a imobilização de enzimas em suporte sólido uma via extremamente estudada (GIORDANO et al., 2000; JI et al., 2016; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011; SANTOS et al., 2015), contornando as desvantagens do uso da enzima livre bem como promovendo efeitos positivos sobre a atividade e estabilidade enzimática. Uma técnica de imobilização adequada pode solucionar problemas relacionados às limitações enzimáticas (GARCIA-GALAN et al., 2011).

A Figura 6 apresenta os diversos métodos de imobilização relatados em estudos, dentre elas, imobilização por adsorção e covalente, onde as enzimas são imobilizadas em uma matriz inerte (STEPANKOVA et al., 2013).

Embora existam diversos métodos de imobilização de enzimas descritos e investigados, não se pode generalizar quanto à sua aplicação, ou seja, cada biocatalisador apresentará diferentes propriedades diante do método eleito, gerando uma forte ligação entre suporte e enzima (MENDES et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

Figura 6 – Métodos de imobilização de enzimas. E = Enzima



Fonte: (BEZERRA et al., 2015).

Imobilização por adsorção é um dos métodos mais utilizados, uma vez que é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES et al., 2011). Este método reversível é baseado em dispor uma solução enzimática em contato com uma superfície insolúvel em água (suporte de imobilização) para que ocorra a adsorção da maior concentração de proteínas dispostas, a depender de parâmetros como: natureza do suporte, pH, temperatura, tempo e concentração de enzima (EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013). As ligações formadas podem ser baseadas em ligações de van der Waals, interações eletrostáticas e / ou hidrofóbicas (STEPANKOVA et al., 2013).

A principal vantagem da imobilização por adsorção é a não necessidade de modificações pelo uso de reagentes, mas ocorrem interações relativamente fracas e reversíveis (HOMAEI et al., 2013). Esta reversibilidade pode ser vantajosa quando se busca a

reutilização do suporte envolvido. Além da facilidade de operação, outra vantagem é que as enzimas provavelmente não serão inativadas devido às condições brandas do método (EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013).

Imobilização por ligação covalente é estabelecida por meio de ligações químicas entre grupos funcionais presentes em dada enzima e suporte (STEPANKOVA et al., 2013), permitindo uma estabilização maior quando comparado à imobilização por adsorção, prevenindo o processo de dessorção da enzima (MENDES et al., 2011). Devido à característica de método de imobilização irreversível, apresenta como desvantagem a não possibilidade de reutilização do suporte após a inativação da enzima (SUESCUN et al., 2015).

A imobilização de enzimas via ligação covalente multipontual pode promover uma estabilização da estrutura tridimensional da enzima imobilizada, evidentemente, aliado a um suporte altamente ativado, tornando-se uma estratégia adequada para enzimas multiméricas, as quais sob determinadas condições podem sofrer desativação devido a dissociação de subunidades da sua estrutura (GUISAN, 2006). Este conceito é corroborado por diversos estudos (Bernal *et al.*, 2013; Manzo *et al.*, 2015; Pessela *et al.*, 2007; De Sousa, 2015) os quais revelam que enzimas multiméricas, como β -galactosidase e L-arabinose isomerase, ao serem imobilizadas via ligação covalente multimérica atingem resultados superiores em relação suas atividades enzimáticas.

Por se tratar de um método de imobilização complexo, diversos pontos devem ser avaliados para uma adequada aplicação, como, densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e sua geometria, buscando diminuir a formação de complexos inativos de enzima-suporte. Além disso, deve-se atentar que a estrutura ativa da enzima pode ser afetada, por conta da alteração do centro ativo (MENDES et al., 2011). Devido ser amplamente estudado, este método de imobilização é bem definido e disponível na literatura (EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013).

Apesar de derivados obtidos através deste método possibilitarem fácil manipulação e adaptação devido à grande variação física e química no suporte disponível, o processo tende muitas vezes a ser longo bem como podem surgir dificuldades quando aplicados em substratos de alto peso molecular (EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013)

A imobilização multipontual ou multisubunidade pode aumentar a rigidez estrutural da proteína e a estabilização das enzimas, o que evita a inativação relacionada com a dissociação (JI et al., 2016).

Segundo Santos et al. (2015) o tempo de imobilização multipontual deve ser mais longo devido ser um processo lento e que requer o alinhamento correto da enzima e dos grupos do suporte. Assim, dependendo da reatividade do suporte e enzima, um curso ideal de imobilização pode se estender de 3h até uma semana (BLANCO; GUIÁN, 1989; PEDROCHE et al., 2007). Ainda de acordo com outro estudo (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999) a realização de imobilização por prolongados tempos entre enzimas multiméricas e suportes altamente ativados contendo grandes superfícies internas sugere uma técnica adequada para que a imobilização destas sub-unidades seja realizada com sucesso.

Neste contexto, a escolha do método de imobilização se revela como fator importante para o sucesso do processo. Ligação covalente multipontual entre enzima e suporte altamente ativado, com braços espaçadores muito curtos e um número de resíduos na superfície enzimática, pode gerar uma estabilização da enzima imobilizada (GUISAN, 2006).

Desde que haja muitos grupos reativos do suporte sob a superfície da enzima, a maioria dos grupos de enzimas disponíveis será unida por meio da ligação covalente multipontual com o suporte (RODRIGUES et al., 2008). A área da proteína em contato com o suporte, a mais afetada pela reação com os grupos reativos disponíveis no suporte, favorecerá o aumento da rigidez por meio da ligação covalente multipontual, a qual será transmitida a toda a estrutura proteica, elevando a estabilidade do biocatalisador (BARBOSA et al., 2013, 2015).

A estabilização de enzimas multiméricas como, β -galactosidase e L-arabinose isomerase (MANZO et al., 2015; PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012), apesar de ser considerada difícil, é uma etapa importante para sua aplicação industrial (VIEIRA et al., 2013). Esta classe de enzimas tende a sofrer inativação devido à dissociação de subunidades, comportamento relevante em escala industrial, sob condições experimentais muito suaves. (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999).

Por fim, a estabilização da estrutura de enzimas multiméricas, mesmo que comunique uma estabilidade elevada, deve ser avaliada, uma vez que pode acarretar a contaminação em produtos alimentícios gerados (PESELLE et al., 2008).

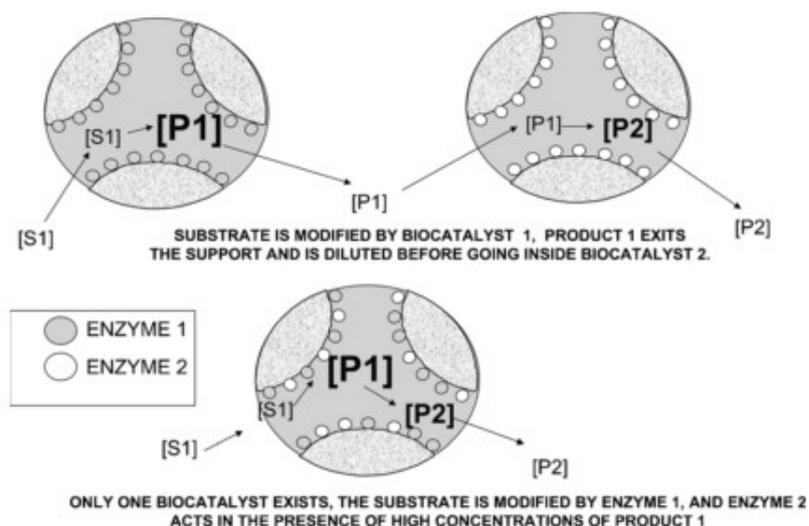
2.5.1 Co-imobilização de enzimas

Atualmente, as reações enzimáticas em cascata estão recebendo uma atenção crescente na biocatálise (ZAAK et al., 2017) tornando-se uma estratégia adequada aos estudos de co-imobilização.

Em reações em cascata com mais de uma enzima imobilizada, diversas reações em paralelo ocorrem simultaneamente. Assim, as cascatas enzimáticas imobilizadas podem ser realizadas de três formas: em catálise por etapas por enzimas imobilizadas, por enzimas imobilizadas misturadas, ou por enzimas co-imobilizadas (JI et al., 2016). As reações em cascata de múltiplos passos às vezes são altamente eficientes e facilmente alcançadas com a catálise de sistemas multi-enzimáticos imobilizados (JI et al., 2016).

A Figura 7 exemplifica bem o efeito cinético com enzimas imobilizadas misturadas (Figura 7, superior) e co-imobilizadas (Figura 7, inferior). Um substrato inicial (S1) é catalizado pela enzima 1 e transformado no produto intermediário (P1). Este P1, por sua vez, servirá de substrato para a segunda reação, catalisada pela enzima 2 para geração do produto final desejado (P2). A diferença marcante entre os dois esquemas de síntese do produto final é a ocorrência de todo o processo dentro de uma mesmo derivado, havendo apenas difusão do S1 para biocatalisador e P2 liberado (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Figura 7 – Efeito da co-imobilização na cinética de um processo multi-enzimático



Fonte: (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Os sistemas de enzimas co-imobilizadas mostram propriedades superiores às duas enzimas individuais em muitos casos (JI et al., 2016). Uso de enzimas co-imobilizadas apresentam vantagens nos processos cinéticos, uma vez que o tempo de latência é reduzido neste tipo de reação. Essa vantagem cinética cessará quando o P1 atingir uma concentração que permita que a enzima 2 tenha a máxima atividade (ZAAK et al., 2017).

Como todo processo complexo, a co-imobilização de enzimas traz algumas desvantagens como, difícil determinação de atividade e estabilidade complicada, além de ser facilmente afetado pela estabilidade da enzima individual (JI et al., 2016). Outro gargalo é a utilização da mesma estratégia de imobilização, sob as mesmas condições, para enzimas distintas envolvidas no processo (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Estudos acerca da imobilização de duas ou mais enzimas em um mesmo suporte (co-imobilização) são cada vez mais relatados (NARWAL; PUNDIR, 2017; TALEKAR et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e considerados desafiadores, uma vez que a atividade catalítica dos biocatalisadores envolvidos deve ser preservada e sua estabilidade melhorada (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010).

Esta metodologia de imobilização torna-se interessante quando se almeja a produção direta de D-tagatose a partir de D-galactose com o uso de duas enzimas, β -galactosidase e L-arabinose isomerase. Como resultado da aplicação destes biocatalisadores co-imobilizados, ocorre o decréscimo do acúmulo de produto da primeira reação, D-galactose, reduzindo efeitos negativos que este possa promover a primeira enzima (β -galactosidase) (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010; GARCIA-GALAN et al., 2011), como inibição pelo produto. Uma estratégia eficiente e econômica ainda não foi desenvolvida para a produção em massa de D-Tagatose a partir de D-lactose com o uso de biocatalisadores co-imobilizados.

2.6 Suportes para imobilização de enzimas

Diversos suportes podem ser utilizados para imobilização de enzimas, tais como resina sintética, um polímero inorgânico, como zeólito ou sílica, ou um biopolímero (BEZERRA et al., 2015; EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013; HOMAEI et al., 2013).

Por possuir uma superfície extensa, a agarose pode realizar intensa multi-interação envolvendo mais de 30% da superfície enzimática (SANTOS et al., 2015). A agarose é um suporte hidrofílico (SUESCUN et al., 2015), com flexível aplicação em reatores com agitação mecânica (GARCIA-GALAN et al., 2011), compatível com diversas estratégias de ativação e comercialmente disponível (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). É facilmente manipulada e ativada devido à presença de elevada densidade de grupos de superfície hidroxilas (OH); sendo frequentemente usada para imobilização enzimática em meios aquosos (BEZERRA et al., 2015). Os grupos hidroxilas podem ainda reagir com reagente epóxido para que assim grupos glioxil sejam formados (RODRIGUES et al., 2008).

A agarose pode ser classificada de acordo com a concentração de ligações de reticulação presentes, 4 BCL e 6 BCL. A agarose 4 BCL é formada por pequenas partículas (poros grandes) quando comparada com a agarose 6 BCL a qual apresenta partículas grandes (poros pequenos) (GONÇALVES et al., 2000).

Segundo Bezerra et al. (2015) adsorção física em MANAE-agarose com baixa força iônica pode proporcionar elevados resultados de rendimento de imobilização e atividade recuperada, sem ocasionar efeito significativo para a estabilidade da enzima.

Os suportes altamente ativadas são mais apropriados para estabilização de enzimas multiméricas porque permitem a máxima compatibilidade com enzimas (VIEIRA et al., 2013). Embora nenhum método e suporte seja o melhor para todas as enzimas e suas várias aplicações. Isto se deve às características químicas e à composição das enzimas, bem como às diferentes propriedades dos substratos e produtos, e aos vários usos destes produtos (HOMAEI et al., 2013).

Suportes de imobilização glioxil-agarose são relatados como adequados para obtenção de biocatalisadores imobilizados estáveis por meio de ligação covalente multipontual (MATEO et al., 2005). A imobilização utilizando grupos glioxil decorre por meio da(s) área(s) da proteína que possui resíduos mais reativos, possibilitando uma intensa interação multipontual entre enzima e suporte (RODRIGUES et al., 2008). Nesta metodologia, as enzimas, através dos seus grupos amino, reagem com grupos aldeídos na superfície do suporte (BEZERRA et al., 2015).

Segundo Santos et al. (2015) glioxil (geralmente agarose) gera os maiores valores de estabilização através da imobilização de diversas enzimas. Estudos com imobilização das

enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suporte glioxil-agarose são relatados, alcançando êxito em suas aplicações (BERNAL et al., 2013; MANZO et al., 2015; PESSELA et al., 2007).

Enzimas imobilizadas em suportes glioxil-agarose são ligadas lentamente e com uma distribuição homogênea ao longo dos poros das partículas do suporte (BARBOSA et al., 2013). Para que se obtenha sucesso no processo, a imobilização deve ocorrer sob valores de pH alcalino, em torno do pH 10,0 (MATEO et al., 2005).

A disposição de maiores quantidades de grupamentos aldeídos e densidade superficial dos grupos glioxil no suporte também comunica maiores rendimentos de imobilização, bem como mais rapidamente a enzima é ligada ao suporte (MATEO et al., 2005). Uma metodologia GUIÁN (1988) bem estabelecida para o desenvolvimento de suportes com 75 e 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído é amplamente utilizada para imobilização multipontual de diversas enzimas.

Capítulo 3

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, 18 mg de proteína.mL⁻¹ de extrato (Lactozime 2600 L), agarose 6 BCL, cisteína, D-galactose e Glicidol foram obtidos da empresa *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA).

A L-arabinose isomerase (E.C. 5.3.1.4) de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B, 22 mg de proteína.mL⁻¹ de extrato, foi produzida, purificada (DE SOUSA et al., 2017) e gentilmente cedida pelo Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (Localizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará).

Agarose DEAE *fast flow* e 4 BCL foram adquiridos da empresa *GE Healthcare Life Sciences* (Pollards Wood, UK).

Os demais reagentes (de grau analítico) utilizados neste estudo foram adquiridos de distintos fornecedores.

3.2 Métodos

3.2.1 Suporte Agarose-MANAE

Para preparação deste suporte seguiu-se 3 etapas: produção de Agarose-Epóxido, Agarose-Epóxido-Glioxil e Agarose-MANAE, como descrito abaixo.

3.2.1.1 Preparação do suporte Agarose-Epóxido

Este suporte foi preparado como etapa intermediária para elaboração de um dos suportes de interesse deste estudo, Agarose-MANAE.

Inicialmente, suspendeu-se 100 g de Agarose 4BCL, a qual foi previamente lavada com água destilada e seca, em 440 mL de solução de água destilada solução, composta por 32,8 g de NaOH e 2 g de NaBH₄. Em banho de gelo, 110 mL de epícloridrina e 160 mL

de acetone foram lentamente adicionados à solução inicial. Sob suave agitação, o preparo foi homogeneizado por 16 horas sob temperatura ambiente, e ao final deste tempo foi lavado com água abundantemente e seco sob vácuo (BOLIVAR et al., 2010).

3.2.1.2 Preparação do suporte Agarose-Epóxido-Glioxil

Como uma segunda etapa para obtenção do suporte Agarose-MANAE, o suporte Agarose-Epóxido foi oxidado com o uso de 1375 mL de solução de NaIO_4 100 mM sob suave agitação por 90 minutos. Ao término deste tempo, o preparo foi lavado exaustivamente com água destilada e filtrado sob vácuo (BOLIVAR et al., 2010).

3.2.1.3 Preparação do suporte Agarose-MANAE

Para a última etapa de obtenção do suporte Agarose-MANAE, 10 g do suporte descrito no item anterior, Agarose-Epóxido-Glioxil, foram adicionadas a 100 mL de solução de Etilenodiamina 2% solução, pH 8,5, sob agitação suave por 2 h. Ao término do tempo, 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaBH_4 foram adicionados à suspensão para sua redução durante 2 h. Por último, a solução foi filtrada sob vácuo e lavada com 100 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 5,0, e então, com 100 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 10. Por fim, o suporte foi lavado demasiadamente lavado com água destilada e seco sob vácuo (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993)

3.2.2 Preparação do suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Para obtenção do suporte Agarose 6 BCL-Glioxil realizou-se duas etapas: Eterificação do suporte pelo uso de glicidol e oxidação através de periodato de sódio (GUISÁN, 1988). Após ser lavada abundantemente com água destilada, ressuspendeu-se 105 g de agarose 6 BCL em água destilada até atingir o volume final de 180 mL. Em seguida, foram adicionados 50 mL de solução 1,7 N de NaOH , contendo 3,4 g de borohidreto de sódio, em banho de gelo para evitar o aquecimento da solução. 36 mL de glicidol foram adicionados

lentamente à solução, a qual permaneceu sob agitação durante 18 h em temperatura ambiente para que assim fosse formado o suporte agarose-gliceril, o qual foi lavado e seco com água destilada ao final do tempo. Na etapa posterior, para cada 105 g do suporte foi ressuspenso para 1500 mL de água destilada e adicionou-se lentamente o volume específico de periodato de sódio 0,1 N referente à concentração de grupos aldeídos desejada. Desta forma, adicionou-se 112,5 mL de periodato de sódio 0,1 N para oxidação do suporte agarose-gliceril para agarose-glicidol, gerando a concentração de $75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído. Em paralelo, 300 mL de periodato de sódio 0,1 N foram adicionados objetivando também a oxidação do suporte de agarose-gliceril em agarose-glicidol, porém, com concentração superior de grupos aldeído, $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. As soluções foram agitadas durante 2 h e posteriormente lavadas e secas para armazenamento sob 4°C . Pode-se obter suportes com um com uma quantidade de grupos aldeído de 0 a $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, o que equivale à uma densidade superficial de 17 a 20 resíduos de aldeído/1000 Å^2 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1992).

Esta metodologia já é validada quanto ao alcance da concentração de grupos glioxil desejada, justificando assim a não realização de quantificação de grupos aldeídos (GONÇALVES, 2001; GRAZU et al., 2006; VIEIRA et al., 2013). Além disso, a concentração de grupos glioxil conferida ao suporte é rigorosamente controlada pela quantidade de periodato de sódio adicionada (MATEO et al., 2005).

3.2.3 Imobilização das enzimas em Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

1 g dos suportes Agarose-DEAE e Agarose-MANAE foram ressuspenso em 10 mL de solução composta por 40 mg de proteína.g⁻¹ de suporte da enzima β -galactosidase ($m_{\text{Suporte}}/V_{\text{Solução}}$) em solução tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0. As respectivas imobilizações foram conduzidas sob 25°C por 3 h com agitação constante. Por fim, os derivados DEAE-LAC e MANAE-LAC foram lavados com água destilada e filtrados sob vácuo. O mesmo protocolo foi adotado para a imobilização da enzima L-arabinose isomerase (DEAE-LAI e MANAE-LAI), contudo, assumiu-se como carga oferecida 20 mg de proteína.g⁻¹ de suporte e um menor tempo de contato, 1 h.

Em paralelo aos ensaios realizou-se um experimento controle (branco), para avaliar uma provável desativação da enzima nas mesmas condições de imobilização. As

condições operacionais de temperatura e agitação foram mantidas constantes durante os experimentos. O processo de imobilização também foi acompanhado com determinação de proteínas (BRADFORD, 1976).

3.2.4 Imobilização das enzimas no suporte glioxil-agarose 6 BCL

Para imobilização e co-imobilização covalente multipontual das enzimas β -galactosidase (LAC) e L-arabinose isomerase (LAI) nos suportes Glioxil-agarose 6 BCL com 75 e 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, procedeu-se de acordo com Bernal *et al.* (2013), com modificações.

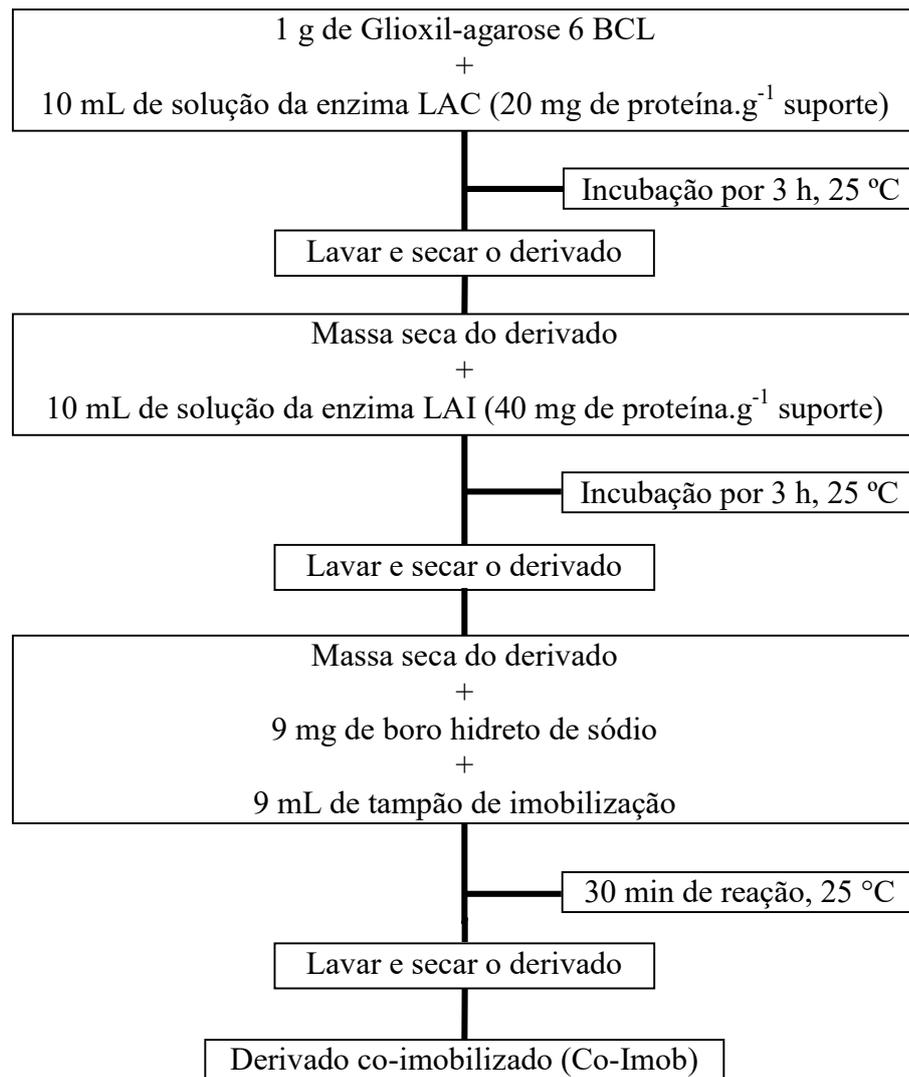
Cada 1 g de suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática contendo diferentes cargas oferecidas (40 mg de proteína. g^{-1} suporte para enzima LAC, bem como, 20 e 60 mg de proteína. g^{-1} suporte para enzima LAI) em tampão bicarbonato de potássio 100 mM suplementado com 0,1 M de KCl e 0,1 mM de MgCl_2 , pH 10,0, durante 3 e 5 horas de incubação, sob condições constante de agitação e temperatura ambiente. Estes ensaios foram conduzidos na presença de 0,1 M de KCl e 0,1 mM de MgCl_2 objetivando amenizar, durante a incubação, os efeitos redutores da atividade da enzima solúvel sob o pH 10,0, por pelo menos 1 h, mesmo sob temperatura ambiente (BERNAL *et al.*, 2013).

Imobilizações com suportes Glioxil são realizadas em pH 10,0 para grande parte das enzimas, uma vez que ao utilizar valores de pH próximos à neutralidade, a estabilidade da enzima poderá ser prejudicada por haver alterações na orientação da enzima em relação à superfície de suporte (SANTOS *et al.*, 2015).

Para o ensaio de co-imobilização (Figura 8) das enzimas (ambas enzimas imobilizadas em um único suporte) estipulou-se 6 horas como tempo total de incubação. Primeiramente, para cada 1 g de suporte, 10 mL de solução enzimática contendo 20 mg de proteína. g^{-1} suporte foram adicionados como carga oferecida para enzima LAC, utilizando o mesmo tampão descrito anteriormente, sendo submetido a agitação suave por 3 h, sob temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi descartada e a massa do derivado foi suspensa em nova solução enzimática (LAI) com carga oferecida de 40 mg de proteína. g^{-1} suporte no mesmo tampão e condições mencionadas para a primeira enzima. As enzimas foram incubadas separadamente para que não fossem gerados dados errôneos para a

quantificação dos parâmetros de imobilização de cada enzima.

Figura 8 – Fluxograma demonstrativo do processo de co-imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suporte Glioxil-agarose 6 BCL



Fonte: elaborada pelo autor.

Ao final do tempo de imobilização de ambas as estratégias realizadas, adicionou-se à cada solução 1 mg de boro hidreto de sódio para cada 1 mL de suspensão, o qual reagiu durante 30 minutos, sob temperatura ambiente, para que os grupos reativos remanescentes presentes na superfície do derivado fossem assim reduzidos evitando a ocorrência de algumas reações indesejadas em paralelo bem como intensificar o perfil hidrofílico do suporte

(BERNAL et al., 2013; MATEO et al., 2006).

Por fim, os derivados foram lavados com água destilada e filtrados a vácuo. Todos os derivados foram armazenados sob refrigeração para a realização das análises subsequentes.

3.2.5 Análise de atividade da enzima β -galactosidase livre e imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

A atividade enzimática para determinação dos parâmetros de imobilização foi medida em espectrofotômetro (420 nm) utilizando como substrato solução de ONPG 1,25 mM em tampão fosfato de sódio 50mM suplementado com MnCl_2 0,1 mM (co-fator) pH 6,6 ($\epsilon = 4,5 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). Então, 50 μL de amostra de solução enzimática ou suspensão de derivado foram adicionados a 2 mL de substrato sob 37 °C. Uma unidade de atividade de β -galactosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima a qual libera 1 μmol de o-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994).

Assim, determinou-se: Rendimento de immobilization (RI, %), atividade recuperada (A_{tr} , %) e atividade do derivado (A_{td} , $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ de suporte) (SILVA et al., 2012).

3.2.6 Análise de atividade da enzima L-arabinose isomerase livre e imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

A atividade enzimática da enzima L-arabinose isomerase foi determinada usando como substrato 400 μL de solução de D-galactose 0,5 M em solução tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 7, suplementado com MnCl_2 0,0001 M (co-fator), com 100 μL de amostra da solução enzimática ou suspensão de derivado, incubado em 50 °C ($\epsilon = 6,3 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). A quantidade de D-tagatose foi medida análise colorimétrica pelo método cisteína-carbazol-ácido sulfúrico (DISCHE; BORENFREUND, 1951). A leitura das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (MANZO et al., 2013). Uma unidade (U) de atividade de L-arabinose isomerase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol de D-tagatose por minuto sob as condições de ensaio.

Os parâmetros de imobilização foram determinados como mencionado anteriormente (SILVA et al., 2012).

3.2.7 Análise de atividade da enzima β -galactosidase livre e imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Devido a instabilidade da enzima β -galactosidase (LAC) ao pH 10,0, a determinação dos parâmetros de imobilização, no que se refere à enzima solúvel, foi mensurada a partir da quantificação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976).

Para determinação da atividade dos derivados da enzima LAC, GLI-6BCL-LAC, realizou leitura em espectrofotômetro (420 nm) com a adição de 50 μ L de suspensão do derivado em 2 mL do substrato 1,25 mM ONPG em tampão 50 mM de fosfato de sódio suplementado com 0,1 mM de $MnCl_2$ (co-fator) pH 6,6, sob 37°C ($\epsilon = 4,5 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). Cada unidade (U) de atividade da enzima β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que promove a formação de 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994).

Para os ensaios de bioconversão e cinética enzimática realizados neste estudo, os quais utilizaram D-lactose como substrato, a atividade enzimática dos derivados GLI-6BCL-LAC foi determinada através da concentração formada de D-glicose baseado no método GOD-PAP (TRINDER, 1969) a partir do uso de um kit enzimático (Glucose Monoreagent, Bioclin) (LIMA et al., 2013). Assim, uma unidade (U) de atividade da enzima β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de D-glicose / D-galactose por minuto (VIEIRA et al., 2013).

Com isso, foi possível determinar os parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI, %) e atividade do derivado (At_d , $U \cdot g^{-1}$ de suporte) (Silva et al., 2012; De Sousa, 2015).

3.2.8 Análise de atividade da enzima L-arabinose isomerase livre e imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Da mesma forma como mencionando no item anterior, devido a instabilidade da enzima L-arabinose isomerase (LAI) ao pH 10,0, a determinação dos parâmetros de imobilização, no que se refere à enzima solúvel, foi mensurada a partir da quantificação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976).

A atividade dos derivados da enzima LAI, GLI-6BCL-LAI, foi quantificada a partir de análise colorimétrica pelo uso do método cisteína-carbazol-ácido sulfúrico (DISCHE; BORENFREUND, 1951). Para isso, foi adicionado 100 μL de suspensão do derivado a 400 μL de solução de D-galactose 500 mM em tampão 25 mM de fosfato de potássio, pH 7,0, adicionado de 0,1 mM de MnCl_2 (co-fator), sob 50 °C, por 1 hora ($\epsilon = 6,3 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). A leitura do resultado foi realizada em espectrofotômetro (560 nm). Uma unidade (U) de atividade da enzima L-arabinose isomerase foi definida como a quantidade de enzima necessária para isomerizar 1 μmol de D-tagatose por minuto (MANZO et al., 2015).

Através destas metodologias foi possível determinar os parâmetros de imobilização (Silva *et al.*, 2012; De Sousa, 2015).

3.2.9 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

Para o estudo cinético utilizou-se 20 μL de suspensão de DEAE-LAC ou MANAE-LAC para 1480 μL de D-lactose (58,4 a 233,6 mM) em solução tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com MnCl_2 0,0001 M, sob 50°C ($\epsilon = 3,1 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). Após 30 min a reação foi interrompida com o uso de banho de gelo. Amostras foram coletadas para a determinação da concentração de D-glicose formada utilizando o método GOD-PAP com o uso do kit enzimático (Glucose Monoreagent, Bioclin) para dosagem de glicose. Uma unidade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de glicose por minuto nas condições descritas inicialmente.

A cinética enzimática dos derivados DEAE-LAI e MANAE-LAI foi avaliada utilizando D-galactose (50 a 1100 mM) como substrato nas mesmas condições citadas para os derivados da enzima L-arabinose isomerase ($\epsilon = 6,3 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$, nestas condições). Ao fim de 1 h, a reação foi parada com o uso de banho de gelo e então amostras foram coletadas para determinar a concentração de D-tagatose produzida.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas através do modelo de Michaelis-Menten. Para os ensaios com a enzima LAC, considerou-se sem inibição competitiva pelo produto (D-galactose) devido ao uso de concentrações de D-lactose acima de 50 mM (KIM; JI; OH, 2004).

3.2.10 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Os derivados GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} também foram avaliados para determinação de seus parâmetros cinéticos, velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e Constante de Michaelis-Menten (K_m), calculados através do modelo de Michaelis-Menten. Para este ensaio, 20 μL de suspensão de GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} foram adicionados à 1480 μL de solução de D-lactose (58,4 a 233.6 mM) e D-galactose (50 a 1100 mM), respectivamente, em 25 mM de fosfato de potássio pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C. O tempo de reação para o derivado da enzima Lac foi de 30 min, enquanto para o derivado da enzima LAI foi de 1h. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao banho de gelo para que a reação fosse interrompida, para posterior determinação da concentração de D-galactose e D-tagatose produzidas.

3.2.11 Hidrólise de D-lactose com a enzima β -galactosidase imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

A bioconversão de D-lactose em D-galactose pelos derivados DEAE-LAC e MANAE-LAC foi realizada em solução tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 7, suplementado com MnCl_2 0,0001 M, contendo D-lactose 146 mM, sob 50°C e constante

agitação. Durante o período de 24 h amostras foram coletadas para realizar determinação da concentração de D-galactose produzida.

3.2.12 Isomerização de D-galactose com a enzima L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

DEAE-LAI e MANAE-LAI foram incubados em D-galactose 50 mM com solução tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 7, também suplementado com MnCl_2 0,0001 M sob 50 °C e constante agitação. Amostras foram coletadas para o monitoramento da bioconversão de D-galactose em D-tagatose durante o período de 24 h.

3.2.13 Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose da enzima β -galactosidase imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

A bioconversão de D-lactose em D-galactose, pelo derivado GLI-6BCL-LAC, elencando diferentes cargas (U), foi realizada com solução inicial de D-lactose de 146 mM (5,0 %, m/v) em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante, durante 24 h.

3.2.14 Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-galactose da enzima L-arabinose isomerase imobilizada em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

O derivado GLI-6BCL-LAI foi incubado, com diferentes cargas (U), em solução de D-galactose 50 mM também em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante, para análise da produção de D-tagatose (mM) ao final de 24 h.

3.2.15 Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose e D-galactose das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

A bioconversão a partir de D-lactose 146 mM também foi analisada através da incubação de ambos biocatalisadores (GLI-6BCL-LAC e GLI-6BCL-LAI) em um mesmo reator, bem como, dos biocatalisadores co-imobilizados para produção direta de D-tagatose. Além disso, a produção direta de D-tagatose foi avaliada a partir de soro queijo (5 % de lactose, m/v). Para estes ensaios, amostras foram analisadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com sistema da marca Waters (Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414. Os monossacarídeos D-lactose, D-glicose, D-lactose e D-tagatose foram mensurados através do uso de coluna Rezex RCM-Monossacarídeo CA+ 8% (300 mm x 7,8 mm, Phenomenex), usando como eluente água MiliQ, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹ sob 85 °C. As concentrações de cada açúcar foram obtidas através de curvas de calibração com concentrações dos padrões relativas às respectivas áreas dos cromatogramas.

Foram realizados ensaios por um período de 12, 24 e 72 h.

3.2.16 Estabilidade térmica das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

A análise de estabilidade térmica dos derivados desenvolvidos foi realizada através da incubação de suspensões de 0,5 g de derivado em 5 mL de tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl₂, sob a temperatura de 50 °C para os derivados GLI-6BCL-LAC, e 50 e 60 °C para os derivados GLI-6BCL-LAI, durante até 600 minutos. Em tempos pré-estabelecidos, amostras foram coletadas e assim analisadas para a determinação da atividade enzimática remanescente, em ONPG e D-galactose, como descrito anteriormente.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dos derivados foi avaliado de acordo com o modelo de Sadana e Henley (1987) o qual foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica obtidos com o uso do software Origin 8.1 (SANTOS et al., 2017).

3.2.17 Estabilidade ao pH das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Para o estudo de estabilidade ao pH, 0,1 g do derivado foi incubado em 1 mL de 25 mM de tampão fosfato de potássio pH 5,5 e 7, e bicarbonato de potássio pH 9 e 10, todos adicionados de 0,1 mM de MnCl_2 , sob temperatura ambiente, por 24 horas. A atividade enzimática foi mensurada em ONPG e D-galactose, como descrito anteriormente.

Este ensaio foi realizado com os derivados das enzimas LAC e LAI imobilizadas por 5h no suporte GLI-6BCL com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, respectivamente.

3.2.18 Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas em suporte Agarose 6 BCL-Glioxil

Os ensaios de estabilidade operacional foram realizados com os derivados GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} (em um mesmo reator), bem como, com o derivado co-imobilizado (Co-Imob), os quais foram utilizados anteriormente em reações de bioconversão por 72 h. As massas de derivados, 0,96 e 0,82 g, foram adicionadas a 20 mL de solução de D-lactose e assim foram realizadas 10 bateladas consecutivas com duração de 24 h, sob 50 °C e agitação constante. Ao final de cada ciclo, amostras eram coletadas para quantificação da concentração dos monossacarídeos D-lactose, D-glicose, D-galactose e D-tagatose, em seguida o derivado era lavado com água destilada e seco a vácuo para remover qualquer produto da reação anterior e disposto para o início de um novo ciclo.

3.2.19 Ensaio de SDS-PAGE

As eletroforeses se realizaram de acordo com Armisen (1997), em géis de acrilamida em condições de desnaturação na presença de SDS de acordo com o método de Laemmli (1976), com algumas modificações descritas a seguir. A porcentagem (p/v) de poliácridamida utilizada foi de 12%. As proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilhante Blue. Marcadores de alto peso molecular foram utilizados. As amostras de derivados foram preparadas por desnaturação com 1% de SDS, 2,5% de

mercaptoetanol, a 100 °C durante 5 min. Após a desnaturalização, centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante contendo a proteína adsorvida ao suporte. As amostras foram analisadas a temperatura ambiente, 150V, por aproximadamente 60 min em uma unidade de eletroforese Mini Protein III (BioRad, EUA), empregando uma fonte de alimentação da Pharmacia Biotech. (Electrophoresis Power Supply - EPS 600).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

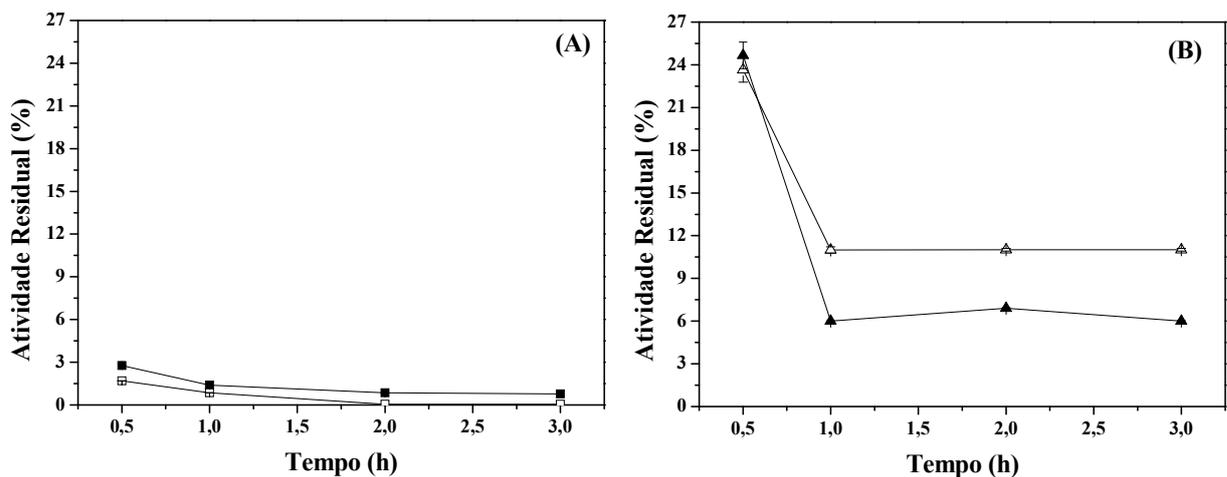
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Imobilização das enzimas em Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

As enzimas β -galactosidase (LAC) e L-arabinose isomerase (LAI), foram imobilizadas em suportes Agarose-DEAE e Agarose-MANAE por adsorção, de acordo com os métodos já descritos, resultando no desenvolvimento de quarto derivados, os quais serão chamados neste estudo de DEAE-LAC, DEAE-LAI, MANAE-LAC e MANAE-LAI, buscando resultados de parâmetros de imobilização adequados para alta atividade catalítica.

Inicialmente verificou-se o curso de imobilização das enzimas em seus respectivos suportes durante os tempos de 30 minutos, 1, 2 e 3 h de incubação, através da atividade residual (%). Este resultado pode ser verificado na Figura 9.

Figura 9 – Curso de imobilização (%) das enzimas β -galactosidase (A) e L-arabinose isomerase (B) em suportes DEAE-Agarose e MANAE-Agarose por um período de incubação de 30 minutos a 3 horas. DEAE-LAC (■), MANAE-LAC (□), DEAE-LAI (▲) e MANAE-LAI (△)



Fonte: elaborada pelo autor.

Diante dos resultados expostos acima (Figura 9) determinou-se o tempo de incubação de 3 horas para a enzima β -galactosidase (Figura 9 A), uma vez que a solução

enzimática controle manteve sua atividade catalítica inalterada durante o período total de incubação (100% de atividade residual), permitindo que haja um maior tempo de contato entre enzima e suporte para atingir maior RI (99 %), como também buscar fortalecer a ligação.

Concomitantemente à redução da atividade residual da solução sobrenadante de imobilização da enzima L-arabinose isomerase de 30 minutos (25 e 23 %) até 1 hora (6 e 11 %), nos suportes DEAE e MANAE, respectivamente, ocorre o decréscimo da atividade residual da carga enzimática de L-arabinose isomerase oferecida, solução controle, (87 % em 1 h de incubação). Após o período de 3 h, a atividade residual da solução controle de L-arabinose isomerase decai ainda mais, cerca de 54 % de atividade catalítica residual, ou seja, a estabilidade desta solução enzimática é influenciada pelas condições de imobilização (tempo e temperatura de incubação, por exemplo). Assim, determinou-se 1 h como tempo de imobilização para a enzima L-arabinose isomerase nos suportes DEAE e MANAE.

Os resultados dos ensaios de imobilização podem ser observados na Tabela 1. Todos os quatro derivados apresentam elevado rendimento de imobilização após 1 h (LAI) e 3 h (LAC) de contato das enzimas e suportes DEAE e MANAE. Ambos derivados da enzima LAC alcançaram 99 % de RI, ao contrário do que é observado para os derivados DEAE-LAI (94 %) e MANAE-LAI (89 %). Desta maneira, percebe-se que a enzima LAI foi adsorvida mais rapidamente, devido ao tempo de imobilização ser menor (1 h), apesar de apresentar massa molar acima de 311 kDa, enzima hexamérica (DE SOUSA et al., 2017). Enquanto a massa molar da enzima LAC equivale a 118 kDa (ZHOU; CHEN, 2001a), esta exigiu um maior tempo de incubação. Estudos acerca da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (DE ALBUQUERQUE et al., 2016) em suporte MANAE também apresentaram alto RI (100 %), mas em poucos minutos de incubação, com destaque para a força iônica de 5 mM e pH 7,0 do tampão de imobilização, o mesmo utilizado nestes ensaios de imobilização do presente estudo. Ainda de acordo com este estudo (DE ALBUQUERQUE et al., 2016), a escolha apropriada da carga de enzima oferecida é importante fator para prevenir possíveis limitações difusionais que possam ocorrer com o uso cargas acima de 20 mg.g⁻¹ de suporte.

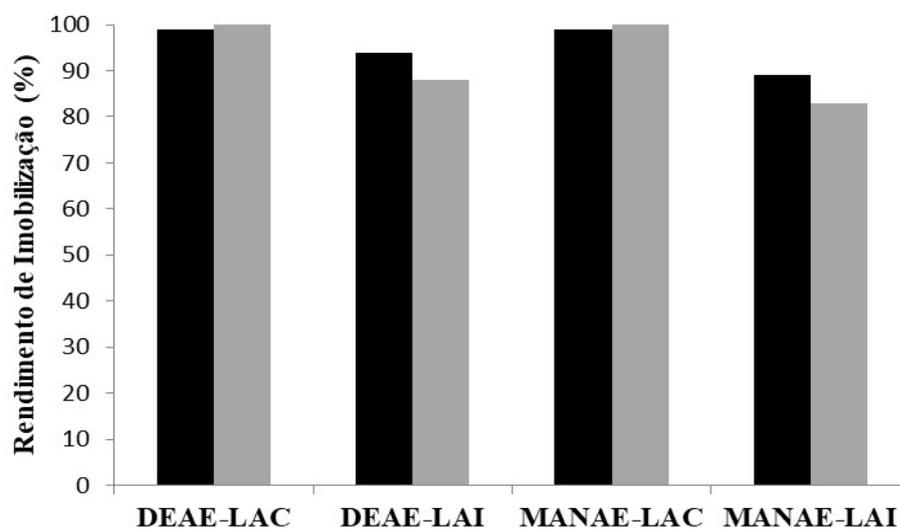
Tabela 1 – Parâmetros de imobilização de β -galactosidase e L-arabinose isomerase em DEAE-Agarose e MANAE-Agarose. Solução tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7, suplementado com $MnCl_2$ 0,0001 M. Rendimento de imobilização (RI, %), atividade recuperada (At_r , %) e atividade do derivado (At_d , $U.g^{-1}$ de suporte)

Biocatalisador	RI (%)	At_r (%)	At_d ($U.g^{-1}$)
DEAE-LAC	99 \pm 0,0	1,6 \pm 0,1	39,2 \pm 2,0
MANAE-LAC	99 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1	57,7 \pm 0,1
DEAE-LAI	94 \pm 0,2	14,5 \pm 0,4	0,74 \pm 0,01
MANAE-LAI	89 \pm 1,8	65,6 \pm 1,3	1,4 \pm 0,0

Fonte: elaborada pelo autor.

Estes resultados de rendimento de imobilização (Tabela 1) foram confirmados por meio do acompanhamento do decréscimo da concentração de proteína durante o período de incubação da enzima no suporte, DEAE-LAC e MANAE-LAC 99 %, DEAE-LAI 94 % e MANAE-LAI 89 %, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Rendimento de imobilização (%) das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em DEAE-Agarose e MANAE-Agarose. Carga enzimática imobilizada (■) e concentração de proteínas imobilizada (▒), ao final de 3 h (DEAE-LAC e MANAE-LAC) e 1 h (DEAE-LAI e MANAE-LAI) de incubação



Fonte: elaborada pelo autor.

Ao observarmos o gráfico acima (Figura 10), percebe-se que a concentração de proteína oferecida durante os ensaios de imobilização decrescem tendendo a nulidade, ou seja, o RI através da concentração de proteínas imobilizada nos suportes é de 100 % para os derivados DEAE-LAC e MANAE-LAC, 88 % para DEAE-LAI e 83 % para MANAE-LAI. Os valores descritos corroboram com os expostos na Tabela 1, fomentando os resultados obtidos.

Tornando a observar a Tabela 1, ao analisarmos a A_{tr} , pode-se perceber que apesar dos valores de RI serem próximos a 100 %, os biocatalisadores DEAE-LAC e MANAE-LAC apresentaram A_{tr} , 1,6 e 3,0 %, respectivamente, possivelmente devido à fraca ligação entre enzima e suporte gerada pela imobilização por adsorção. Outro fato que respalda este resultado seria o preparo do biocatalisador DEAE-LAC, o qual deve ser analisado e aplicado imediatamente após a sua obtenção, considerando que ao longo do tempo o derivado apresentava diminuição da A_{td} , a qual foi $39,2 \text{ U.g}^{-1}$, tendendo a zero, corroborando com a possibilidade deste tipo de ligação para este suporte e enzima não gerar um biocatalisador estável. Este evento não foi observado para MANAE-LAC, o qual apresentou o dobro da A_{tr} , bem como um valor maior para A_{td} , $57,7 \text{ U.g}^{-1}$.

No entanto, estratégias de estabilização podem ser verificadas e aplicadas para estes biocatalisadores e assim permitir que a A_{tr} e A_{td} sejam de valores superiores aos obtidos neste estudo.

Os biocatalisadores DEAE-LAI e MANAE-LAI, com tempo de imobilização de 1 hora, mostrou uma maior A_{tr} , 14,5 e 65,6 %, respectivamente, revelando que possivelmente, para esta enzima e suporte, ocorreu maior número de ligações por adsorção. Os valores para A_{td} , $0,74$ e $1,4 \text{ U.g}^{-1}$, sugerem que mesmo com uma elevação do RI e A_{tr} , parte da carga de enzima imobilizada pode ter sido desorvida, provavelmente devido a fraca ligação entre enzima e suporte, após a obtenção do biocatalisador.

Quando comparado com outro estudo (DE SOUSA, 2015), com A_{tr} de 46%, nota-se que o presente estudo apresentou resultado superior para este parâmetro de imobilização para o derivado MANAE-LAI, 65,6%.

4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

A cinética enzimática revela parâmetros importantes do catalisador, ou seja, qual concentração de substrato a qual o biocatalisador atingirá a sua velocidade máxima, através da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}). Essa informação Esta informação tem grande importância quando se trata de estudos de co-imobilização, onde pelo menos dois biocatalisadores são confinados e necessitam atuar de modo simbiótico e simultâneo. Enquanto a enzima β -galactosidase hidrolisa D-lactose em D-galactose, a enzima L-arabinose isomerase consumirá esta D-galactose produzida, resultando em D-tagatose como produto final, evitando, por exemplo, o acúmulo de D-galactose no meio reacional, o qual pode promover inibição pelo produto (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008) para a primeira enzima. Ensaio de co-imobilização serão vistos posteriormente nesta tese.

A Figura 11 e Tabela 2 apresentam os resultados para análise cinética para os biocatalisadores em estudo.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores DEAE-LAC e DEAE-LAI em D-lactose, MANAE-LAC e MANAE-LAI em D-galactose, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$, sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m), Velocidade máxima de reação (V_{max})

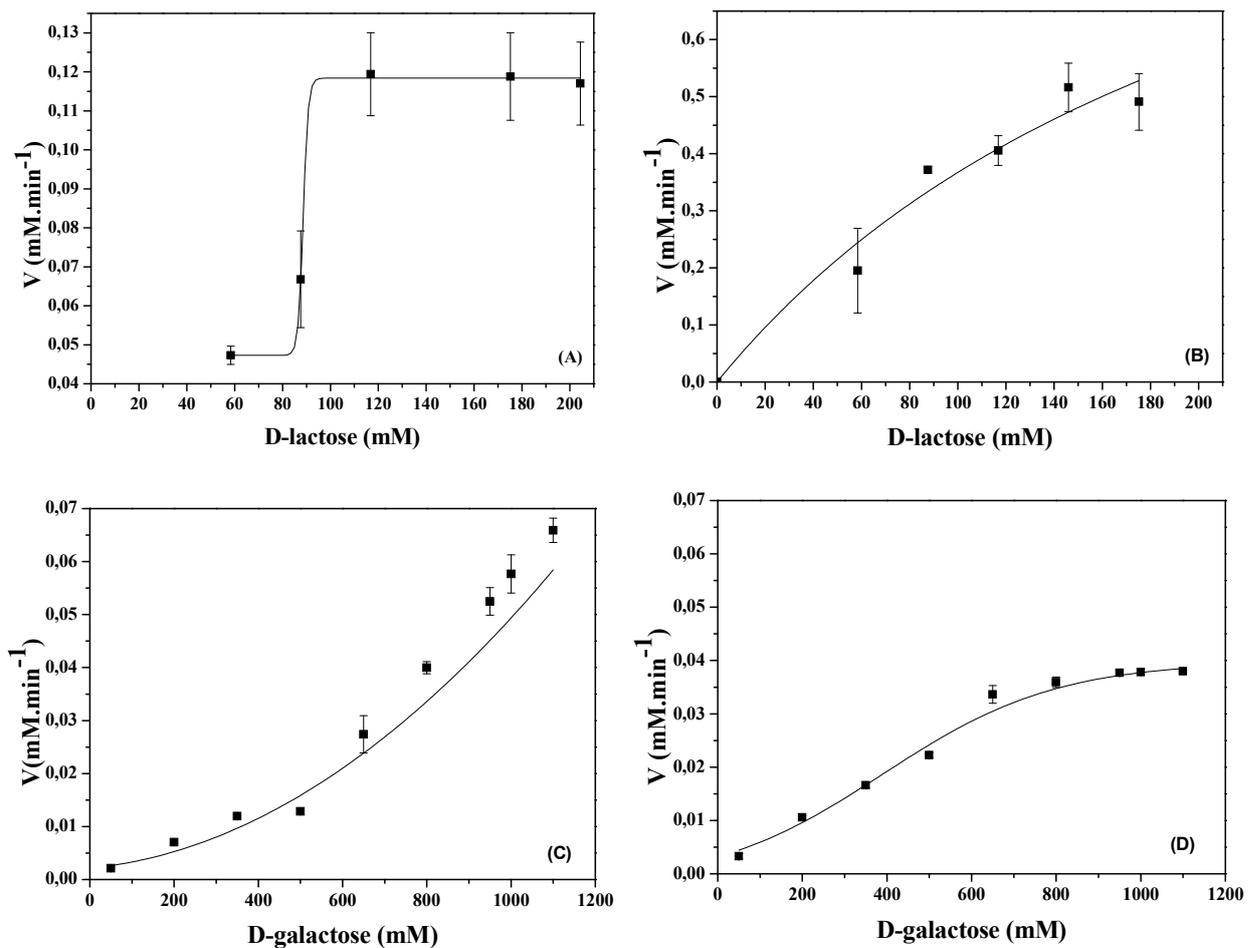
Biocatalisador	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	R^2	Referência
LAC solúvel	45,1	3,12	-	(BEZERRA, 2012)
DEAE-LAC	88,6	0,118	0,99	Este estudo
MANAE-LAC	243,7	1,26	0,95	Este estudo
LAI solúvel	252,0	0,092	-	(DE SOUSA et al., 2017)
DEAE-LAI	861,3	0,089	0,99	Este estudo
MANAE-LAI	391,4	0,04	0,99	Este estudo

Fonte: elaborada pelo autor.

Na Tabela 2, observou-se que o comportamento para os derivados da enzima LAC diferiram dos derivados da enzima LAI. Enquanto a V_{max} do DEAE-LAC (0,118 mM.min⁻¹) é

menor do que o MANAE-LAC ($1,26 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$), o DEAE-LAI ($0,089 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$) apresenta maior V_{max} do que o MANAE-LAI ($0,04 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$). Este comportamento revela que o mesmo suporte não necessariamente promove sempre resultados melhores para diferentes enzimas, provavelmente devido a vários fatores, como por exemplo, mudança conformacional da enzima causada pelo suporte e limitações difusionais do substrato. (LIU et al., 2012).

Figura 11 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam pontos experimentais e as linhas o ajuste de um modelo sigmoidal (A, C e D) e hiperbólico (B), usando o software Origin 8.1. DEAE-LAC (A) e MANAE-LAC (B) incubados em D-lactose, DEAE-LAI (C) e MANAE-LAI (D) incubados em D-galactose, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C



Fonte: elaborada pelo autor.

O V_{\max} para MANAE-LAI ($0,04 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$) mostrou avanços, uma vez que foi superior ao valor obtido em outro estudo (DE SOUSA, 2015), $0,013 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$, apesar do valor de K_m para MANAE-LAI ($391,4 \text{ mM}$) ser maior quando comparado à literatura (DE SOUSA, 2015), 28 mM .

De acordo com os resultados, nota-se que a V_{\max} do MANAE-LAC é em torno de 32 vezes maior que o obtido para o MANAE-LAI. Assim, espera-se que a hidrólise de D-lactose em D-galactose seja mais rápida que a isomerização de D-galactose em D-tagatose. Diante destes resultados, haverá um acúmulo de D-galactose no meio reacional, situação na qual requer atenção com relação a possíveis efeitos de inibição pelo produto, para LAC, fazendo-se necessária a realização de futuros ensaios com maior carga enzimática de LAI, para que este acúmulo de D-galactose seja revertido através do seu consumo, produzindo D-tagatose.

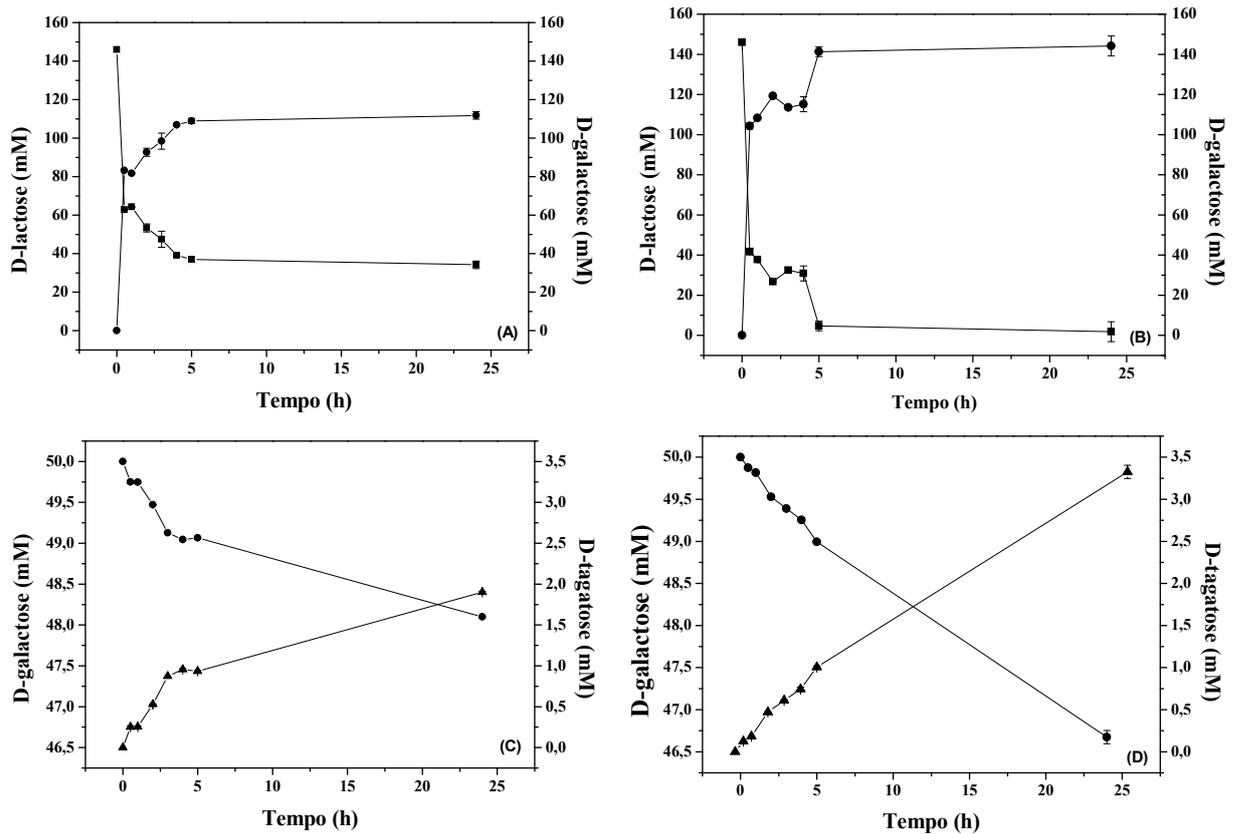
Os valores de V_{\max} são próximos entre as enzimas imobilizadas em suporte DEAE, o que poderia favorecer em processos contínuos. Possivelmente a hidrólise de D-lactose em D-galactose será lenta da mesma forma que será a reação de isomerização de D-galactose em D-tagatose. Diante destes resultados e visando futuros experimentos com as enzimas co-imobilizadas, percebe-se a necessidade de aperfeiçoar o protocolo de imobilização para possibilitar a obtenção de biocatalisadores com maior velocidade reacional. Assim, é necessária uma produção inicial de D-galactose para assim ser consumida e produzir D-tagatose, caso contrário, o biocatalisador LAI ficará possivelmente ocioso por não haver substrato (D-galactose) suficiente.

A constante de Michaelis-Menten, K_m , fornece informações acerca da afinidade do biocatalisador com o substrato em estudo, indicando o nível de facilidade da difusão do substrato (D-lactose ou D-galactose) para o interior do suporte. Desta forma, foi possível verificar que o DEAE-LAC ($88,6 \text{ mM}$) apresentou afinidade ao substrato D-lactose superior ao MANAE-LAC ($243,7 \text{ mM}$), ao contrário da enzima LAI, a qual teve maior afinidade ao substrato D-galactose quando imobilizado em MANAE, com $391,4 \text{ mM}$ (MANAE-LAI), quando comparado ao suporte DEAE, com $881,3 \text{ mM}$ (DEAE-LAI).

4.3 Hidrólise de D-lactose com a enzima β -galactosidase e isomerização de D-galactose com a enzima L-arabinose isomerase immobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

A taxa de bioconversão a partir de dois substratos sintéticos, D-lactose e D-galactose, para D-galactose e D-Tagatose, respectivamente, com o uso de biocatalisadores pode ser vista na Figura 12.

Figura 12 – Bioconversão de D-lactose (■) em D-galactose (●) através do uso de DEAE-LAC (A) e MANAE-LAC (B); Bioconversão de D-galactose (●) em D-tagatose (▲) através do uso de DEAE-LAI (C) e MANAE-LAI (D)



Fonte: elaborada pelo autor.

A partir de uma concentração inicial de 146 mM de D-lactose, 111,8 mM de D-galactose foram produzidos ao final de 24 horas por meio do emprego do biocatalisador DEAE-LAC (76,6 % de bioconversão). A partir desta mesma concentração de substrato, em um outro reator, o biocatalisador MANAE-LAC promoveu 98,7 % (produção de 144 mM de D-galactose) de bioconversão, após 24 h. Ambos derivados da enzima LAC mostraram alta conversão ao final de 5 horas de reação, DEAE-LAC com 74,6 % (produção de 108,9 mM de D-galactose) e MANAE-LAC 96,8 % (produção de 141,3 mM de D-galactose), com valores próximos aos obtidos em um período de tempo de ensaio de 24 h.

Pesquisas (OSMAN et al., 2014) acerca da imobilização de β -galactosidase em suporte DEAE-Celulose mostram resultados similares aos do DEAE-LAC, com conversão entre 85-88 % de D-lactose após 12 e 8 h de reação sob 45 e 55 °C, respectivamente.

Apesar dos derivados da enzima LAC apresentarem elevadas conversões (76,6 e 98,7 %), o derivado MANAE-LAC apresentou maior destaque devido converter rapidamente a totalidade do substrato disponível, o qual se encaixa no perfil industrial desejado, onde se busca um processo cada vez mais rápido, gerando maior lucratividade e menor custo. Assim, este estudo revela uma co-imobilização promissora das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase.

Ainda de acordo com a Figura 12, os biocatalisadores DEAE-LAI e MANAE-LAI apresentaram conversão de 3,8 e 6,6 % do substrato sintético D-galactose em produto (1,9 e 3,3 mM de D-Tagatose), respectivamente, ao final de 24 h. Entende-se que a conversão de D-galactose em D-tagatose atingiu valores baixos, quando comparado a conversão de D-lactose em D-galactose. Este resultado era esperado devido a baixa velocidade máxima dos derivados da enzima LAI, como visto anteriormente. Além disso, os biocatalisadores podem, possivelmente, ter reduzido a capacidade de isomerização devido a exposição dos derivados ao longo do período de 24 horas aliado à temperatura de reação (50 °C). A baixa taxa de conversão da isomerização de D-galactose em D-tagatose foi reportada (DE SOUSA, 2015) como um importante ponto a ser superado nesta rota enzimática.

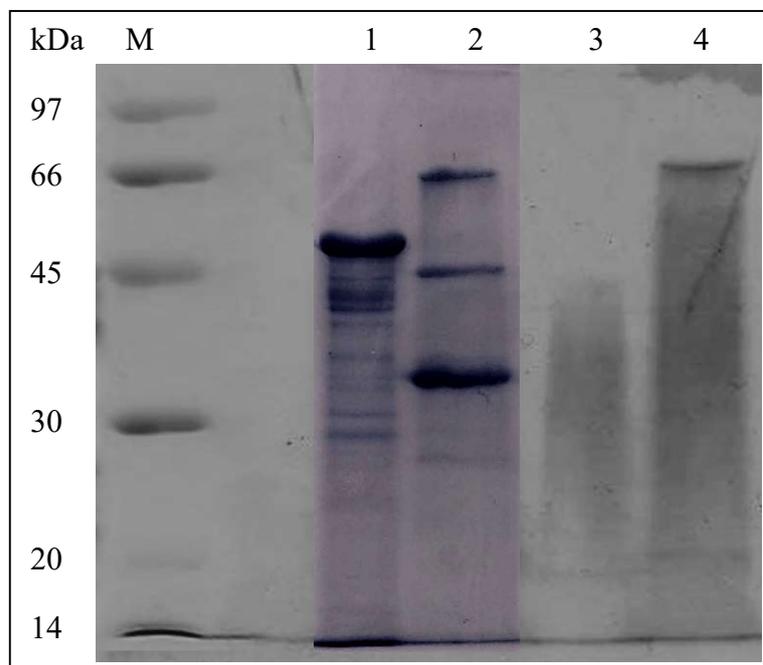
Assim, mais estudos são necessários para otimizar a bioconversão de D-galactose em D-tagatose, os quais já estão em andamento por parte de outros pesquisadores do grupo de

pesquisa GPBio. Com isso, poderemos atingir bons rendimentos de bioconversão e aplicar em estudos de co-imobilização.

4.4 Estudo da interação das enzimas imobilizadas em suporte Agarose-DEAE e Agarose-MANAE

Para avaliar e confirmar o tipo de ligação entre enzima e suporte (adsorção), realizou-se análise de eletroforese em SDS-PAGE com os derivados obtidos neste estudo, DEAE-LAC, DEAE-LAI, MANAE-LAC e MANAE-LAI, como pode ser visto através da Figura 13.

Figura 13 – Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), a 12%, para verificar desprendimento de subunidades das proteínas que não foram estabilizadas aos suportes DEAE e MANAE. M- Padrão de baixo peso molecular, 1- Derivado DEAE-LAC, 2- Derivado DEAE-LAI, 3 - MANAE-LAC, 4 - MANAE-LAI



Fonte: elaborada pelo autor.

De fato, os derivados em estudo apresentaram dessorção com desprendimento de subunidades de proteínas, dado a presença de bandas em todas as amostras (1, 2, 3 e 4). Tal

comportamento comprova que o tipo de ligação entre enzima e suporte, por adsorção, não promove estabilidade ao derivado desenvolvido.

Ao compararmos o tipo de suporte utilizado, podemos verificar que o suporte DEAE promove ligações com a enzima menos estáveis do que o suporte MANAE, como podemos ver através do maior número de bandas visíveis, poços número 1 e 2. Este resultado vai de frente ao obtidos com relação aos parâmetros de imobilização descritos na Tabela 1.

De acordo com estudo (DE SOUSA, 2015), quando se trata de enzimas multiméricas, como é o caso das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase estudadas nesta tese, suas subunidades tendem a não serem completamente estabilizadas ao suporte. Este comportamento é ainda mais esperado quando se realiza imobilização por adsorção. Desta forma, torna-se natural a presença de bandas nesta análise, as quais são correspondentes às subunidades das enzimas em estudo.

4.5 Imobilização das enzimas no suporte glioxil-agarose 6 BCL

Suportes glioxil-agarose têm demonstrado bons resultados com relação à estabilização de enzimas empregando ligação covalente multipontual, gerando baixo impacto na atividade da enzima imobilizada (MATEO et al., 2006).

Partindo desta perspectiva, escolheu-se como estratégia para este estudo a imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suportes a base de agarose 6 BCL ativados com glioxil (75 e 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído), como pode ser visto na Tabela 3. Avaliou-se os parâmetros de imobilização em dois tempos de incubação distintos, 3 e 5 h, para cada suporte e enzima.

A partir dos resultados para rendimento de imobilização, verificado pela determinação de concentração de proteínas, constata-se que em todas as condições, valores iguais ou bem próximos de 100 % foram alcançados. Isto revela que o tempo de imobilização estabelecido, 3 ou 5h, com relação ao parâmetro rendimento de imobilização, não gera significativa influência nos resultados deste estudo, sugerindo ainda que as ligações entre as moléculas das enzimas e o suporte ativado são construídas rapidamente. Além disto, este alto rendimento pode ter ocorrido possivelmente devido à elevada quantidade de grupos aldeídos presente no suporte, viabilizando a ligação covalente multipontual. Resultados semelhantes

podem ser verificados para a enzima β -galactosidase de *E. coli* (PESELA et al., 2007) e *Kluyveromyces lactis* (BERNAL et al., 2013; MATEO et al., 2005).

Tabela 3 – Parâmetros de imobilização das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase em suportes GLI-6BCL com 75 e 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, com 3 e 5 h de incubação. Carga oferecida de 40 e 20 mg de proteína.g⁻¹ suporte, LAC e LAI, respectivamente, em tampão 100 mM bicarbonato de potássio suplementado com 0,1 M de KCl e 0,1 mM de MgCl₂, pH 10,0. Rendimento de imobilização (RI, %) e atividade do derivado (At_d , U.g⁻¹ de suporte)

Biocatalisador	RI (%)	At_d (U.g ⁻¹ de suporte)
GLI-6BCL-LAC _{75/3}	100 ± 0,0	16,3 ± 0,3
GLI-6BCL-LAC _{75/5}	100 ± 0,0	15,2 ± 0,1
GLI-6BCL-LAC _{200/3}	100 ± 0,0	18,1 ± 0,2
GLI-6BCL-LAC _{200/5}	100 ± 0,0	19,1 ± 0,5
GLI-6BCL-LAI _{75/3}	99 ± 0,0	0,34 ± 0,0
GLI-6BCL-LAI _{75/5}	100 ± 0,0	0,31 ± 0,0
GLI-6BCL-LAI _{200/3}	98 ± 0,0	0,57 ± 0,1
GLI-6BCL-LAI _{200/5}	99 ± 0,0	0,57 ± 0,1

Fonte: elaborada pelo autor.

O suporte Glioxil-agarose com 75 μmoles de grupos aldeídos/mL de gel também foi utilizado para imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* (VIEIRA et al., 2013), porém não alcançou êxito, apresentando RI nulo. Os autores reportaram que a exposição da enzima ao pH 10, adequado para o tipo de imobilização, prejudicou a estabilidade da enzima. Este efeito pôde ser evitado no presente estudo, através do uso de KCl como uma forma de blindar a enzima contra o efeito desnaturante do pH alcalino, possibilitando rendimentos de imobilização de 100 % para a enzima LAC (Tabela 3).

Por outro lado, o aumento do tempo de imobilização, bem como aumento do número de grupamento glioxil presente no suporte, possibilitou um incremento na atividade dos derivados. Com exceção do biocatalisador GLI-6BCL-LAC_{75/5} e GLI-6BCL-LAI_{75/5}, um

maior tempo de incubação (5 h) possivelmente permitiu ligações mais fortes e estáveis, diminuindo a perda de subunidades das enzimas ligadas superficialmente aos suportes. Mas, de forma geral, os derivados das enzimas LAC e LAI apresentaram At_d próximas entre si, para uma mesma concentração de grupos aldeídos (75 ou 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$).

O aumento do número de grupos glioxil nos suportes também gera influência nos resultados obtidos. Por exemplo, a At_d do biocatalisador GLI-6BCL-LAI_{200/5} (0,57 U.g^{-1} de suporte) quase atingiu o dobro da determinada para GLI-6BCL-LAI_{75/5} (0,31 U.g^{-1} de suporte), incremento (em menor proporção) também visualizado quando comparado para os derivados GLI-6BCL-LAC_{75/5} (15,20 U.g^{-1} de suporte) e GLI-6BCL-LAC_{200/5} (19,06 U.g^{-1} de suporte). Este aumento é gerado pela maior quantidade de periodato de sódio aplicada no suporte, o qual promove oxidação e formação de mais grupos glioxil a serem ligados com resíduos de lisina das enzimas. Assim, quanto mais sub-unidades ligadas ao suporte, maior espera-se que seja a atividade do derivado. Estudos anteriores (De Sousa, 2015) revelam que a multipontualidade apresenta mais eficácia quando o meio reacional está em pH 10,0 pelo fato de um maior número de grupos amino de lisinas estarem desprotonados e aptos para reagir com os aldeídos do suporte (Bernal *et al.*, 2013; De Sousa, 2015).

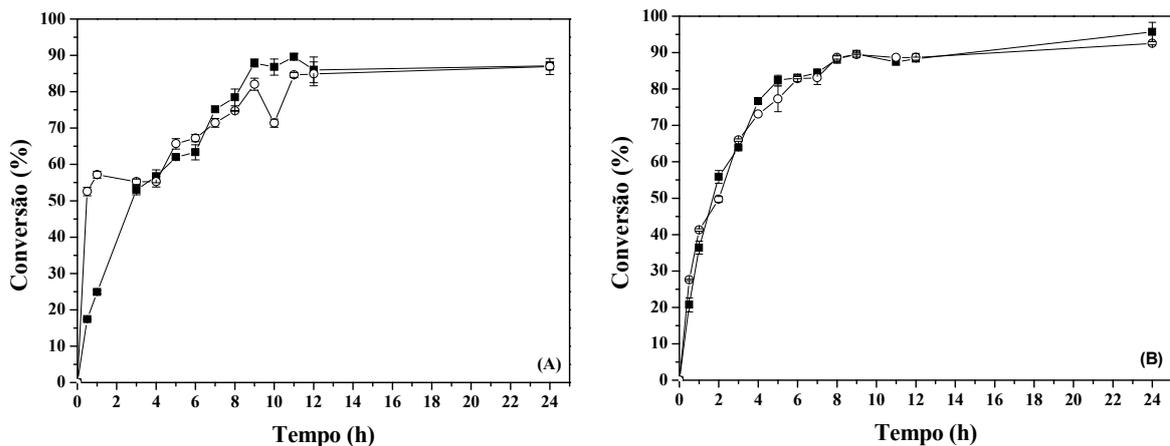
Ao passo que toda a carga proteica não estava mais presente na solução sobrenadante de imobilização, esperava-se uma elevada carga enzimática no suporte, seguida de valores superiores aos alcançados para atividade do derivado.

A redução das ligações do derivado ao final da imobilização, pelo uso de boro-hidreto de sódio (NaBH_4), é uma etapa importante para que as ligações entre enzima e suporte tornem-se estáveis, uma vez que as bases de Schiff fracas são convertidas em ligações aminas secundárias muito estáveis e todo o aldeído remanescente no suporte sólido em grupos hidroxilas inertes (BLANCO *et al.*, 1989; MATEO *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008). Por outro lado, este processo promoveu redução da atividade do derivado, como percebido no presente estudo (dados não expostos). Algumas enzimas podem reduzir sua atividade catalítica por conta da redução de ligações dissulfeto após os derivados serem submetidos à oxidação com boro-hidreto de sódio, gerando alterações conformacionais na estrutura da enzima (BLANCO *et al.*, 1989; BLANCO; GUISÁN, 1989; RODRIGUES *et al.*, 2008).

4.6 Determinação da taxa de bioconversão a partir de D-lactose e D-galactose

A taxa de bioconversão dos oito derivados desenvolvidos neste estudo está disposta nas Figuras 14 e 15 para os derivados GLI-6BCL-LAC e GLI-6BCL-LAI, respectivamente. Os ensaios foram realizados a partir de D-lactose para os derivados da enzima β -galactosidase e a partir de D-galactose para os derivados da enzima L-arabinose isomerase.

Figura 14 – Síntese enzimática de D-galactose através dos derivados GLI-6BCL-LAC com (A) $75 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (B) $200 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tempo de imobilização: (■) 3 e (○) 5 h. Substrato D-lactose 146 mM (5 %, m/v) em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante



Fonte: elaborada pelo autor.

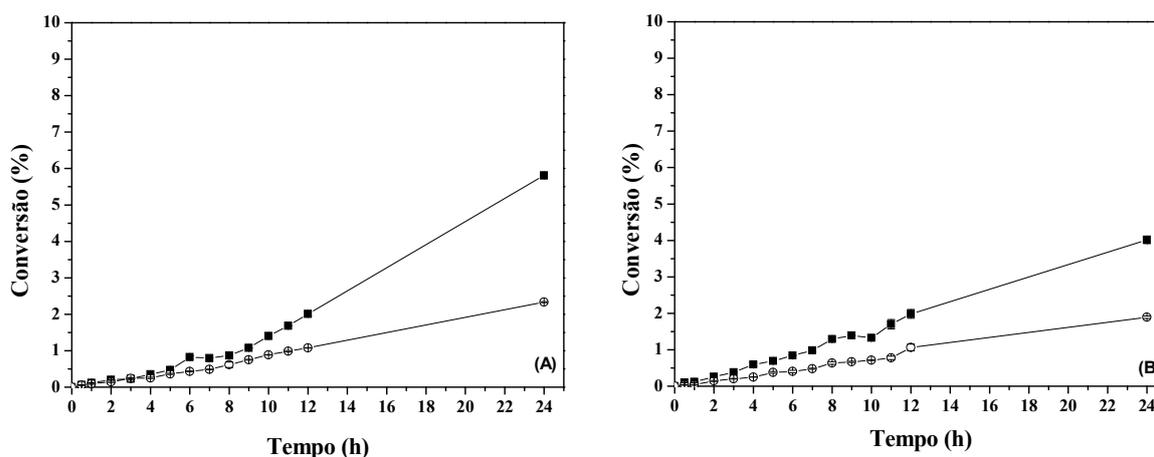
Assim como percebido nos parâmetros de imobilização, o rendimento de bioconversão de D-lactose em D-galactose entre os diferentes biocatalisadores da enzima LAC (Figura 14) mantiveram valores semelhantes entre si e próximos de 100 %. Destaca-se ainda que os maiores valores são referentes aos derivados GLI-6BCL-LAC_{200/3} e GLI-6BCL-LAC_{200/5}, com rendimentos de bioconversão de aproximadamente 96 e 93 %, respectivamente.

Em torno de 10 a 12 h de reação de bioconversão, valores próximos ao máximo (24 h) foram alcançados, revelando que o incremento da produção de D-galactose foi pequeno

dentro deste tempo, de 1 a 2% e 4 a 10%, para os derivados com 75 e 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeídos, respectivamente. Ou seja, a partir deste ponto a reação abrandou até atingir o tempo final de 24 h, sugerindo ter entrado em equilíbrio.

Estudos que realizaram bioconversão de D-lactose em D-galactose com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizadas em diferentes suportes atingiram 37 % (quitosana), 41 % (nanofibras de poliestireno), 80 % (quitosana), (BEZERRA, 2012; LIMA et al., 2013; MISSON et al., 2016).

Figura 15 – Síntese enzimática de D-tagatose através dos derivados GLI-6BCL-LAI com (A) 75 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e (B) 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Tempo de imobilização: (■) 3 e (○) 5 h. Substrato D-galactose 50 mM em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7, suplementado com 0,1 mM de MnCl_2 , sob 50°C e agitação constante



Fonte: elaborada pelo autor.

De forma distinta do comportamento apresentado pelos derivados da enzima LAC, os derivados da enzima LAI, Figura 15, atingiram baixos percentuais para bioconversão de D-galactose em D-tagatose, em 24 horas de reação de isomerização. Pode-se observar ainda que imobilizações em suportes com 75 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (5,8 e 2,3%) de grupos aldeídos geraram conversões maiores quando comparado aos suportes de 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (4,0 e 1,9%), para os tempos de imobilização de 3 e 5 h, respectivamente.

Contudo, percebe-se que o comportamento para síntese de D-tagatose é crescente, ou seja, não apresenta comportamento de equilíbrio, desta forma, maiores percentuais podem

ser alcançados com o aumento do tempo de reação.

Estudos (LIANG et al., 2012) acerca da taxa de síntese de D-tagatose a partir de 500 mM de D-galactose por meio da incubação de L-arabinose isomerase termofílica imobilizada em alginato de cálcio, alcançaram 39,5% de conversão ao final de 24h. Rendimentos de conversão maiores para esta enzima termofílica são esperados quando comparados à enzimas mesófilas (RHIMI et al., 2010), como a utilizada no presente estudo (L-arabinose isomerase expressa em *E. coli* DH10B), dado a maior resistência como resposta ao aumento da temperatura de reação, em um longo período.

4.7 Estabilidade térmica

O estudo de estabilidade térmica define parâmetros importantes com relação à termoestabilidade do biocatalisador perante diferentes temperaturas de incubação, sendo uma informação importante para aplicação de enzimas, livres e imobilizadas, a nível industrial (MANZO et al., 2015). Além disso, o processo de imobilização geralmente melhora a estabilidade térmica da enzima e sua reutilização eficiente, que também depende da estratégia de imobilização selecionada.

As estabilidades térmicas dos biocatalisadores desenvolvidos foram realizadas sob 50 e 60°C, por até 12h, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$, para determinação da constante de desativação térmica e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), como apresentado na Tabela 4.

Inicialmente, ensaios com todos os derivados foram realizados sob 60 °C, porém, os únicos derivados que não apresentaram queda brusca em sua atividade, permitindo a avaliação dos parâmetros K_d e $t_{1/2}$, foram GLI-6BCL-LAI_{200/3} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}. Os demais derivados foram avaliados perante sua estabilidade térmica sob 50 °C.

Tabela 4 – Estabilidade térmica das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase imobilizadas em suportes GLI-6BCL com 75 e 200 $\mu mol.mL^{-1}$ de grupos aldeído, com 3 e 5 h de incubação. Incubação sob 50 e 60 °C em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2$. Constante de desativação (K_d, min^{-1}) e tempo de meia-vida

(t_{1/2}, min)

Biocatalisador	K _d (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	R ²
GLI-6BCL-LAC _{75/3} , 50°C	0,036	73,99	0,85
GLI-6BCL-LAC _{75/5} , 50°C	0,006	472,59	0,86
GLI-6BCL-LAC _{200/3} , 50°C	0,497	1,42	0,99
GLI-6BCL-LAC _{200/5} , 50°C	0,035	100,20	0,88
GLI-6BCL-LAI _{75/3} , 50°C	0,024	50,89	0,91
GLI-6BCL-LAI _{75/5} , 50°C	0,022	57,65	0,91
GLI-6BCL-LAI _{200/3} , 50°C	0,004	425,41	0,96
GLI-6BCL-LAI _{200/3} , 60°C	0,155	5,93	0,99
GLI-6BCL-LAI _{200/5} , 50°C	0,004	935,36	0,91
GLI-6BCL-LAI _{200/5} , 60°C	0,080	13,94	0,92

Fonte: elaborada pelo autor.

Com relação aos derivados da enzima LAC, pode-se perceber que a estabilidade térmica sofre um incremento quando se compara derivados com a mesma quantidade de grupos aldeídos (75 ou 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$) e diferentes tempos de imobilização (3 e 5 h). Isso revela que a estabilidade térmica perante o maior tempo de imobilização utilizado permite uma maior estabilidade térmica ao derivado. Esse perfil também pode ser observado para a enzima LAI. De acordo com estudos (MANZO et al., 2015) a imobilização por ligação covalente multipontual pode promover melhores resultados com relação ao aumento da atividade enzimática e estabilidade térmica para enzimas multiméricas, principalmente quando aliado ao tempo de imobilização adequado.

Contudo, ao compararmos a variação do número de grupos aldeídos de 75 para 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, para os suportes de imobilização da enzima LAC, com o mesmo tempo de imobilização, visualizamos o decréscimo do t_{1/2}. Este comportamento pode ter ocorrido possivelmente devido à não adequada estabilização do complexo enzima-suporte, mesmo com maior número de grupos aldeídos dispostos pelo suporte (200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$), comprometendo a

estabilidade das subunidades desta enzima multimérica (dissociação das subunidades), quando exposta a esta temperatura (50 °C).

No entanto, os derivados GLI-6BCL-LAC_{75/5} e GLI-6BCL-LAC_{200/5} apresentaram tempos de meia vida superiores, 472,59 e 100,20 min, respectivamente, ao relatado em outro estudo (LIMA et al., 2013), 86,6 min.

Oposto ao ocorrido com a enzima LAC, os derivados da enzima LAI apresentaram aumento das suas estabilidades térmicas tanto frente ao aumento do tempo de imobilização, de 3 para 5 horas, bem como frente ao aumento do número de grupamentos aldeído de 75 para 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ presente no suporte glioxil-agarose. Desta forma, o derivado GLI-6BCL-LAI_{200/5} alcançou os $t_{1/2}$ 935,36 e 13,94 min, sob as temperaturas de incubação de 50 e 60 °C.

A imobilização utilizando grupos glioxil ocorre através de áreas da proteína que têm maior número de resíduos ativos, lisinas, promovendo grande interação multipontual entre enzima e suporte sob valores de pH alcalinos (10,0) comunicando estabilidade ao derivado. Assim, um reduzido número de lisinas sugere menor estabilização (RODRIGUES et al., 2008). A enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* possui 83 resíduos de lisina (BERNAL et al., 2013).

4.8 Estabilidade ao pH

Para se atingir o máximo de interação entre a enzima e suporte, através da imobilização covalente multipontual, é necessário ater ao controle rigoroso das condições de imobilização implementadas, como por exemplo, utilização de tampões com valor de pH alcalino e longos tempos de imobilização, além da concentração de grupamentos aldeídos presentes no suporte, favorecendo assim a reatividade da enzima (BLANCO et al., 1989; MATEO et al., 2006). Autores (MATEO et al., 2005) estudaram a variação do tempo de imobilização para enzima β -galactosidase de *K. lactis* onde 100% da carga oferecida foi imobilizada em 5h de incubação.

Após as primeiras ligações entre suporte e proteínas, a enzima perde flexibilidade, dificultando a realização de novas ligações e demandando tempo de imobilização mais longos para que ocorra o correto alinhamento entre enzima e suporte (MATEO et al., 2006).

Contudo, suportes glioxil-agarose são estáveis, os quais permitem longos tempos de imobilização e grande quantidade de proteína para realização de ligações multipontuais (GONÇALVES, 2001).

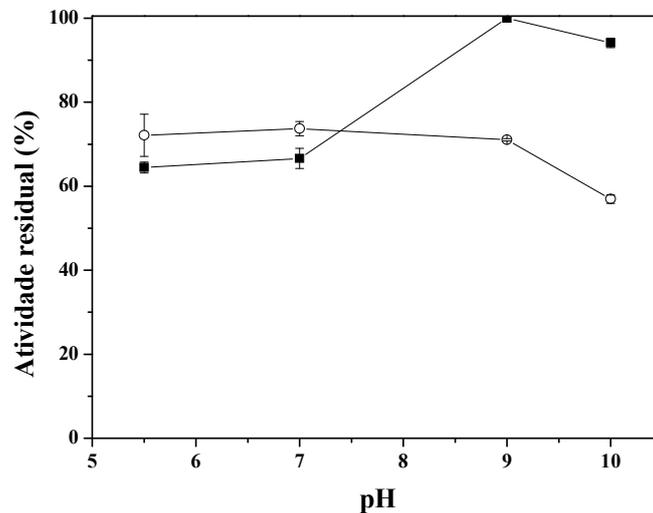
Além disto, enzimas multiméricas requerem suportes compatíveis com seu tamanho molecular, uma vez que a imobilização deste grupo de enzimas é muito mais complexa quando comparado a enzimas dimericas por motivos geométricos (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999). No caso do presente estudo, suportes com maior quantidade de grupos aldeídos são mais adequados tratando-se de enzima tetramérica e hexamérica, como a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012) e L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B (DE SOUSA et al., 2017).

Desta forma, determinou-se a escolha dos derivados GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, juntamente com os resultados alcançados nos ensaios anteriores, para prosseguir com as demais análises, a começar pelo estudo de estabilidade ao pH.

O ensaio da estabilidade ao pH (Figura 16 e Tabela 5) foi realizado com os derivados das enzimas LAC e LAI imobilizadas por 5h no suporte GLI-6BCL com 200 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, incubados em pH de 5,5 a 9,0, por 24 horas, sob temperatura ambiente, a fim de avaliar o comportamento da atividade catalítica dos biocatalisadores frente ao pH. Esta análise se fundamenta diante da visão industrial para aplicação dos biocatalisadores, uma vez que podem ser exposto a diversas condições de pH.

De acordo com a Figura 16 podemos observar que com o aumento do valor de pH do meio, o derivado GLI-6BCL-LAC_{200/5} alcançou maior estabilidade frente à variação do pH, em específico para pH alcalinos (9,0 e 10,0). Ao longo de 24 h, em pH 9,0, o derivado manteve 100% de sua atividade catalítica, ou seja, diante desta condição o derivado se portou de forma inerte, sem prejudicar sua estabilidade. Menor atividade residual foi vista (Tabela 5) pelo derivado incubado sob pH 5,5, apresentando 64,4 % de atividade residual ao final de 24 h.

Figura 16 – Estabilidade ao pH dos biocatalisadores (■) GLI-6BCL-LAC_{200/5} e (○) GLI-6BCL-LAI_{200/5}, incubados em pH 5,5 a 10,0, por 24 horas, sob temperatura ambiente (25 °C)



Fonte: elaborada pelo autor.

Com relação ao derivado GLI-6BCL-LAI_{200/5}, a maioria dos pH de incubação promoveram em torno de 70 % de atividade residual, com exceção do pH 10,0. Desta forma, o comportamento de estabilidade ao pH para este derivado aparenta decair com o aumento do valor de pH de incubação.

Desta forma, a incubação sob pH 9,0, de forma geral, apresenta-se como condição mais adequada para ambos os derivados para manutenção da estabilidade frente ao pH dos derivados em estudo.

Tabela 5 – Estabilidade ao pH dos biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, incubados em pH 5,5 a 10,0, por 24 horas, sob temperatura ambiente (25 °C)

Biocatalisador	pH	Atividade residual (%)
GLI-6BCL-LAC _{200/5}	5,5	64,4
	7,0	66,6
	9,0	100
	10,0	94,1
GLI-6BCL-LAI _{200/5}	5,5	72,1
	7,0	73,7
	9,0	71,0
	10,0	56,9

Fonte: elaborada pelo autor.

4.9 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas em suporte Glioxil-Agarose

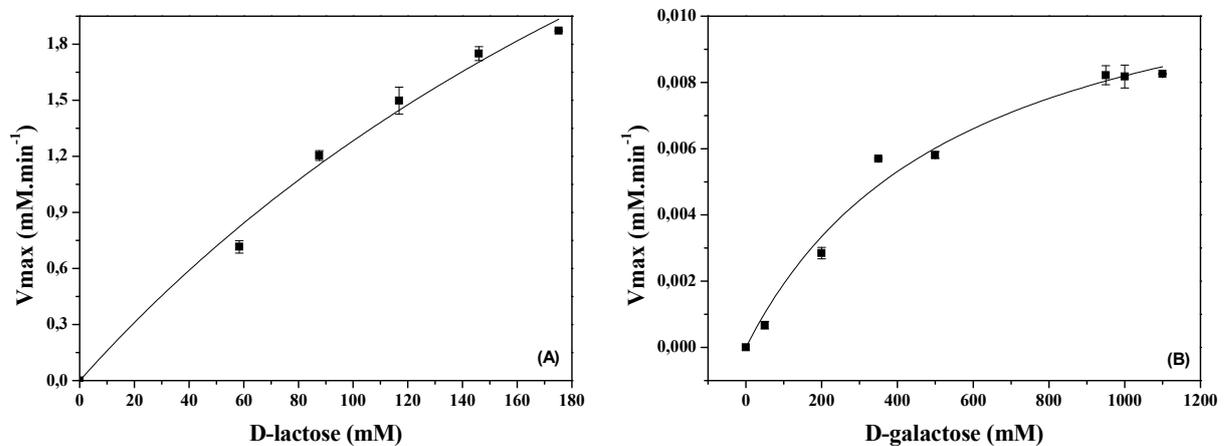
A fim de se determinar a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e Constante de Michaelis-Menten (K_m), realizou-se ensaios de cinética enzimática com os substratos D-lactose (146 mM) e D-galactose (50 mM) com os derivados GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, respectivamente, sob 50 °C. Estes dados podem ser conferidos através da Figura 17 e Tabela 6.

Apesar de se tratarem de enzimas distintas, β -galactosidase e L-arabinose isomerase, ambos derivados apresentaram bom ajuste do mesmo modelo cinético (hiperbólico) aos dados experimentais, haja vista os valores de R^2 0,99 e 0,98 (Tabela 6), para os biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, respectivamente.

A velocidade máxima para enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em sua forma solúvel foi determinada como 3,12 mM.min⁻¹, sob temperatura de reação de 37 °C (BEZERRA, 2012). Desta forma, sob temperatura superior, 50 °C, a estratégia de imobilização no presente estudo promoveu incremento no valor de $V_{m\acute{a}x}$ através do

biocatalisador desenvolvido (GLI-6BCL-LAC_{200/5}), 5,94 mM.min⁻¹.

Figura 17 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam pontos experimentais e as linhas o ajuste de um modelo hiperbólico usando o software Origin 8.1. (A) GLI-6BCL-LAC_{200/5} e (B) GLI-6BCL-LAI_{200/5} incubados em D-lactose e D-galactose, respectivamente, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl₂, sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m , mM). Velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$, mM.min⁻¹)



Fonte: elaborada pelo autor.

O biocatalisador da enzima LAC apresenta valor de $V_{m\acute{a}x}$ superior (5,94 mM.min⁻¹) ao determinado para o biocatalisador da enzima LAI (0,013 mM.min⁻¹), sugerindo que em reações contínuas, na presença de ambos biocatalisadores ou co-imobilizados, para produção direta de D-tagatose a partir de D-lactose, uma rápida formação de D-galactose seja alcançada para que esteja disponível como substrato para produção de D-tagatose. Esta hipótese também pode ser respaldada pelos resultados obtidos nos ensaios de bioconversão apresentados anteriormente.

Valores semelhantes para $V_{m\acute{a}x}$, 0,011 mM.min⁻¹, foram alcançados por meio da imobilização da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B em suporte IDA-Ni-glioxil (De Sousa, 2015).

Valores baixos para $V_{m\acute{a}x}$ podem ser justificados perante a hipótese de que alguns dos centros ativos da enzima tenham sido bloqueados após a imobilização, reduzindo a taxa

de reação (ZHOU; CHEN, 2001b).

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, em D-lactose e D-galactose, respectivamente, em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl₂, sob 50 °C. Constante de Michaelis-Menten (K_m), Velocidade máxima de reação (V_{max})

Biocatalisador	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	R^2	Referência
LAC solúvel	45,10	3,12	-	(BEZERRA, 2012)
GLI-6BCL-LAC _{200/5}	362,90	5,94	0,99	Este estudo
LAI solúvel	252,00	0,092	-	(DE SOUSA et al., 2017)
GLI-6BCL-LAI _{200/5}	568,07	0,013	0,98	Este estudo

Fonte: elaborada pelo autor.

Valores elevados para K_m , quando comparado às enzimas livres, são verificados para os biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} (362,90 mM) e GLI-6BCL-LAI_{200/5} (568,07 mM). Este parâmetro revela a afinidade entre o substrato e o biocatalisador. Em ambos os ensaios, os substratos utilizados possuem alto peso molecular, D-lactose (342,30 g.mol⁻¹) e D-galactose (180,16 g.mol⁻¹) sugerindo que possíveis impedimentos difusionais podem ter ocorrido devido ao complexo acesso da molécula de substrato ao centro ativo da enzima multimérica imobilizada no suporte. Além disso, ao passo que longos períodos de incubação enzima-suporte podem gerar biocatalisadores mais estáveis, efeitos de distorção da estrutura da proteína podem ocorrer, modificando o acesso ao centro ativo da enzima.

Alguns autores também obtiveram maiores valores de K_m após imobilização de enzimas, como β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (RAFAEL, 2014), L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* (DE SOUSA, 2015), proteinase neutra (TANG; QIAN; SHI, 2006)

Contudo, autores (ZHOU; CHEN, 2001a) sugerem que valores de K_m menores podem ser alcançados com o uso de maiores concentrações de substrato, melhorando as interações com o biocatalisador imobilizado, pois enzimas imobilizadas não permitem acesso do substrato tão facilitado quanto às enzimas solúveis.

4.10 Determinação da taxa de bioconversão direta de D-lactose em D-tagatose com biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}

A produção direta de D-tagatose pelos derivados GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} foi inicialmente avaliada em três estratégias distintas: 1) Adição simultânea de ambos biocatalisadores ao reator a partir do tempo 0 h de reação; 2) Adição apenas de GLI-6BCL-LAC_{200/5} até 2 horas de reação, em seguida adição de GLI-6BCL-LAI_{200/5} ao reator; e 3) Adição de GLI-6BCL-LAC_{200/5} ao reator e remoção no tempo de reação de 2 h, em seguida, adição de GLI-6BCL-LAI_{200/5}. Todas esses ensaios foram realizados com substrato 150 mM de D-lactose em tampão 25 mM de fosfato de potássio pH 7, adicionado de 0,1 mM de MnCl₂, a 50 °C, em um período de 24 h, com valores de cargas distintas.

O objetivo foi avaliar de que forma influenciaria a presença e carga dos biocatalisadores para a produção de D-tagatose.

Inicialmente, adicionou-se aos reatores os biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} (30 U) e GLI-6BCL-LAI_{200/5} (0,2 U), com cargas oferecidas de 40 e 20 mg de proteína.g⁻¹ suporte, respectivamente, em 20 mL de D-lactose.

Ambos os ensaios 1 e 2 resultaram em um consumo de 95 % do substrato D-lactose com produção de D-tagatose próxima, 2,3 e 2,4 mM, respectivamente, em torno de 1,6 % de bioconversão. O ensaio 3 proporcionou consumo de 100 % de D-lactose ao também ao final de 24 h de incubação, gerando um acúmulo de 4,1 mM de D-tagatose (bioconversão de 2,8 %), cerca de 2 vezes superior às duas primeiras estratégias. Estes valores para D-tagatose estão próximos ao alcançado pelo biocatalisador GLI-6BCL-LAI_{200/5} em 50 mM de D-galactose, determinado anteriormente. Estes resultados sugerem viabilidade no processo de síntese de D-tagatose a partir de D-lactose com o uso de dois biocatalisadores, gerando estratégias futuras para o desenvolvimentos de biocatalisadores co-imobilizados, como poderá ser visto posteriormente.

Apesar do resultado superior do ensaio 3 (Acúmulo de 4,1 mM de D-tagatose), o ensaio 1 é o mais representativo para o estudo posterior de co-imobilização, uma vez que ambos derivados estão incubados no substrato desde o início até o final do tempo de 24 h.

Desta forma, a estratégia 1 de síntese de D-tagatose foi repetida com modificações. A enzima L-arabinose isomerase foi imobilizada novamente em suporte glioxil-

agarose com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, por 5 horas, diferindo a carga oferecida, 60 mg de proteína.g⁻¹ suporte. Assim, buscou-se carregar mais o suporte para que uma maior atividade fosse obtida para realização do ensaio. Com isto, obteve-se um derivado com menor rendimento de imobilização, 69 %, bem como menor atividade do derivado, 0,42 U.g⁻¹. Este resultado possivelmente ocorreu devido à saturação do suporte, o qual não possibilitou a imobilização de maiores cargas da enzima.

Desta forma, a análise de síntese de D-tagatose a partir de D-lactose ocorreu utilizando a mesma carga oferecida do ensaio anterior para o derivado GLI-6BCL-LAC_{200/5} (20 U), e uma maior carga oferecida para GLI-6BCL-LAI_{200/5} (0,36 U). A reação foi incubada em 40 mL de D-lactose, sob 50 °C, durante 72h.

O aumento do tempo de reação para 72 h, bem como o incremento na carga do GLI-6BCL-LAI_{200/5} (0,36 U) adicionada ao reator não gerou grande aumento da concentração final de D-tagatose (2,9 mM), apesar da concentração inicial de D-lactose (150 mM) ter sido totalmente consumida (Hidrólise de 100 % de D-lactose).

4.11 Determinação da taxa de bioconversão direta de D-lactose em D-tagatose com β -galactosidase e L-arabinose isomerase co-imobilizadas

As enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase foram co-imobilizadas em suporte glioxil-agarose com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído. Inicialmente, a enzima LAC foi incubada com carga oferecida de 20 mg de proteína.g⁻¹ de suporte, por 3 horas. Ao final deste tempo, o derivado foi lavado e suspenso em nova solução enzimática de LAI contendo 40 mg de proteína.g⁻¹ de suporte, e incubado por 3 horas novamente. Procedeu-se com a redução dos grupos reativos remanescentes com o uso de boro hidreto de sódio.

As cargas oferecidas foram determinadas, visto os resultados de ensaios anteriores, obtendo-se 97 e 70 % de rendimento de imobilização para as enzimas LAC e LAI, respectivamente. Este resultado foi positivo pelo fato do suporte permitir a imobilização de duas enzimas multiméricas de alto peso molecular. Este fato se deve pela característica adequada do suporte, uma vez que a agarose 6BCL (6% de ligações cruzadas) dispõe de poros grandes e 94,5 % de porosidade (GONÇALVES et al., 2008), o que auxilia no enclausuramento de moléculas robustas. Estudos anteriores (BERNAL et al., 2013) relatam

que suportes porosos podem causar problemas de difusão do substrato, o qual pode alterar a estabilidade e atividade catalítica dos derivados, sendo solucionado pela utilização de baixa carga oferecida.

Apesar de tempos mais longos de imobilização favorecerem a atividade catalítica do derivado, nesta etapa escolheu-se reduzir o tempo de imobilização de 5 para 3 h para cada enzima, uma vez que de outra forma o processo ficaria muito longo (10 h), podendo assim prejudicar a atividade enzimática do biocatalizador obtido, além de não tornar o processo demasiadamente longo, o que não é vantajoso para a aplicação industrial. Isto também foi avaliado em outro estudo de co-imobilização (FANCHINI TERRASAN et al., 2016), onde os autores constataram que com o aumento do tempo de imobilização proporciona maior rendimento de imobilização, mas promove decaimento da atividade enzimática do biocatalisador, causado possivelmente por distorções nas estruturas das enzimas devido ao longo período de interação suporte-enzimas.

Através de um comparativo com relação ao rendimento de bioconversão para as enzimas imobilizadas durante 3 e 5 h, Tabela 7, espera-se que esta redução no tempo de imobilização não promova desvantagem para aplicação dos biocatalisadores co-imobilizados na bioconversão de D-lactose em D-tagatose.

Tabela 7 – Análise comparativa dos derivados desenvolvidos a partir do suporte glioxil-agarose com $200 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de grupos aldeído, em 3 e 5 horas de incubação das enzimas β -galactosidase e L-arabinose isomerase

Biocatalisador	Tempo de imobilização (h)	Bioconversão (%)
LAC	3	96,0
	5	93,0
LAI	3	4,0
	5	1,9

Fonte: elaborada pelo autor.

Desta forma, os biocatalisadores co-imobilizados foram incubados em 40 mL de D-lactose 150 mM para síntese de D-tagatose, sob $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 72 h.

Apesar do consumo de D-lactose ter sido total (100 % de D-lactose hidrolisada), a concentração de D-tagatose produzida (1,4 mM) foi em torno da metade obtida no ensaio com derivados da enzima LAC e LAI imobilizados separadamente (2,9 mM). Devemos destacar que neste ensaio dois biocatalisadores multiméricos foram imobilizados em um único suporte, o que possivelmente pode ter dificultado na difusão do produto intermediário (D-galactose) ao centro ativo da enzima L-arabinose isomerase.

No intuito de avaliar a aplicação deste biocatalisador de enzimas LAC e LAI co-imobilizadas no tratamento de resíduos industriais que contenham soro de queijo, sub-produto da indústria de laticínios, realizou-se ensaio de síntese de D-tagatose a partir de soro de queijo (5%, m/v). Ao final de 12 h de incubação do co-imobilizado em soro de leite, a 50 °C, verificou-se um resultado semelhante (96,5 % de D-lactose consumida e produção de 1,4 mM de D-tagatose) ao obtido no ensaio utilizando substrato D-lactose (100 % de D-lactose consumida e produção de 1,4 mM de D-tagatose).

Assim, mais estudos podem ser realizados acerca da co-imobilização de enzimas para obtenção direta de D-tagatose, vislumbrando a sua aplicação no tratamento e aproveitamento de soro de queijo descartado em indústrias de laticínios.

4.12 Estabilidade operacional

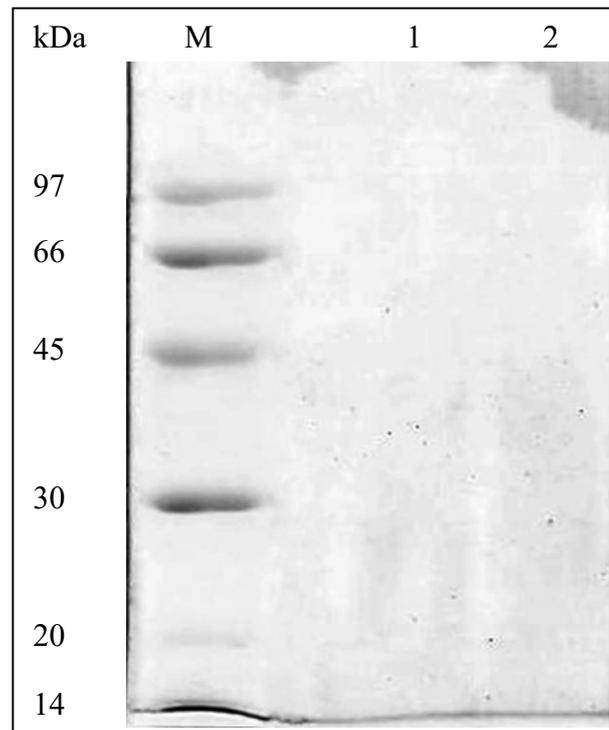
Os biocatalisadores desenvolvidos anteriormente e submetidos aos ensaios de bioconversão por 72 h, GLI-6BCL-LAC_{200/5} (20 U)/GLI-6BCL-LAI_{200/5} (0,36 U) e o co-imobilizado, foram submetidos ao ensaio de estabilidade operacional para verificar a atividade residual ao longo de 10 ciclos contínuos. Após o primeiro ciclo de reação de síntese de D-tagatose, por 72h, os biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} foram lavados e submetidos a um novo ciclo de 24 h. Da mesma forma procedeu-se com o co-imobilizado.

A partir do segundo ciclo, a síntese de D-tagatose foi nula para os dois ensaios, devido a inativação dos biocatalisadores.

4.13 Validação dos métodos de imobilização através de eletroforese SDS-PAGE

Mais uma vez, como forma de avaliação do tipo de ligação entre enzima e suporte (ligação covalente), realizou-se análise de eletroforese em SDS-PAGE com os derivados obtidos GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5} (Figura 18).

Figura 18 – Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), a 12%, para verificar desprendimento de subunidades das proteínas que não foram estabilizadas ao suporte Glioxil-Agarose. M- Padrão de baixo peso molecular, 1- Derivado GLI-6BCL-LAC_{200/5}, 2- Derivado GLI-6BCL-LAI_{200/5}



Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, ambos derivados não apresentaram dessorção de suas subunidades (linhas 1 e 2), justificado pelo não aparecimento de bandas das proteínas estudadas. Desta forma, pode-se validar que as enzimas foram covalentemente ligadas aos suportes.

Capítulo 5

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que ambas as enzimas, β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B, apresentaram resultados significativos de rendimentos de imobilização em suportes à base de agarose, MANAE e DEAE, revelando viabilidade em relação à sua imobilização por adsorção. No entanto, enquanto os derivados da enzima β -galactosidase mostraram alta conversão (76,6 e 98,7 %, respectivamente) de D-lactose em D-galactose, o mesmo não é conferido para os derivados da enzima L-arabinose isomerase (3,8 e 6,6 %, respectivamente), para conversão de D-galactose em D-tagatose, tendo destaque, comparando as duas matrizes usadas neste estudo, o suporte MANAE.

Apesar dos biocatalisadores, DEAE-LAI e MANAE-LAI apresentaram alguns parâmetros desfavoráveis para sua aplicação, o ensaio de bioconversão combinado com cinética enzimática revela dados que podem auxiliar na melhoria destas metodologias de estudo, fortalecendo a viabilidade da aplicação desses biocatalisadores separadamente, bem como juntos em um único reator, vislumbrando estudos na forma co-imobilizada.

Na segunda etapa desta tese outra metodologia de imobilização das enzimas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* expressa em *E. coli* DH10B foi escolhida, ligação covalente. Diversos ensaios de imobilização em suportes glioxil-agarose foram realizados a fim de se desenvolver um biocatalisador com ambas enzimas co-imobilizadas, o qual foi alcançado. Porém, diante dos parâmetros verificados, o presente estudo ainda demanda um maior desenvolvimento para aplicações futuras, como aumento da bioconversão, estabilidade térmica e operacional, bem como ensaios com uma outra L-arabinose isomerase com poder de isomerização superior.

Como já discutido, a proposta de uso de suportes glioxil-agarose foi positiva perante enzimas multiméricas (tetra e hexaméricas), permitindo a viabilidade da imobilização bem como diminuição de problemas difusionais maiores que poderiam vir a ocorrer.

Assim, destacam-se os valores estimados para estabilidade térmica dos biocatalisadores GLI-6BCL-LAC_{200/5} e GLI-6BCL-LAI_{200/5}, sob 50 °C, com tempos de meia-vida de 100 e 935 min, respectivamente. A bioconversão de D-lactose em D-galactose promovida pelo biocatalisador GLI-6BCL-LAC_{200/5}, 93 %, proporciona a disponibilidade de

alta concentração de D-galactose a ser isomerizada pelo biocatalisador GLI-6BCL-LAI_{200/5}, o qual requer melhoria no valor para V_{max} , para que assim valores de conversão maiores sejam alcançados.

A maioria das biocatálises multi-enzimáticas em cascata são realizadas para síntese de carboidratos ou conversões de açúcares (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010), corroborando com adequação da estratégia de co-imobilização no presente estudo. Segundo autores (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010), um comportamento de co-imobilização ideal deve conferir uma estabilização operacional global para cada enzima envolvida, de outra forma o tempo de meia-vida do biocatalisador será limitada pela enzima mais instável.

Desta forma, vale ressaltar que por se tratar de um estudo inédito, os resultados obtidos para bioconversão de D-lactose em D-tagatose (1,4 mM) através dos biocatalisadores co-imobilizados tornam-se um importante guia para continuidade deste estudo, ampliando pesquisas a cerca da co-imobilização de enzimas.

Capítulo 6

Sugestões para trabalhos futuros

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados alcançados nesta tese, algumas estratégias podem ser ainda realizadas como forma de complementação do estudo. Algumas delas seguem pontuadas abaixo:

- Estudar o efeito do aumentar a massa do suporte durante a co-imobilização, com concomitante aumento da carga oferecida para buscar maiores rendimentos de imobilização da enzima L-arabinose isomerase;
- Ensaio de co-imobilização das enzimas em duas etapas com condições de imobilização diferentes (tampão, valores de pH e tempo);
- Estudos para implementação de técnicas de reticulação variando a concentração de agente reticulador (glutaraldeído, por exemplo) afim de avaliar o aumento da estabilidade;
- Co-imobilização pelo método de auto-agregação ou cross-linked enzyme aggregates (CLEAs);

Aplicação dos biocatalisadores co-imobilizados em reator contínuo, utilizando como substratos D-lactose e soro de queijo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. L.de. *et al.* Ion exchange of β -galactosidase: the effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 875–880, 2016.
- BARBOSA, O. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–62, 2013.
- BARBOSA, O. *et al.* Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.
- BERNAL, C. *et al.* Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 2, p. 76–82, 2013.
- BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 27, p. 95–114, 2010.
- BEZERRA, C. S. **Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação.** [S. l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2012.
- BEZERRA, C. S. *et al.* Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BLANCO, R. M. *et al.* Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 353–359, 1989.
- BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 360–366, 1989.
- BOLIVAR, J. M. *et al.* Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 107–113, 2010.
- BORTONE, N.; FIDALEO, M. Immobilization of the recombinant (His)₆-tagged L-arabinose isomerase from *Thermotoga maritima* on epoxy and copper-chelate epoxy supports. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 155–162, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014.** Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. Brasília, DF: editora, 2014.
- CHANALIA, P. *et al.* Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide

synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 10.1016/j., 2018.

CHOI, J. M. *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**, v. 596, p. 51–62, 2016.

DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **J. Biol. Chem.**, v. 192, p. 583–587, 1951.

EDET, E.; NTEKPE, M.; OMEREJI, S. Current Trend in Enzyme Immobilization : a Review. **International Journal of Modern Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 31–49, 2013.

ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, v. 10.1016/j., 2018.

FANCHINI TERRASAN, C. R. *et al.* Co-immobilization and stabilization of xylanase, β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 614–623, 2016.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 1999, p. 181–189, 1999.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. F. **Síntesis de Antibióticos b-Lactámicos Catalizada por Derivados Inmovilizados-Estabilizados de Penicilina G Acilasa.** [S. l.] Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Molecular, Universidad Autonoma de Madrid, 1992.

FRANÇOIS, J. M. *et al.* **Improved galactose isomerase and use thereof in the production of tagatose.** Depositante: Nutrilab NV. EP2834354B1. Depósito: 3 mar. 2013. Concessão: 16 ago. 2017.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685–694, 2008.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GIORDANO, R. L. C. *et al.* Study of biocatalyst to produce ethanol from starch. Coimmobilization of glucoamylase and yeast in gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 84–86, 2000.

GONÇALVES, L. R. B. *et al.* A Kinetic Study of Synthesis of Amoxicillin Using Penicillin G Acylase Immobilized on Agarose. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1, p. 931–945, 2000.

GONÇALVES, L. R. B. **Estudo Cinético da Síntese de Amoxicilina Catalisada por Penicilina G Acilase Imobilizada em Agarose**. [S. l.] Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2001.

GONÇALVES, L. R. B. *et al.* Influence of mass transfer limitations on the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 411–418, 2008.

GRAZU, V. *et al.* Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 960–966, 2006.

GRBA, S. *et al.* Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 16, n. 1, p. 13–16, 2002.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2nd ed ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2006.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 307–314, 2009.

HATZINIKOLAOU, D. G. *et al.* Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 2, p. 161–172, 2005.

HOMAEI, A. A. *et al.* Enzyme immobilization: an update. **J Chem Biol**, v. 6, p. 185–205, 2013.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast Growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 47–54, 1994.

JAYAMUTHUNAGAI, J. *et al.* D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250–255, 2017.

Jl, Q. *et al.* Immobilized multienzymatic systems for catalysis of cascade reactions. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1193–1203, 2016.

JOCHEMS, P. *et al.* Active site titration of immobilized beta-galactosidase for the determination of active enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 137–141, 2015.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes - learning from past successes and

failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 471–478, 1993.

KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 3, p. 738–743, 2004.

KIRTHIGA, O. M. *et al.* Theoretical analysis of concentration of lactose hydrolysis in a packed bed reactor using immobilized β -galactosidase. **Ain Shams Engineering Journal**, p. 0–5, 2016.

LEE, D.-W. *et al.* Characterization of a Thermostable L-Arabinose (D-Galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic *Eubacterium Thermotoga maritima*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1397–1404, 2004.

LEE, D. W. *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**, v. 579, n. 5, p. 1261–1266, 2005.

LEVIN, G. V. **Tagatose, the new GRAS sweetener and health product.** **Journal of medicinal food**, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511110>. Acesso em: 10 set. 2016.

LIANG, M. *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**, v. 93, n. 4, p. 1469–1474, 2012.

LIM, B.-C.; KIM, H.-J.; OH, D.-K. Tagatose production with pH control in a stirred tank reactor containing immobilized L-arabinose from *Thermotoga neapolitana*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 245–53, 2008.

LIMA, A. F. A. F. *et al.* Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 443–452, 2013.

LIMA, M. D. A. *et al.* Recovery and purification of a *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by Mixed Mode Chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, 2016.

LIU, J. F. *et al.* Reversible immobilization of *K. fragilis* β -galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 64–70, 2012.

LOPEZ-GALLEGO, F.; SCHMIDT-DANNERT, C. Multi-enzymatic synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 174–183, 2010.

LU, Y.; LEVIN, G. V.; DONNER, T. W. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 109–134, 2008.

MAHONEY, R. R. Lactose: enzymatic modification. In: **Lactose, water, salts and vitamins**. P. F. FOX ed. London, UK: Chapman & Hall, 1997. v. 3, 2nd p. 77–125.

- MANJASETTY, B. A.; CHANCE, M. R. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI), the putative target of biological tagatose production. **Journal of Molecular Biology**, v. 360, n. 2, p. 297–309, 2006.
- MANZO, R. M. *et al.* Screening and selection of wild strains for L-arabinose isomerase production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 711–720, dez. 2013.
- MANZO, R. M. *et al.* Chemical improvement of chitosan-modified beads for the immobilization of *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 L-arabinose isomerase through multipoint covalent attachment approach. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 10, p. 1325–40, 2015.
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230–240, 2009.
- MATEO, C. *et al.* Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456–462, 2005.
- MATEO, C. *et al.* Glyoxyl agarose : a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274–280, 2006.
- MEN, Y. *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**, v. 169, n. 2, p. 171–178, 2014.
- MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quimica Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MEYER-GERSPACH, A. C.; WÖLNERHANSEN, B.; BEGLINGER, C. Functional roles of low calorie sweeteners on gut function. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 479–481, 2016.
- MIKKELSEN, P. **World cheese market 2000-2020**. Disponível em: <http://pmfood.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2017.
- MISSON, M. *et al.* Manipulation of nanofiber-based β -galactosidase nanoenvironment for enhancement of galacto-oligosaccharide production. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 56–64, 2016.
- NARWAL, V.; PUNDIR, C. S. An improved amperometric triglyceride biosensor based on co-immobilization of nanoparticles of lipase , glycerol kinase and glycerol 3-phosphate oxidase onto pencil graphite electrode. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 100, p. 11–16, 2017.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **D-lactose**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12302695>. Acesso em: 20 jan. 2018a.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **D-tagatose**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439312>. Acesso em: 20 jan. 2018b.
- NETA, N. D. A. S. N. DO A. S. *et al.* Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential

as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324–331, 2012.

OH, D.-K. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 1, 2007.

OH, D. K. *et al.* Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 22, p. 1859–1862, 2001.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 600–609, 2011.

OSMAN, A. *et al.* Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using bifidobacterial β -galactosidase (BbgIV) immobilised on DEAE-Cellulose, Q-Sepharose and amino-ethyl agarose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 188–199, 2014.

PATEL, M. 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**, v. 97, p. 27–33, 2017.

PATRICK, J. W.; LEE, N. Subunit structure of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4277–4283, 1969.

PEDROCHE, J. *et al.* Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Á. *et al.* Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Journal of Structural Biology journal**, v. 177, p. 392–401, 2012.

PESSELA, B. C. *et al.* Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 193–198, 2008.

PESSELA, B. C. C. *et al.* Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 310–315, 2007.

RAFAEL, R. DA S. **Imobilização de β -galactosidase através de ligações covalentes multipontuais em suporte contendo grupamentos epóxi.** [S. l.] 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro Universitário UNIVATES, UNIVATES, 2014.

RHIMI, M. *et al.* Co-expression of L-arabinose isomerase and D-glucose isomerase in *E. coli* and development of an efficient process producing simultaneously D-tagatose and D-fructose. v. 40, p. 1531–1537, 2007.

RHIMI, M. *et al.* The acid tolerant l-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23K is an attractive d-tagatose producer. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p.

9171–9177, 2010.

RHIMI, M. *et al.* The acid-tolerant L-arabinose isomerase from the mesophilic *Shewanella* sp . ANA-3 is highly active at low temperatures. p. 1–11, 2011.

RODRIGUES, D. S. *et al.* Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212–225, 2006.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Analysis of Enzyme Deactivations by a Series-Type Mechanism: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 501, n. 1, p. 73–79, 1987.

SAINI, P. *et al.* Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 69–79, 2017.

SANTOS, J. C. S. *et al.* Immobilization of CALB on activated chitosan: application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, 2017.

SANTOS, J. C. S. D. *et al.* Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015.

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p. 1938–1953, 2012.

SHENDURSE, A. M.; KHEDKAR, C. D. Lactose. In: **Encyclopedia of Food and Health**. Academic P ed. [S. l.] Elsevier Ltd., 2016. p. 509–516.

SILVA, J. A. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, 2012.

SILVÉRIO, S. C. *et al.* New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 250, n. November 2017, p. 131–139, 2018.

SIMON, R. C. *et al.* Recent developments of cascade reactions involving ω - transaminases. **American Chemical Society**, v. 4, p. 129–143, 2014.

SOUSA, M. de. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase**. [S. l.] Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de 139 f. Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2015.

SOUSA, M. de. *et al.* Engineering the L-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* for D-tagatose synthesis. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1–13, 2017.

STEPANKOVA, V. *et al.* Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 2013.

- SUESCUN, A. *et al.* Immobilization of lipases on glyoxyl – octyl supports : improved stability and reactivation strategies. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1211–1217, 2015.
- TALEKAR, S. *et al.* Carrier free co-immobilization of alpha amylase , glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLE- As): a tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 269–275, 2013.
- TANG, Z.-X.; QIAN, J.-Q.; SHI, L.-E. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1193–1197, 2006.
- TORRES, P. 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**, v. 102, p. 99–105, 2014.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry: an international journal of biochemistry and laboratory medicine**, v. 6, n. 1, p. 24–27, 1969.
- VIEIRA, D. C. *et al.* Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54–64, 2013.
- XU, Z. *et al.* L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. October, p. 8869–8878, 2014.
- XU, Z. *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**, v. 109, p. 28–34, 2016.
- ZAAK, H. *et al.* Coimmobilization of enzymes in bilayers using pei as a glue to reuse the most stable enzyme: preventing pei release during inactivated enzyme desorption. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 95–101, 2017.
- ZHANG, J. *et al.* Enzymatic studies on the co-immobilized GOD/CAT on cross-linked chitosan microsphere modified by lysine. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 97, p. 80–86, 2013.
- ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33–40, 2001a.
- ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69–74, 2001b.
- ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.