



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**LUCAS ALMEIDA DE FREITAS**

**PREPARAÇÃO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS (MCLEAS) DE  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A  
PARTIR DE LACTOSE**

**FORTALEZA**

**2022**

LUCAS ALMEIDA DE FREITAS

PREPARAÇÃO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS (MCLEAS) DE  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A PARTIR DE  
LACTOSE

Monografia apresentada ao curso de Graduação  
em Biotecnologia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros  
Gonçalves

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F936p Freitas, Lucas Almeida de.  
Preparação de agregados enzimáticos magnéticos (mCLEAs) de  $\beta$ -galactosidase para produção integrada de D-tagatose a partir de lactose / Lucas Almeida de Freitas. – 2023.  
63 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Enzima. 2. Imobilização. 3. Soro de leite. 4. Hidrólise. I. Título.

CDD 661

---

LUCAS ALMEIDA DE FREITAS

PREPARAÇÃO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS (MCLEAS) DE  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A PARTIR DE  
LACTOSE

Monografia apresentada ao curso de Graduação  
em Biotecnologia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 02/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Marylane de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ednilda, por estar sempre ao meu lado, por fazer todo o possível para me apoiar e por se preocupar com minha felicidade. Ao meu pai Alberto, por sempre ter estado presente, mesmo à distância, contribuindo para o meu crescimento e bem-estar. Não poderia escolher uma criação melhor do que essa, amo muito vocês.

À Profª Drª Luciana Rocha Barros Gonçalves, por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado durante esses anos. Obrigado pelos ensinamentos, conselhos e oportunidades, sua presença na minha trajetória é marcante.

À Drª Marylane de Sousa, por me acompanhar nos meus primeiros anos de laboratório, pela paciência e por todas as lições e ajuda fornecidas.

Às professoras que aceitaram participar dessa banca Profª Drª Marjory Lima Holanda Araújo e Profª Drª Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, pelas aulas ótimas e leves, pela apresentação a fundamentos da profissão e pelas colaborações neste trabalho.

À minha família, que sempre acreditou em mim, em especial ao Felipe, que sempre se prontificou a me ajudar no que eu precisasse. À Luna, por iluminar meus dias desde sua chegada e por me lembrar do que me motiva a seguir em frente.

Às minhas queridas amigas de longa data Mariana, Catarina, Isabelle, Cibelly, Cinthia, Lorrana e Quezia, pelo companheirismo, pelos sorrisos e por todos os momentos compartilhados. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por ficarem ao meu lado.

Aos queridos amigos da faculdade Pedro, João, Cleber, Daniel, Isabela, Liandra, Lara, Melissa, Nicole, Natália Rios e Ana Maria, por tornarem mais leve a experiência desses anos, pelas conversas, jogos e momentos em geral. Obrigado por fazerem parte de tudo isso.

Aos colegas de trabalho do GPBio, por abrirem as portas para mim dezenas de vezes literalmente, em especial à Ravena, minha supervisora nesta reta final, e à Kimberly, que sempre estive tirando minhas dúvidas.

Aos colegas de turma e de curso, vocês são muitos para citar, mas fizeram parte de diversos momentos importantes para mim. A todos os professores que trouxeram não apenas conhecimento, mas também gentileza, paciência e experiência, bem como à Coordenação do Bacharelado em Biotecnologia, que sempre se faz presente.

Ao CNPq e FUNCAP, pelo apoio financeiro para condução do trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“The people you love will change you  
The things you have learned will guide you  
And nothing on Earth can silence  
The quiet voice still inside you”

(Lin-Manuel Miranda; *Moana*, 2016).

## RESUMO

A utilização de enzimas imobilizadas permite melhorar sua eficiência, possibilitando sua reutilização em diferentes processos e fácil separação do produto. Além disso, permite o uso simultâneo de enzimas em reações em cascata, acelerando processos. Desta forma, o presente trabalho objetiva estabelecer um protocolo eficiente de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase pela metodologia de agregados enzimáticos magnéticos (mCLEAs), bem como sua aplicação conjunta com mCLEAs de L-arabinose isomerase (LAI), para a produção de D-tagatose a partir de lactose do soro de leite. Diferentes protocolos de preparação de mCLEAs foram estudados, com a utilização de glutaraldeído em diferentes concentrações e de dextrana-aldeído como agentes reticulantes das enzimas. Os biocatalisadores foram avaliados quanto aos parâmetros de imobilização, como a atividade recuperada em relação à enzima livre, capacidade de hidrólise de lactose, cinética enzimática e estabilidades térmica, operacional e à estocagem. O biocatalisador que se destacou em parâmetros chave para a catálise, como atividade recuperada, da estabilidade térmica a 60 °C e da capacidade de hidrólise da lactose, foi escolhido para aplicação junto ao mCLEA de LAI para produção de D-tagatose a partir da lactose. Os biocatalisadores mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX foram selecionados dentre os estudados como os mais eficientes para aplicação. mCLEA-GLU-1.5 apresentou redução de afinidade pelo substrato com relação a mCLEA-DEX e à enzima livre, bem como uma menor estabilidade a 50 °C. Em contrapartida, foi o biocatalisador mais estável no decorrer dos ciclos de operação, bem como no período de estocagem estudado. Por apresentar maior atividade recuperada e melhor afinidade pelo substrato, mCLEA-DEX foi aplicado em reatores sequenciais junto a mCLEA-LAI, com início em solução de lactose na concentração do soro de leite, com rendimento de cerca de 10% de conversão da lactose em D-tagatose ao final do processo. O trabalho permite concluir que é factível a imobilização de  $\beta$ -galactosidase em mCLEAs, sendo mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX biocatalisadores viáveis para a utilização industrial na hidrólise de lactose do soro de leite. Além disso, demonstra o potencial da utilização conjunta de mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase e LAI para a produção de D-tagatose a partir do soro de leite.

**Palavras-chave:** enzima; imobilização; soro de leite; hidrólise.

## ABSTRACT

The use of immobilized enzymes allows achieving an improvement in its efficiency, enabling the reuse in different processes and easy product recovery. Besides, it also allows the simultaneous use of enzymes in cascade reactions, making it faster. Thus, the present work aims to establish an efficient immobilization protocol for  $\beta$ -galactosidase using the magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs) methodology and its application with L-arabinose isomerase (LAI) mCLEAs, to produce D-tagatose from whey lactose. Different immobilization protocols using mCLEAs were investigated, using different glutaraldehyde concentrations and dextran-aldehyde as enzyme cross-linking agents. The immobilization parameters of the biocatalysts were compared, such as recovered activity compared to the free enzyme, lactose hydrolysis capacity, enzyme kinetics, as well as thermal, operational, and storage stabilities. The biocatalyst that stood out in critical parameters for catalysis was chosen to be used with LAI mCLEAs to produce D-tagatose from lactose. After the studies of recovered activity, thermal stability at 60 °C, and lactose hydrolysis capacity, the biocatalysts mCLEA-GLU-1.5 and mCLEA-DEX were selected between the studied ones as the most efficient to application. mCLEA-GLU-1.5 presented lower substrate affinity when compared to mCLEA-DEX and the free enzyme and lower stability at 50 °C. In contrast, it was the most stable biocatalyst when assayed for operational and storage stabilities. With higher recovered activity and substrate affinity, mCLEA-DEX was used in sequential reactors with mCLEA-LAI, using a lactose solution with the same concentration as whey, yielding 10% conversion of lactose into D-tagatose at the end of the process. This work allowed to certify the viability of mCLEAs to immobilize  $\beta$ -galactosidase, with mCLEA-GLU-1.5 and mCLEA-DEX being viable biocatalysts to industrial use in whey lactose hydrolysis. Besides, it proves the potential of  $\beta$ -galactosidase and LAI mCLEAs joint use to produce D-tagatose from whey.

**Keywords:** enzyme; immobilization; whey; hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	14
Figura 2	– Produção de agregados de enzimas entrecruzados (CLEAs) como metodologia de imobilização de enzimas industriais .....	20
Figura 3	– Produção de agregados de enzimas entrecruzados magnéticos (mCLEAs) como metodologia de imobilização de enzimas industriais .....	22
Figura 4	– Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído .....	35
Figura 5	– Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído 1,5% .....	37
Figura 6	– Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com diferentes reticulantes ...	39
Figura 7	– Hidrólise de lactose pelos mCLEAs e $\beta$ -galactosidase livre .....	40
Figura 8	– Decaimento térmico a 50 °C dos mCLEAs e da $\beta$ -galactosidase livre .....	42
Figura 9	– Cinética da reação de hidrólise de lactose usando os mCLEAs de $\beta$ -galactosidase e a enzima livre .....	44
Figura 10	– Estabilidade operacional dos mCLEAs de $\beta$ -galactosidase .....	45
Figura 11	– Estabilidade dos biocatalisadores à estocagem a 4 °C .....	47
Figura 12	– Aplicação simultânea de $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase livres .....	48
Figura 13	– Produção de D-tagatose em biorreatores sequenciais .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização e atividade da $\beta$ -galactosidase imobilizada por mCLEAs .....	33
Tabela 2 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído .....	35
Tabela 3 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído 1,5% .....	37
Tabela 4 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com diferentes reticulantes .....	39
Tabela 5 – Parâmetros de desativação térmica a 50 °C dos mCLEAs e enzima livre .....	42
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da $\beta$ -galactosidase imobilizada e livre .....	43
Tabela 7 – Quadro de características dos mCLEAs de $\beta$ -galactosidase .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES	3-aminopropil trietoxisilano
BSA	Albumina de soro bovino
Y	Atividade relativa
K <sub>D</sub>	Constante de desativação térmica
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
CLEs	<i>Cross-linked enzymes</i>
CLEAs	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
mCLEAs	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i> magnéticos
CLECs	<i>Cross-linked enzyme crystals</i>
CLSDs	<i>Cross-linked spray dried enzymes</i>
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
FE	Fator de estabilidade
FIEC	Federação das Indústrias do Ceará
GOS	Galacto-oligossacarídeos
LAI	L-arabinose isomerase
oNPG	Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
PEI	Poliuretanoimina
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida
V <sub>MAX</sub>	Velocidade máxima

## LISTA DE SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorídrico
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
c	Centi
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Cloreto férrico hexahidratado
$\epsilon$	Coefficiente de extinção
Fe	Ferro
g	Gramas
°C	Graus Celsius
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
L	Litro
Mg	Magnésio
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
Mn	Manganês
®	Marca registrada
m	Metro
$\mu$	Micro
Min	Minutos
M	Molar
n	Nano
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato ferroso heptahidratado
U	Unidades de atividade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b><math>\beta</math>-galactosidase e suas aplicações</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Imobilização enzimática</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>Produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Produção de CLEAs magnéticos de <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Produção de CLEAs magnéticos de L-arabinose isomerase</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Determinação da atividade enzimática da <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinação da atividade enzimática da L-arabinose isomerase</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos de hidrólise de lactose por <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>30</b>
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de estabilidade térmica da <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8</b>	<b>Ensaio de estabilidade operacional e à estocagem</b> .....	<b>31</b>
<b>4.9</b>	<b>Aplicação para produção de D-tagatose</b> .....	<b>31</b>
<b>4.10</b>	<b>Testes estatísticos</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Parâmetros de imobilização dos mCLEAs de <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>mCLEAs de <math>\beta</math>-galactosidase em diferentes concentrações de glutaraldeído</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeitos do recobrimento do mCLEA produzido com glutaraldeído</b> .....	<b>36</b>
<b>5.4</b>	<b>Produção de mCLEA de <math>\beta</math>-galactosidase com dextrana-aldeído</b> .....	<b>38</b>
<b>5.5</b>	<b>Bioconversão de lactose em glicose e galactose</b> .....	<b>40</b>
<b>5.6</b>	<b>Estabilidade térmica dos biocatalisadores a 50 °C</b> .....	<b>41</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação dos modelos cinéticos utilizando lactose como substrato</b> .....	<b>43</b>
<b>5.8</b>	<b>Reutilização e armazenamento dos biocatalisadores</b> .....	<b>45</b>
<b>5.9</b>	<b>Aplicação de mCLEAs de <math>\beta</math>-galactosidase e de L-arabinose isomerase</b> .....	<b>47</b>
<b>5.10</b>	<b>Considerações e recomendações de uso dos mCLEAs de <math>\beta</math>-galactosidase</b> ...	<b>50</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO A – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DERIVADA DO TRABALHO .....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA D-TAGATOSE .....</b>	<b>63</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 $\beta$ -galactosidase e suas aplicações

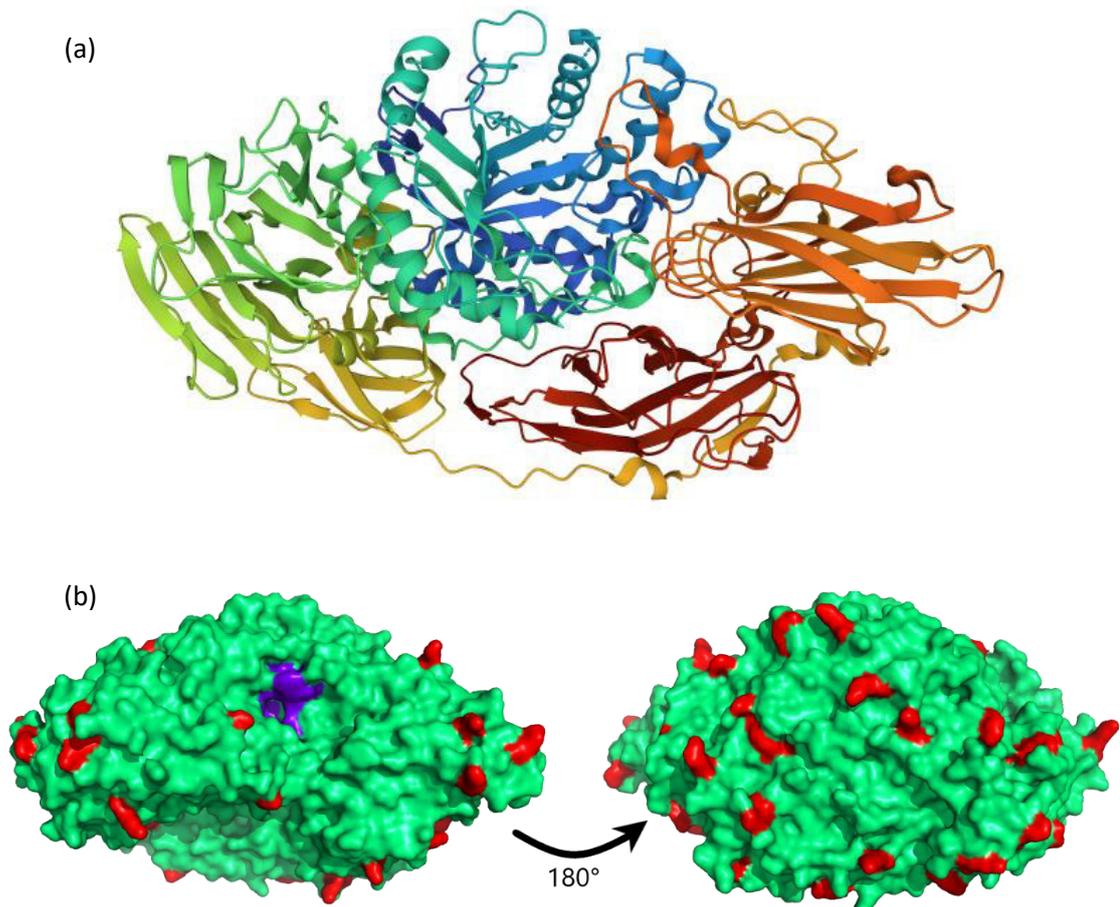
As enzimas são proteínas especializadas capazes de acelerar reações metabólicas ao reduzir a sua energia de ativação, sem alterar a constante de equilíbrio da reação catalisada, permitindo que ocorra em frações de segundo um processo que, na ausência da enzima catalisadora, não ocorreria em tempo hábil para sustentar o metabolismo dos seres vivos (DEMAN *et al.*, 2018). A  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), popularmente conhecida como lactase, é uma enzima da classe das hidrolases, que catalisam reações de rompimento de ligações pela adição de moléculas de água, mais especificamente, ligações glicosídicas, sendo uma enzima chave no metabolismo de carboidratos (HENRISSAT, 1991). As principais reações catalisadas pela  $\beta$ -galactosidase são a hidrólise de  $\beta$ -D-galactosídeos e  $\alpha$ -L-arabinosídeos e a transglicosilação para síntese de alguns oligossacarídeos (RICHMOND; GRAY; STINE, 1981). Ainda que produzida naturalmente em diversos animais, incluindo os seres humanos, essa enzima também pode ser obtida em seres dos três principais domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya), sendo as mais utilizadas industrialmente obtidas dos microrganismos *Aspergillus* sp. e *Kluyveromyces* sp. (HUSAIN, 2010).

O mecanismo de catálise da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise da lactose é descrito como catalisador ácido/base, pois monossacarídeos como a glicose, produto da hidrólise da lactose, que possuem muitos grupamentos básicos, necessitam de assistência de grupamentos ácidos para a estabilização da carga negativa nos átomos de oxigênio. O sítio ativo da enzima possui dois resíduos de ácido glutâmico essenciais para a catálise, Glu461, que atua como um doador de prótons, Glu537, que atua como grupo nucleófilo catalítico, que provê assistência à expulsão de grupos do carbono anomérico ou estabiliza íons intermediários da reação (RICHARD; WESTERFELD; LIN, 1995; BRÁS; FERNANDES; RAMOS, 2010).

Sendo uma das mais comercializadas, a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (Figura 1) apresenta vantagens em sua capacidade de catálise, atuando em faixas mais amplas de pH e temperatura. Ainda que obtida de um fungo filamentoso, cujas enzimas são caracterizadas por atuar em faixas de pH mais ácidas, a  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* apresenta uma boa atividade no pH natural do leite e do soro de leite, em torno de 6,6 (BAILEY; LINKO, 1990). Diversas

condições de temperatura ótima são relatadas para esta enzima, variando de 30 a 55 °C (TANAKA *et al.*, 1974; PARK; SANTI; PASTORE, 1979, BOSSO *et al.*, 2016), apresentando também atividade significativa a 37 °C, temperatura na qual foram conduzidos diversos processos relatados (SHUKLA; CHAPLIN, 1993; SCHECKERMANN; WAGNER; FISCHER, 1997; GAUR *et al.*, 2006). Para uma catálise eficiente, a  $\beta$ -galactosidase requer a presença de um cofator, geralmente um cátion bivalente, como  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ , ou monovalente, como  $K^+$  (MADANI; ZARIF-FARD; GOLCHIN-FAR, 1999).

Figura 1 –  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*



Fonte: MAKSIMAINEN *et al.* (2013), modificado pelo autor. (a) Visualização da estrutura tridimensional da  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*, com destaque para as estruturas secundárias. (b) Visualização tridimensional da superfície da estrutura molecular da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. O sítio ativo foi demarcado na cor roxa, enquanto os resíduos de lisina estão em vermelho. Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, sob o código de acesso 4IUG.

Sendo uma enzima naturalmente produzida nos enterócitos do intestino delgado humano, a  $\beta$ -galactosidase é responsável pela digestão da lactose presente no leite e derivados, e pessoas com deficiência nessa produção são ditas como intolerantes a lactose. Quando não devidamente metabolizada, devido à ausência da enzima catalisadora dessa reação, a lactose é acumulada no intestino e, devido a seu efeito osmótico, carrega consigo muitos fluidos, aumentando o fluxo no interior do intestino. Além disso, a lactose não digerida fica disponível para bactérias da microbiota intestinal, que realizam sua metabolização em processos fermentativos com produção de gás, e os produtos dessa metabolização não ficam disponíveis para absorção pela ocorrência tardia no trato intestinal. Esses fatores resultam em desconforto abdominal, para os intolerantes à lactose, além de diarreias e flatulência (SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002). Como uma forma de solucionar esse problema, nos últimos anos foram desenvolvidas diferentes formulações de  $\beta$ -galactosidase, produzida principalmente por microrganismos e comercializada para consumo oral junto a refeições contendo lactose (XENOS *et al.*, 1998). Dessa forma, a enzima exógena realiza o catabolismo que não é possível de ocorrer naturalmente em uma pessoa intolerante a lactose. Além do consumo de  $\beta$ -galactosidase exógena, a aplicação dessa enzima para a produção de laticínios já deslactosados é uma alternativa viável e amplamente empregada. O leite e derivados cuja lactose foi hidrolisada por  $\beta$ -galactosidase, além de poderem ser consumidos por pessoas intolerantes a lactose, apresentam uma série de vantagens, como aumento do dulçor, maior solubilidade dos sacarídeos e maior estabilidade do produto (JOKAR; KARBASSI, 2011).

Outras aplicações da  $\beta$ -galactosidase na indústria de alimentos, não envolvendo a busca por solucionar os problemas da intolerância à lactose, envolvem a melhora da consistência e sabor de alguns produtos. A lactose é um dissacarídeo com doçura inferior à da glicose, logo, sua quebra é capaz de aumentar o teor de doçura em certos alimentos, principalmente sobremesas à base de leite, tornando-as mais apetecíveis. A  $\beta$ -galactosidase pode inclusive ser utilizada com outras enzimas para a produção de xaropes adoçantes com diversos monossacarídeos a partir da lactose, para aplicação em outros produtos alimentícios (CHENG *et al.*, 2020). Sua aplicação é também cada vez mais apreciada no setor de sobremesas congeladas, como iogurtes e sorvetes. A lactose presente nesses alimentos, por ser altamente higroscópica, absorve muita água e cristaliza durante o congelamento, formando uma consistência arenosa no alimento, que é degradável ao paladar dos consumidores. O tratamento com  $\beta$ -galactosidase é capaz de eliminar completa ou parcialmente o efeito da cristalização no

produto, melhorando consideravelmente sua consistência (ABBASI; SAEEDABADIAN, 2013).

Indústrias de laticínios, como as produtoras de queijo, por exemplo, comumente têm como um de seus subprodutos o soro de leite, solução com diversas substâncias solúveis, incluindo proteínas, vitaminas, minerais e ácido láctico, e com teor considerável de lactose (44 a 56 g·L<sup>-1</sup>) (OLIVEIRA, 2019). O soro de leite, se descartado indevidamente pelas produtoras, pode entrar em contato com corpos d'água e gerar um aumento na demanda bioquímica de oxigênio (DBO) nesses ambientes. A presença da lactose no soro é responsável por esse aumento drástico na DBO (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009), pelo acúmulo de matéria orgânica, o que pode desencadear processos de eutrofização, com a proliferação de microrganismos aeróbios decompositores e algas, que esgotam o oxigênio disponível para as demais formas de vida aquáticas. Como a quantidade de microrganismos capazes de metabolizar lactose como fonte de carbono é bem inferior à daqueles capazes de metabolizar glicose e galactose, a biorremediação de ambientes contaminados por soro de leite é inviável sem que haja um tratamento prévio (ROSOLEN *et al.*, 2015). O tratamento dos corpos d'água com  $\beta$ -galactosidase é então uma opção atrativa para a preparação do ambiente para a biorremediação. Além disso, essa enzima pode ser utilizada em tratamentos *end-of-pipe*, pelas próprias indústrias de laticínios, para evitar a contaminação orgânica de leitos d'água próximos (BRIÃO; TAVARES, 2007).

Não apenas a  $\beta$ -galactosidase pode ser utilizada no soro de leite para seu tratamento e descarte, mas também pode ser aplicada para seu aproveitamento econômico, com a obtenção e processamento dos monômeros resultantes da hidrólise, representando uma fonte alternativa lucrativa para um subproduto que de outro modo seria apenas perdido. A aplicação conjunta de  $\beta$ -galactosidase e microrganismos fermentadores no soro de leite, como leveduras do gênero *Saccharomyces* sp., resulta na produção de etanol, uma das utilizações mais atraentes por possibilidade de aplicação tanto em setores alimentícios quanto de biocombustíveis, ambos lucrativos (ASRAF; GUNASEKARAN, 2010). A glicose proveniente da hidrólise da lactose também pode ser purificada e aplicada a diversos setores, com destaque para o laboratorial, onde pode ser utilizada para a produção de meios de cultura de microrganismos e plantas. Outras formas de aproveitamento do soro de leite utilizam a atividade de transglicosilação da  $\beta$ -galactosidase para a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS), compostos fisiologicamente ativos ideais para o mercado de alimentos funcionais e prebióticos. Antes produzidos a partir de soluções de lactose puras, a produção de GOS com utilização da  $\beta$ -

galactosidase a partir de um subproduto industrial, substrato mais barato e versátil, representa uma estratégia economicamente atrativa (SIMOVIĆ *et al.*, 2019). A hidrólise enzimática do soro de leite também disponibiliza a galactose para possíveis aplicações, dentre elas a sua isomerização para produção de D-tagatose, um adoçante emergente com potencial para substituição da sacarose e do xarope de frutose, principalmente considerando dietas restritivas, utilizado também como aditivo em cosméticos, detergentes e formulações farmacêuticas (CHENG *et al.*, 2020).

## 1.2 Imobilização enzimática

A busca crescente pela introdução da química verde em ambientes industriais nas últimas décadas trouxe à tona o potencial da utilização de enzimas como substituição a reagentes químicos, na busca pela remoção ou redução do uso de materiais perigosos à saúde humana e ao meio ambiente nos seus processos, bem como a redução da produção de resíduos não biodegradáveis, o aumento da eficiência dos processos, a utilização de insumos renováveis e a economia de energia (ABDUSSALAM-MOHAMMED; ALI; ERRAYES, 2020). As enzimas apresentam numerosas vantagens relacionadas a essa busca por uma economia sustentável, como a capacidade de atuação em condições mais brandas de temperatura, geralmente entre 20 e 40 °C, diminuindo o gasto energético necessário para elevar a temperatura na condução dos processos, e a estabilidade em faixas amplas e mais neutras de pH, geralmente de 5,0 a 8,0, evitando a utilização de ácidos e bases fortes, que podem causar muitos acidentes e demandam um tratamento mais laborioso na sua separação do produto e prévio ao descarte. Além disso, por serem proteínas, são biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser aplicadas em conjunto em reações em cascata para otimização de processos (FABER, 2004). Também por apresentarem sítios de reação assimétricos e de grande complexidade tridimensional, as enzimas possuem uma especificidade catalítica capaz de distinguir mesmo configurações estereoquímicas das moléculas, o que evita a produção dos racematos, misturas de isômeros ópticos indesejáveis a certos processos industriais (LEUENBERGER, 1990).

Para o máximo aproveitamento das enzimas em um ambiente industrial, reduzindo os custos e maximizando o lucro, é desejável que as enzimas possam ser reutilizadas diversas vezes, de acordo com o pilar de reaproveitamento da química verde. Como as enzimas são proteínas, com diferentes regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, elas são altamente solúveis em

diversos tipos de solventes, o que gera problemas relacionados à estabilidade a longo prazo, mas principalmente inviabiliza a sua recuperação e reciclagem (BORNSCHEUER, 2003). Por ficarem misturadas homogeneamente tanto aos substratos quanto aos produtos, em pequena escala, é necessário a realização de técnicas de cromatografia para separação e purificação das enzimas, de forma que possam ser reutilizadas. A recuperação das enzimas aumenta o custo e reduz a produtividade, podendo inviabilizar economicamente o processo produtivo. A viabilização da reutilização de enzimas é alcançada por meio da imobilização enzimática, que consiste em uma gama de metodologias capazes de integrar as enzimas a um suporte ou matriz insolúvel, de forma que realizem uma catálise heterogênea e possam ser recuperadas e reutilizadas por longos períodos, podendo ainda ser aplicadas a processos em diferentes formatos. A escolha da utilização de enzimas na sua forma livre ou imobilizada é dependente de parâmetros relacionados principalmente ao custo da enzima e à forma de sua aplicação (BASSO; SERBAN, 2019).

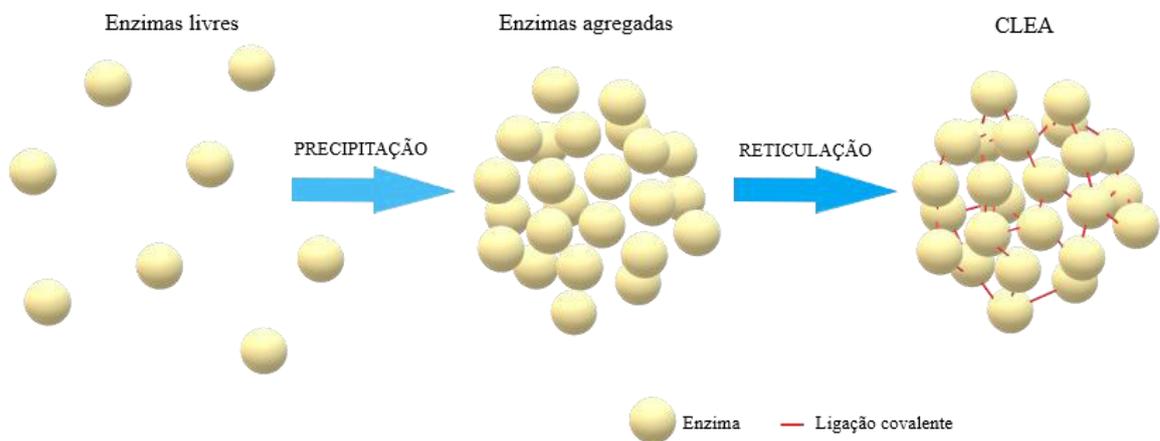
Enzimas imobilizadas podem ser separadas do meio reacional por métodos mais simples, como centrifugação e filtração, podendo ser reaproveitadas para outros processos restando a maior parte da sua atividade catalítica. Os métodos mais comuns de imobilização envolvem a ligação das enzimas a matrizes diferentes, que podem ser mais comumente polímeros inertes ou materiais inorgânicos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012). As matrizes para imobilização, além de serem inertes, devem apresentar características como viabilidade econômica, resistência mecânica, estabilidade, regenerabilidade, e capacidade para aumentar a atividade específica e reduzir adsorção não específica e inibição. Diferentes métodos de imobilização podem ser aplicados, dependendo das características das enzimas e suportes, como adsorção física, hidrofóbica ou eletrostática, ligação covalente, encapsulação e reticulação (NGUYEN; KIM, 2017). A escolha do método de imobilização mais apropriado é dependente de várias características físico-químicas e econômicas resultante da interação entre enzimas e entre enzimas e suportes, tais como resistência mecânica do imobilizado, simplicidade e custo do método de imobilização, necessidade de purificação, estabilização enzimática, impacto na atividade catalítica, modulação da seletividade e apresentação de problemas relacionados à inibição (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Como a imobilização em suportes diminui significativamente a atividade volumétrica do biocatalisador, por ocupar de 90 a 99% da massa total do imobilizado, além de muitas vezes necessitar de gastos adicionais com a ativação dos suportes, torna-se atrativa a imobilização de enzimas sem a utilização de suportes. As imobilizações sem suporte foram introduzidas com as enzimas entrecruzadas (do

inglês *cross-linked enzymes* – CLEs), que consiste inicialmente na aplicação de um agente reticulante a uma solução enzimática, com a finalidade de formar ligações entrecruzadas entre as enzimas. Como os CLEs apresentavam baixa reprodutibilidade, baixa retenção de atividade e baixa reprodutibilidade, não tardou a surgir técnicas de reticulação sem suporte alternativas. Nelas, as enzimas passam por algum tratamento prévio à reticulação, seja ele a cristalização, para formação de cristais de enzimas entrecruzadas (do inglês *cross-linked enzyme crystals* – CLECs), secagem por pulverização, para formação de enzimas secas por aspersão entrecruzadas (do inglês *cross-linked spray dried enzymes* – CLSDs), ou a agregação, para formação de agregados de enzimas entrecruzadas (do inglês *cross-linked enzyme aggregates* – CLEAs), sendo a última uma das metodologias mais utilizadas atualmente para diferentes tipos de enzimas (SHELDON, 2011; TALEKAR *et al.*, 2013).

Os CLEAs consistem num tipo de imobilização que envolve a formação de agregados insolúveis de enzimas e formação de ligações entrecruzadas entre suas moléculas. Como a massa molecular dos agentes que formam as ligações entrecruzadas é geralmente desprezível em relação à das enzimas, esse tipo de imobilização é composto essencialmente apenas por proteínas, evitando os problemas relacionados a rendimentos por tempo e volume (SCHOEVAART *et al.*, 2004). A produção dos CLEAs tem duas etapas principais: a precipitação e a reticulação, como mostrado na Figura 2. A etapa de precipitação é crítica para que as enzimas formem agregados mantendo uma conformação estável e ativa, tornando-as insolúveis no meio de reação. Isso é realizado por meio da adição de agentes precipitantes, como sais, polímeros iônicos e não iônicos e solventes orgânicos, que alteram o estado de hidratação das moléculas e a constante eletrostática da solução. Para cada enzima, e dependendo também de sua fonte, os parâmetros relacionados ao precipitante devem ser otimizados, determinando o melhor agente para a enzima, sua concentração e duração da incubação, de forma a atingir maiores rendimentos (NOORI; PERWEZ; SARDAR, 2019). As enzimas ficam então em um estado insolúvel, disponíveis para a formação de ligações entrecruzadas na etapa de reticulação. Para isso, é adicionado um agente reticulante, que é um reagente capaz de formar ligações covalentes com resíduos de aminoácidos das enzimas, ligando-as umas às outras, na formação de agregados insolúveis mesmo quando em meios não saturados. Essa etapa deve também ser otimizada para cada enzima, levando-se em consideração os mesmos parâmetros utilizados para a escolha do agente precipitante, bem como os parâmetros da etapa, como tempo de incubação, concentração e razão em massa entre agente reticulante e enzima. Substâncias usadas como agentes reticulantes devem ser capazes de fazer ligações covalentes com mais de

uma molécula de enzima ao mesmo tempo, chamados de agentes bifuncionais ou polifuncionais, como é o caso do glutaraldeído, agente bifuncional mais utilizado e comercializado para este fim, da p-benzoquinona, agente capaz de fazer ligações com grupos hidroxila e sulfidrilas das enzimas (WANG *et al.*, 2011), da dextrana-aldeído, um polímero polifuncional (MATEO *et al.*, 2004), do aminoácido L-lisina na presença de albumina de soro bovino (BSA) e da quitosana ativada (CUI; JIA, 2013).

Figura 2 – Produção de agregados de enzimas entrecruzados (CLEAs) como metodologia de imobilização de enzimas industriais



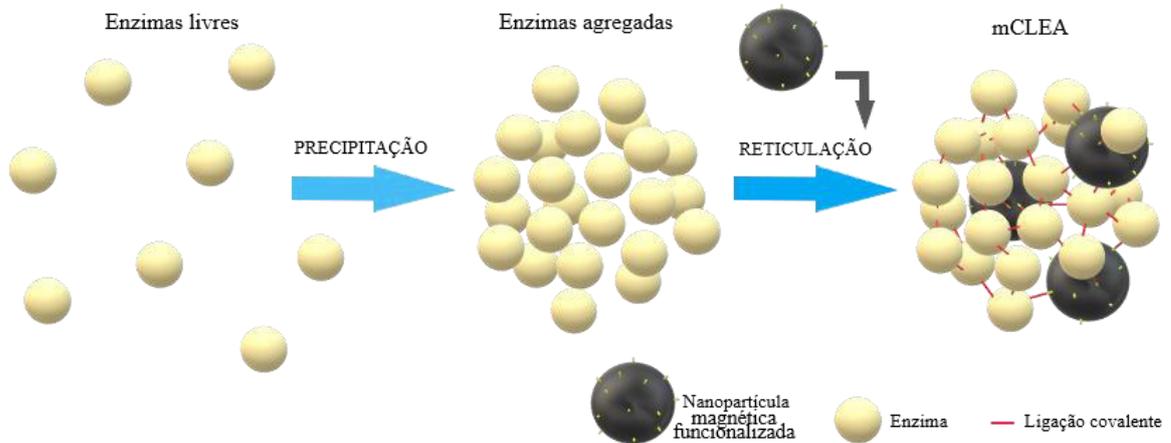
Fonte: elaborado pelo autor.

O glutaraldeído é um reagente bifuncional, capaz de reagir com grupos amino de resíduos de aminoácidos lisina, formando entre eles ligações entrecruzadas. A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima com diversos aminoácidos lisina em sua estrutura (Figura 1), o que a torna apta à imobilização por ligação covalente desses grupos, como já constatado em trabalhos produzidos anteriormente por Gaur *et al.* (2006), Li *et al.* (2015) e Ulrich *et al.* (2017). Já a dextrana-aldeído é um agente com propriedades semelhantes à do glutaraldeído, ou seja, capaz de realizar ligações entrecruzadas com grupos amino de resíduos de lisina, mas possui proporções moleculares bem maiores, e já foi relatada como um agente útil para a produção de CLEAs com boa recuperação de atividade (CUI; JIA, 2015).

Desde a primeira apresentação, a tecnologia de imobilização por CLEAs tem sido bastante estudada com esforços voltados ao seu aprimoramento, melhoria da atividade, da

estabilidade e das propriedades mecânicas dos biocatalisadores, incluindo estratégias de co-agregação com outras proteínas no caso de enzimas com poucos resíduos disponíveis para ligações entrecruzadas (DONG *et al.*, 2010), de produção de biocatalisadores porosos para evitar problemas de transferência de massa (WANG *et al.*, 2010), de recobrimento de CLEAs de enzimas multiméricas com polímeros ou de *imprinting* molecular para fixação da conformação mais ativa das enzimas imobilizadas (WINTER; SOETAERT; DESMET, 2012). Outra técnica que pode ser incorporada aos CLEAs, com foco na etapa de separação do produto, é a formação de CLEAs magnéticos, através da incorporação de matrizes magnéticas na etapa de reticulação dos agregados enzimáticos, o que contribui para a formação de biocatalisadores com maior estabilidade operacional e reutilização facilitada (VELASCO-LOZANO *et al.*, 2015). Essa mudança permite que, em troca das etapas de centrifugação e filtração normalmente empregadas, os biocatalisadores possam ser separados do meio reacional através da aplicação de um campo magnético ao reator, que isola os agregados e permite o escoamento do líquido (SOUSA *et al.*, 2020). Um dos tipos de matriz magnética que pode ser incorporada à formação de CLEAs são as nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), sintetizadas a partir de sais de ferro. Uma das principais vantagens na utilização de nanopartículas em relação a materiais de maiores dimensões é sua relação entre superfície e volume, já que por estarem em escala nano, pouca massa de partículas é necessária para a formação de muitas ligações covalentes com as enzimas, o que não afeta significativamente a atividade volumétrica do biocatalisador (WANG *et al.*, 2017). Além disso, as nanopartículas magnéticas podem ser funcionalizadas através de modificações covalentes ou não covalentes com moléculas orgânicas, de forma a incorporar grupos de reação específicos para ligações entrecruzadas com as enzimas (TALEKAR *et al.*, 2012). As nanopartículas funcionalizadas podem ser então incorporadas no processo de produção dos CLEAs na etapa de reticulação, para a formação dos CLEAs magnéticos (mCLEAs), como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 – Produção de agregados de enzimas entrecruzados magnéticos (mCLEAs) como metodologia de imobilização de enzimas industriais



Fonte: elaborado pelo autor.

### 1.3 Produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase

A D-tagatose é um monossacarídeo isômero da galactose, conhecido comercialmente como natrulose, raro de ocorrer naturalmente em grandes quantidades, sendo encontrado em alguns alimentos apenas como traços (OH, 2007). Sua produção é de interesse comercial por ser um adoçante eficiente e com diversas vantagens em relação a outros substituintes do açúcar de mesa. A D-tagatose é um açúcar com textura similar à da sacarose, e apresenta 92% de sua doçura, porém possui cerca de apenas um terço das calorias presentes no açúcar comum, tornando-a um adoçante viável para dietas com restrição calórica. Isso se deve ao fato dessa cetohexose ser um açúcar mal absorvido pelo intestino delgado humano, com 20 a 25% de absorção, ficando disponível como prebiótico para a microflora intestinal, sem propriedades laxativas, diferente da lactose (ROY *et al.*, 2018). Diferente de adoçantes comuns, a D-tagatose não possui gosto residual, o que torna a experiência de seu consumo mais próxima à do açúcar comum. Além disso, esse açúcar não contribui para o surgimento de cáries, e é também anti glicêmico, ou seja, pode ser utilizado em dietas de pessoas diabéticas (GUERRERO-WYSS; AGÜERO; DÁVILA, 2018). A produção de D-tagatose pode ser conduzida através de um

método químico de isomerização da galactose, com a utilização de hidróxido de cálcio como catalisador da reação principal (BEADLE; SAUNDERS; WAJDA, 1992). Esse processo apresenta, no entanto, diversas desvantagens, como a condução em meio altamente alcalino, no qual açúcares são normalmente instáveis, a formação de muitos subprodutos e resíduos químicos, e a complexidade de purificação. Diante disso, a viabilidade de sua produção através de métodos biológicos, com a utilização de enzimas, é significativamente atraente para a indústria.

A produção de D-tagatose por rota enzimática é realizada através da enzima L-arabinose isomerase (LAI, EC 5.3.1.4), que catalisa naturalmente a isomerização da L-arabinose em L-ribulose. Por possuir baixa especificidade para o substrato, a LAI é capaz também de realizar a isomerização de galactose em D-tagatose, como uma atividade secundária (KIM, 2004; SOUSA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2021). A LAI é uma enzima multimérica produzida por uma gama de microrganismos, com diferenças significativas dependendo de sua origem, com relação a atividade, parâmetros cinéticos, termoestabilidade, faixa de pH de atuação e necessidade de metais (XU *et al.*, 2014). De forma geral, as condições ideais para a produção biológica de D-tagatose a partir da galactose envolvem temperaturas de 50 a 70 °C e pH moderadamente ácido, de 5 a 7, de forma a simultaneamente deslocar o equilíbrio da reação para produção de D-tagatose e evitar a formação de subprodutos e reações de caramelização. Dessa forma, as fontes preferenciais de LAI são microrganismos termofílicos ou termotolerantes, como o *Enterococcus faecium* (MANZO *et al.*, 2019).

Como para a maioria das enzimas, a viabilidade de utilização da LAI para produção industrial de D-tagatose é dependente de imobilização, principalmente considerando que a enzima é normalmente requerida em grandes quantidades para compensar a velocidade mais reduzida de sua catálise, logo é essencial que possa ser reutilizada (LIANG *et al.*, 2011). Dessa forma, diversos trabalhos de imobilização da LAI já foram desenvolvidos para atender essa demanda, incluindo com emprego da tecnologia de CLEAs magnéticos, com recuperação de atividade satisfatória no biocatalisador final (SOUSA *et al.*, 2020). Dentre as possibilidades de aprimoramento da produção industrial de D-tagatose com LAI imobilizada há a oportunidade de obter o substrato da isomerização, a galactose, de fontes mais baratas ou subaproveitadas, como o soro de leite, que possui teor considerável de lactose disponível a ser hidrolisada (RAVIKUMAR *et al.*, 2021). Logo, é plausível a aplicação de  $\beta$ -galactosidase e de LAI imobilizadas para atuação em uma reação em cascata capaz de produzir D-tagatose a partir do soro de leite, passando pelas etapas de hidrólise da lactose e de isomerização da galactose.

## 2 JUSTIFICATIVA

Com o crescimento do número de pessoas em busca de hábitos de vida mais saudáveis, aliado à preocupação dos órgãos mundiais de saúde com problemas relacionados a obesidade, a tendência do mercado mundial é a substituição do açúcar comum, a sacarose, por substituintes de baixo valor calórico. Não há dados estatísticos oficiais a respeito do consumo de edulcorantes no Brasil, mas especialistas afirmam que a tendência é a mesma que no resto do globo (MARTINS, 2018; BERNARDO, 2020). A D-tagatose ainda é um mercado tímido em relação aos demais edulcorantes, mas com tendência a aumentar até 2026, principalmente considerando os avanços em sua produção biológica (ENERGY SIREN, 2021). A busca por matérias-primas baratas, como o soro de leite, para essa produção apresenta grande relevância nesta tendência, abrindo possibilidades para o crescimento deste mercado lucrativo no Brasil.

O estado do Ceará, sendo um grande produtor de laticínios, incluindo grandes e pequenos produtores de leite no Sertão Central (LEILAMARA DO NASCIMENTO ANDRADE, 2020), apresenta muita disponibilidade de produção de soro de leite, que pode ser o substrato para a reação em cascata de produção da D-tagatose. Somente na base de dados do Econodata, há 357 empresas de laticínios no estado, incluindo especializadas em queijos, leite em pó, manteiga, doce de leite e, inclusive, o próprio soro de leite (ECONODATA, 2021). A aplicação de novas tecnologias na indústria cearense, na qual pode-se incluir a produção biológica de D-tagatose, é prevista pelo Programa para Desenvolvimento da Indústria, elaborado pela Federação das Indústrias do Ceará (FIEC). O Programa prevê ações que dão base ao estabelecimento dessa tecnologia no setor, como a adoção de estratégias de inovação para gerar bioprodutos de alto valor agregado, a utilização de biotecnologia e nanotecnologia na Indústria Agroalimentar, a ampliação de pesquisa na área de alimentos funcionais e o incentivo à modernização tecnológica de micros e pequenas empresas (EDVÂNIA RODRIGUES BRILHANTE, 2020).

Dessa forma, o presente trabalho apresenta a imobilização da  $\beta$ -galactosidase em mCLEAs, e sua utilização junto a mCLEAs de L-arabinose isomerase, como uma inovação tecnológica com potencial para alavancar um mercado lucrativo e com apelo à saúde pública no estado do Ceará, bem como nos outros estados do Brasil.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho propõe-se a estabelecer uma metodologia de imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma de CLEAs magnéticos (mCLEAs), gerando biocatalisadores ativos e estáveis, úteis para a aplicação na hidrólise da lactose do soro de leite, subproduto comum e pouco aproveitado nas indústrias de laticínios, e produção de D-tagatose na presença de mCLEAs de L-arabinose isomerase.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Comparar a atividade e estabilidade de mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase obtidas por meio de diferentes metodologias de reticulação de enzimas.
2. Testar a capacidade de hidrólise de lactose pelos imobilizados de  $\beta$ -galactosidase.
3. Obter os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada.
4. Verificar a estabilidade dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase na temperatura ótima de atuação da L-arabinose isomerase.
5. Atestar a viabilidade de armazenamento e de reutilização dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase.
6. Produzir mCLEAs de L-arabinose isomerase segundo metodologia pré-estabelecida.
7. Aplicar os mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase junto aos mCLEAs de L-arabinose isomerase de forma sequencial e de forma simultânea para produzir D-tagatose a partir de lactose.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas

A síntese das nanopartículas magnéticas foi realizada como previamente descrito por Bezerra *et al.* (2017), com modificações. Inicialmente, foram dissolvidos sais metálicos contendo cátions  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , em proporção molar 1:2, em água ultrapura previamente acidificada com ácido clorídrico (HCl) 5%, para a faixa de pH de 3,0 a 4,0. Para isso, foram utilizados 0,99 g de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e 1,93 g de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), para um volume total de 30 ml, que ficou sob agitação magnética durante 30 minutos. Após, a solução foi mantida sob agitação ultrassônica vigorosa (amplitude 40%) durante 9 minutos, com a adição de 10 mL de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) gota a gota durante o período. As nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) formadas foram lavadas vigorosamente com água ultrapura até que a solução residual ficasse em pH neutro, e posteriormente foram armazenadas em dessecador.

Para a funcionalização da magnetita. 100 g de nanopartículas foram suspensas em uma mistura de 20 mL de etanol e 20 mL de tolueno, com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de 3-aminopropil trietoxissilano (APTES). A suspensão foi mantida sob agitação ultrassônica, seguindo os mesmos parâmetros utilizados na etapa de síntese da magnetita. As nanopartículas funcionalizadas foram lavadas vigorosamente e armazenadas em dessecador.

### 4.2 Produção de CLEAs magnéticos de $\beta$ -galactosidase

A  $\beta$ -galactosidase utilizada foi a de *Aspergillus oryzae*, adquirida na forma liofilizada da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). A produção dos mCLEAs com a utilização de glutaraldeído como agente reticulante se deu com base na metodologia estabelecida por Gaur *et al.* (2006), com modificações. Para cada amostra, 20 mg de  $\beta$ -galactosidase foi solubilizada em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. À cada solução, foi adicionado o agente precipitante sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), primeiro 550 mg na forma de sólido e depois 1 mL na forma de solução 55% m/v, e deixou-se sob agitação

magnética durante 15 minutos. Adicionou-se então a cada amostra 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, e foi adicionado o agente reticulante, glutaraldeído 25%. Diferentes amostras foram produzidas com diferentes concentrações finais de glutaraldeído, a saber 0,625% (mCLEA-GLU-0.6), 1% (mCLEA-GLU-1) e 1,5% (mCLEA-GLU-1.5). Após 16 horas de agitação mecânica das amostras, em banho de gelo, estas foram submetidas a 4 ciclos de centrifugação, a 5000 rpm e a 4 °C, durante 15 minutos nos dois primeiros ciclos e 10 minutos nos dois últimos, e lavagem em tampão, resultando em amostras úmidas que foram pesadas, identificadas e armazenadas para as análises posteriores. Uma das amostras produzidas com 1,5% de glutaraldeído foi submetida a mais um processo, o recobrimento com polietilenoimina (PEI), sendo nomeada mCLEA-PEI. A massa de imobilizado produzida foi submetida a 5 horas de agitação rotativa imersa em uma solução de PEI 10%, em uma razão de 1:10 de massa de imobilizado para solução de PEI. O imobilizado resultante, mCLEA-PEI, foi então lavado e armazenado para análises posteriores.

A produção de mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase com a utilização de dextrana-aldeído se deu com base na metodologia estabelecida por Mateo *et al.* (2004), com modificações. A solução de dextrana-aldeído foi preparada através da oxidação de uma solução de dextrana (Mr 450000-650000) com periodato de sódio, durante 90 minutos, sob agitação em temperatura ambiente. A solução foi dialisada durante 10 horas, contra água destilada. 20 mg de  $\beta$ -galactosidase foram solubilizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 8,0). A etapa de precipitação com sulfato de amônio foi igual à realizada para os imobilizados produzidos com glutaraldeído, e a mesma massa de nanopartículas magnéticas funcionalizadas foi adicionada. Para a reticulação, foram adicionados 2 mL da solução de dextrana-aldeído, e deixou-se a amostra sob agitação mecânica por 16 horas em banho de gelo, período após o qual foi submetida a 4 ciclos de centrifugação e lavagem, nas mesmas condições das amostras produzidas com glutaraldeído. A amostra mCLEA-DEX foi então pesada e armazenada para análises posteriores.

### **4.3 Produção de CLEAs magnéticos de L-arabinose isomerase**

Para a imobilização da L-arabinose isomerase (LAI) em CLEAs magnéticos, foi utilizado o protocolo estabelecido por Sousa *et al.* (2020). A LAI recombinante de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 utilizada nesse trabalho foi produzida através da expressão em *Escherichia coli* BL21 contendo o gene pET29-ARA95, e o extrato de enzima foi

concentrado (SOUSA *et al.*, 2020). A concentração de proteína no extrato, composto majoritariamente por LAI, foi medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para uma concentração final de 20 mg/mL em 4 mL de solução, parte do extrato de LAI foi misturada com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Foram adicionados 2,8 g do precipitante sulfato de amônio, e deixou-se sob agitação magnética durante 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e 128 µL de glutaraldeído, e a mistura foi deixada sob agitação mecânica em banho de gelo durante 16 horas. Após esse período, a amostra mCLEA-LAI foi submetida a 4 ciclos de centrifugação (5000 rpm, 4°C, 30 minutos na primeira e 10 minutos nas subsequentes) e lavagem, sendo depois pesada e armazenada para análises posteriores.

#### 4.4 Determinação da atividade enzimática da β-galactosidase

O ensaio para determinação da atividade da β-galactosidase, tanto livre quanto imobilizada, foi feito através da medida em espectrofotômetro do aumento de absorvância a 420 nm durante 2 minutos pela liberação de o-nitrofenil proveniente da incubação da enzima com orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (oNPG) 1,25 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, na presença do cofator MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, a 37 °C (FREITAS *et al.*, 2013). O coeficiente de extinção,  $\epsilon$ , sob essas condições foi 4,53 cm<sup>2</sup>µmol<sup>-1</sup>. Para a enzima livre, a carga utilizada foi 25 µL de uma solução 10 mg/mL, e para os imobilizados, utilizou-se 50 µL de uma suspensão de 0,1 g de mCLEA para 1 mL de tampão. Uma unidade (U) de β-galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de oNPG por minuto, sob as condições apresentadas. A atividade foi calculada segundo a equação (1):

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\text{Slope (min}^{-1}) \cdot V_r \text{ (mL)}}{V_e \text{ (mL)} \cdot L \text{ (cm)} \cdot \epsilon \text{ (cm}^2\mu\text{mol}^{-1})} \quad (1)$$

Onde as variáveis são a variação de absorvância no tempo de análise (Slope), o volume total de reação (V<sub>r</sub>) e o volume de enzima adicionada (V<sub>e</sub>), e L é o caminho óptico (1 cm). Para o cálculo de atividade dos mCLEAs, o volume de enzima é substituído pela massa estimada do mCLEA (M<sub>d</sub>) dependente da proporção e do volume de suspensão adicionado, e o valor de atividade é dado em U/g. Este valor é então multiplicado pela massa úmida obtida do imobilizado, em gramas, gerando um resultado em U, da atividade total do mCLEA produzido. A atividade teórica de cada imobilizado foi considerada como a atividade total oferecida na

solução de enzima, em U, feita a subtração da atividade encontrada no sobrenadante após a imobilização. Dessa forma, a atividade recuperada foi calculada como uma porcentagem da atividade obtida em cada mCLEA em relação à atividade teórica. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi também avaliada frente a seu substrato natural, a lactose, em ensaios de hidrólise. Para as amostras mCLEA-GLU-1.5, mCLEA-PEI e mCLEA-DEX, foram adicionados 0,3 g de mCLEA em reatores contendo 5 mL de solução de lactose 164 mM, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM. Para a enzima livre, foi adicionado um volume com atividade correspondente à presente nos CLEAs. Os reatores foram mantidos a 37 °C durante 24 horas, sob agitação mecânica constante. Amostras foram retiradas com intervalos de 1 hora durante as 7 primeiras horas de análise, retirando-se outra ao final das 24 horas de experimento, para medida da concentração de glicose presente com o Kit de Glicose Bioclin®.

#### 4.5 Determinação da atividade enzimática da L-arabinose isomerase

A medida de atividade do extrato de L-arabinose isomerase (LAI) livre e da mesma enzima imobilizada em CLEA magnético foi realizada como descrito por Sousa *et al.* (2020). 100  $\mu$ L do extrato ou de suspensão de mCLEAs (0,1 g em 1mL) foi posto em contato com solução de galactose 500 mM, tudo preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 com  $MnCl_2$  1 mM. A mistura foi mantida a 50 °C durante 1 hora, sendo depois prontamente congelada para interrupção da reação. Após, foi utilizada no método ácido sulfúrico-cisteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951), para avaliação colorimétrica da concentração de D-tagatose formada. A concentração de D-tagatose produzida foi calculada conforme curva padrão relacionando este parâmetro ao valor de absorvância obtido a 560 nm (ANEXO B; OLIVEIRA, 2019). Foi determinado como uma unidade (U) de atividade a quantidade de LAI utilizada para produzir 1  $\mu$ mol de D-tagatose por minuto, de acordo com a equação (2):

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{[\text{TAG}](\text{mM}) \cdot V_r (\mu\text{L}) \cdot D}{V_e (\text{mL}) \cdot t (\text{min})} \quad (2)$$

Onde as variáveis são a concentração de D-tagatose produzida ([TAG]), o volume de reação ( $V_r$ ), o fator de diluição utilizado (D), o volume de enzima ou suspensão adicionado ( $V_e$ ) e o tempo de reação ( $t = 60$  min). Para o cálculo de atividade dos mCLEAs, o volume de enzima é substituído pela massa estimada do mCLEA ( $M_d$ ) dependente da proporção e do volume de

suspensão adicionado, e o valor de atividade é dado em U/g. Este valor é então multiplicado pela massa úmida obtida do imobilizado, em gramas, gerando um resultado em U, da atividade total do mCLEA produzido.

#### **4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos de hidrólise de lactose por $\beta$ -galactosidase**

Para calcular os parâmetros cinéticos velocidade máxima ( $V_{MAX}$ ) e constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), os biocatalisadores mCLEA-GLU-1.5, mCLEA-PEI e mCLEA-DEX e a enzima livre foram utilizados para reação de hidrólise em soluções de lactose de concentração crescente (5, 10, 20, 30, 50, 100 e 200 mM), por 60 minutos, como previamente descrito por Li *et al.* (2015), com modificações. Para os mCLEAs, utilizou-se 0,025 g de enzima imobilizada em 250  $\mu$ L de solução de lactose, enquanto para a enzima livre, utilizou-se 650  $\mu$ L de solução de  $\beta$ -galactosidase dialisada e diluída 1:4 em 850  $\mu$ L de solução de lactose, todas as soluções preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com adição do cofator  $MnCl_2$ , a 0,1 mM na solução final. As medidas de concentração de glicose resultante da reação de conversão foram realizadas utilizando o Kit de Glicose Bioclin®. Os resultados foram ajustados utilizando o software Origin 8.5 para gerar as curvas relacionando velocidade inicial à concentração de substrato.

#### **4.7 Ensaios de estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase**

Para cada ensaio com biocatalisadores imobilizados, foram ressuspensos 150 mg de mCLEA em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, previamente aquecido nas temperaturas de 50 e 60 °C. Para a enzima livre, uma solução dialisada com concentração ajustada para igualar-se à atividade presente nos CLEAs foi também misturada a tampão previamente aquecido. As soluções e suspensões foram mantidas a temperatura constante, com a retirada de amostras para medida de atividade com oNPG nos tempos de 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos na temperatura de 60 °C, e a cada 1 hora nos intervalos de 0 a 7 horas e de 16 a 24 horas na temperatura de 50 °C. Apenas a enzima livre, mCLEA-DEX e mCLEA-GLU-1.5 foram submetidos ao ensaio a 50 °C, sendo o último levado somente até 3 horas de experimento. As curvas relacionando atividade residual como porcentagem da atividade inicial ao tempo foram construídas no software Origin 8.5, utilizando um modelo de

desativação enzimática previamente descrito por Sadana e Henley (1987) para determinar os parâmetros de desativação dos biocatalisadores, segundo a equação de desativação (3):

$$Y = 100 \cdot ((1 - \alpha) \cdot e^{(-K_d \cdot t)} + \alpha) \quad (3)$$

Onde  $K_d$  (constante de desativação térmica) e  $\alpha$  (fração da enzima que perde atividade) são parâmetros gerados pelo software, e as variáveis dependente e independente são a atividade relativa (Y) e o tempo (t), respectivamente. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi calculado utilizando os parâmetros obtidos pelo software, através da equação (4):

$$t_{1/2} = \frac{-\ln\left(\frac{0,5-\alpha}{1-\alpha}\right)}{K_d} \quad (4)$$

#### 4.8 Ensaio de estabilidade operacional e à estocagem

A estabilidade operacional dos biocatalisadores mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX foi avaliada através de 10 ciclos de hidrólise de lactose, cada um com duração de 1 hora. A cada ciclo, foram utilizados 5 mL de lactose 164 mM, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com cofator  $MnCl_2$  0,1 mM, em reator mantido a 37 °C. A massa inicial de mCLEA utilizada para cada amostra foi de 0,53 g, e a cada ciclo ela foi separada da solução hidrolisada com o auxílio de super ímã. A conversão ao final de cada ciclo foi medida com o Kit de Glicose Bioclin®, e calculada em porcentagem relativa à conversão no primeiro ciclo. A enzima livre, mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX foram também avaliados quanto à estabilidade à estocagem, preparando-se suspensões de 0,1 g de imobilizado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, e solução de 1 mL de enzima livre dialisada, em mesmo tampão adicionado de cofator. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C, com a retirada de pontos para medida de atividade com oNPG após 0, 2, 6 e 10 semanas de armazenamento. A atividade residual foi calculada em porcentagem relativa à atividade presente na semana 0.

#### 4.9 Aplicação para produção de D-tagatose

A produção de D-tagatose a partir de lactose foi avaliada, utilizando CLEAs magnéticos de  $\beta$ -galactosidase e de L-arabinose isomerase de forma sequencial, com os mCLEAs em reatores separados, e de forma simultânea com as enzimas livres em um mesmo reator. De forma sequencial, iniciou-se com a adição de 0,3 g de mCLEA-DEX (Atividade = 7,572 U/g)

em 5 mL de solução de lactose 164 mM, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $\text{MnCl}_2$  1 mM. A mistura foi mantida a 37 °C no biorreator 1, durante 24 horas, período após o qual foi medida a concentração de glicose com o Kit de Glicose Bioclin®. Com o auxílio de super ímã, a solução foi separada do mCLEA, e transferida para o biorreator 2, onde foi adicionado 0,8 g de mCLEA-LAI (Atividade = 0,372 U/g). A mistura foi mantida a 50 °C, durante 24 horas, com retirada de amostras para medida de concentração de D-tagatose pelo método colorimétrico ácido sulfúrico-cisteína-carbazol a cada duas horas nas seis primeiras horas e ao final do processo. A produtividade foi expressa em termos de porcentagem, relacionando a concentração de D-tagatose com a concentração inicial de galactose ao final da operação do biorreator 1. Ao final das duas operações, a atividade dos biocatalisadores foi medida para fins comparativos à estabilidade operacional. Para o experimento com uso simultâneo das enzimas livres, foi preparada uma solução de lactose 450 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $\text{MnCl}_2$  1 mM, e mantida em biorreator ao qual foram adicionados 0,0063 g de  $\beta$ -galactosidase livre (atividade equivalente à presente em 0,3 g de mCLEA-DEX) e 0,3 mL de L-arabinose isomerase livre (atividade equivalente à presente em 0,8 g de mCLEA-LAI). O biorreator foi mantido a 50 °C durante 24 horas, com retirada de amostras para medida da concentração de glicose e de D-tagatose a cada duas horas nas seis primeiras horas e ao final do processo. Ao final, a produtividade foi expressa em termos de porcentagem da concentração de galactose e de D-tagatose em relação à concentração inicial de lactose disponível. O teste simultâneo com as enzimas livres dispensou a necessidade da realização de teste simultâneo com os mCLEAs.

#### **4.10 Testes estatísticos**

O software Origin 8.5 foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com os valores de atividade dos biocatalisadores de  $\beta$ -galactosidase imobilizados com glutaraldeído, sem modificações posteriores, a fim de determinar a presença ou ausência de diferenças significativas entre os resultados. O nível de confiança utilizado para o teste foi de 95%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Parâmetros de imobilização dos mCLEAs de $\beta$ -galactosidase

A produção dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase seguiu uma lógica de estudos gradativa, garantindo a comparação dos biocatalisadores em grupos de condições semelhantes. Os parâmetros de imobilização para todos os mCLEAs produzidos no presente estudo estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização e atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada por mCLEAs

Amostra	Taxa de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)
mCLEA-GLU-0.6	100	1,307 $\pm$ 0,47	11,961
mCLEA-GLU-1	100	2,306 $\pm$ 0,40	21,110
mCLEA-GLU-1.5	100	3,531 $\pm$ 0,36	32,328
mCLEA-PEI	100	0,736 $\pm$ 0,75	6,737
mCLEA-DEX	99,7	8,024 $\pm$ 3,79	73,661

Fonte: elaborado pelo autor. A atividade presente em cada imobilizado está exposta com seu valor calculado de desvio padrão. A atividade recuperada é uma razão entre a atividade do imobilizado e a atividade teórica, esta definida com base na atividade de enzima oferecida e na atividade obtida no sobrenadante. mCLEA-GLU-0.6 foi produzida com uma concentração de 0,625% de glutaraldeído, mCLEA-GLU-1 foi produzida com 1% e mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-GLU-PEI com 1,5%. A amostra mCLEA-DEX foi produzida com dextrana-aldeído.

### 5.2 mCLEAs de $\beta$ -galactosidase em diferentes concentrações de glutaraldeído

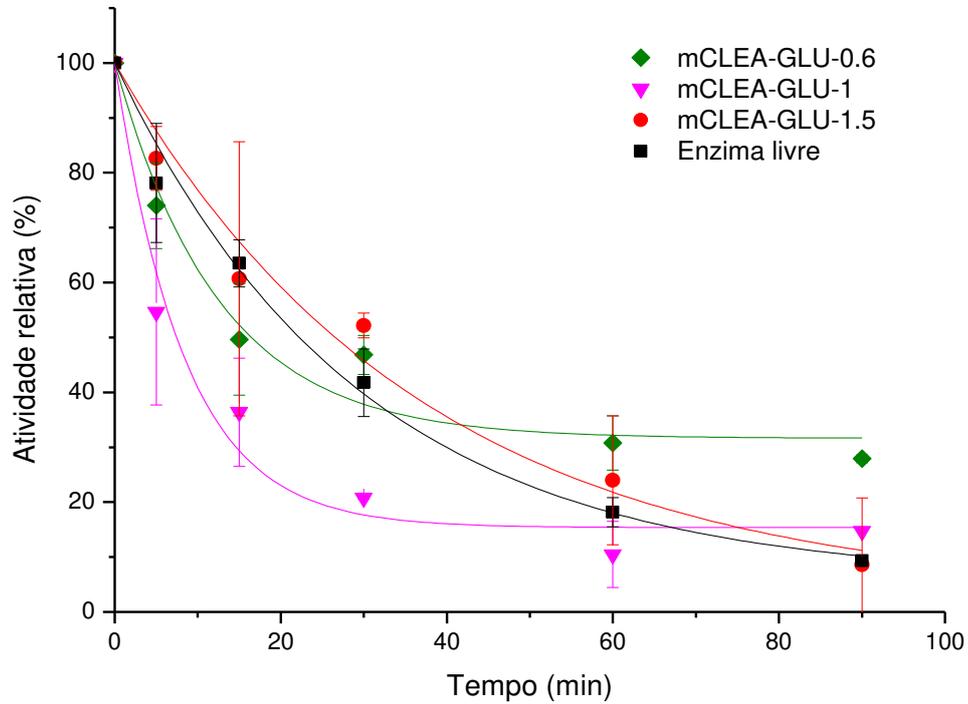
Realizou-se a investigação de diferentes concentrações de glutaraldeído, objetivando evidenciar a concentração mais eficiente para a reticulação dos agregados, considerando recuperação de atividade no mCLEA e estabilidade térmica a 60 °C. Deve-se notar que a concentração de enzima em solução foi a mesma para todas as imobilizações (10 mg·mL<sup>-1</sup>), com uma atividade de 10,93 U no volume inicial utilizado para a imobilização. Como mostrado na Tabela 1, constatou-se que a taxa de reticulação da enzima foi de 100% para todos os mCLEAs, em qualquer concentração de glutaraldeído investigada, evidenciado pela ausência de atividade no sobrenadante pós-reticulação, o que corresponde a um excelente rendimento de imobilização. Dessa forma, a atividade teórica para cada mCLEA produzido com glutaraldeído

foi igual a atividade de  $\beta$ -galactosidase no volume inicial, 10,93 U. Embora a taxa de reticulação não tenha sido afetada pela concentração de glutaraldeído, há uma aparente diferença na atividade recuperada de cada imobilizado.

De acordo com o teste de Tukey, a um nível de confiança de 95%, foi constatado que as amostras produzidas com glutaraldeído, sem modificações posteriores, não se diferenciaram entre si, mas ainda sendo estatisticamente iguais, há uma tendência ao crescimento da atividade do biocatalisador com o aumento da concentração do reticulante, sendo a amostra mCLEA-GLU-1.5 a de maior atividade recuperada. O trabalho de Ulrich *et al.* (2017) apresentou um rendimento de atividade inferior aos obtidos no presente trabalho, apenas 3,1% utilizando os mesmos agentes precipitante e reticulante, ou seja, sulfato de amônio e glutaraldeído. Porém, essa diferença se deve provavelmente ao maior nível de saturação de sulfato de amônio utilizado no presente estudo, que promoveu precipitação total das enzimas, disponibilizando mais pontos de ligação para a reação do glutaraldeído.

As amostras foram também avaliadas quanto à estabilidade térmica a 60 °C frente à enzima livre, a fim de obter uma relação entre a concentração de glutaraldeído e a capacidade de estabilização da enzima em um meio desfavorável. Os perfis de decaimento térmico estão mostrados na Figura 4 e os parâmetros de desativação estão na Tabela 2.

Figura 4 – Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C dos mCLEAs produzidos em diferentes concentrações de glutaraldeído e da enzima livre, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos. O experimento ocorreu em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $\text{MnCl}_2$  0,1 mM como cofator.

Tabela 2 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído

Amostra	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)	FE	$\alpha$	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>mCLEA-GLU-0.6</b>	0,99	16,46	0,74	0,32	0,08
<b>mCLEA-GLU-1</b>	0,97	7,45	0,33	0,12	0,15
<b>mCLEA-GLU-1.5</b>	0,96	26,57	1,19	0,03	0,03
<b>Enzima livre</b>	0,97	22,24	-	0,06	0,03

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica dos CLEAs magnéticos de  $\beta$ -galactosidase produzidos com diferentes concentrações de glutaraldeído e da enzima livre. As condições empregadas para desativação foram tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $\text{MnCl}_2$  0,1 mM, a 60 °C.  $R^2$  é o fator de correlação;  $t_{1/2}$  é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre  $t_{1/2}$  do imobilizado e  $t_{1/2}$  da enzima livre;  $\alpha$  representa a fração do biocatalisador que perde atividade;  $K_d$  é a constante de desativação térmica.

As amostras apresentaram perfis de decaimento térmico bem semelhantes entre si, mas a amostra produzida com concentração intermediária de glutaraldeído, mCLEA-GLU-1, se destacou negativamente como a menos estável. A mais consistente das amostras foi mCLEA-GLU-1.5, que apresentou o maior tempo de meia-vida, de 26,57 min, e a menor constante de desativação térmica, sendo mais estável que a enzima livre, como detalhado nos parâmetros de desativação.

Em seu trabalho, ainda que a uma diferente temperatura (40 °C) Li *et al.* (2015) também verificaram a superioridade em estabilidade térmica do imobilizado de  $\beta$ -galactosidase produzido com glutaraldeído em relação à enzima livre, bem como a amostra mCLEA-GLU-1.5 no presente trabalho. Este aumento na performance de estabilidade térmica do imobilizado frente à enzima livre é um indicativo de que a reticulação auxiliou na manutenção da conformação molecular das enzimas quando submetidas a uma temperatura acima da temperatura ótima de atividade. O destaque de mCLEA-GLU-1.5 (32% de atividade recuperada e fator de estabilidade de 1,19) se deve provavelmente ao maior número de ligações entrecruzadas, promovidas pela concentração maior de glutaraldeído, ou seja, com mais pontos de apoio para manter a atividade e resistir à desativação. Portanto, a concentração de 1,5% foi selecionada como ideal para produção dos mCLEAs com glutaraldeído, e mCLEA-GLU-1.5 foi utilizado nos experimentos seguintes.

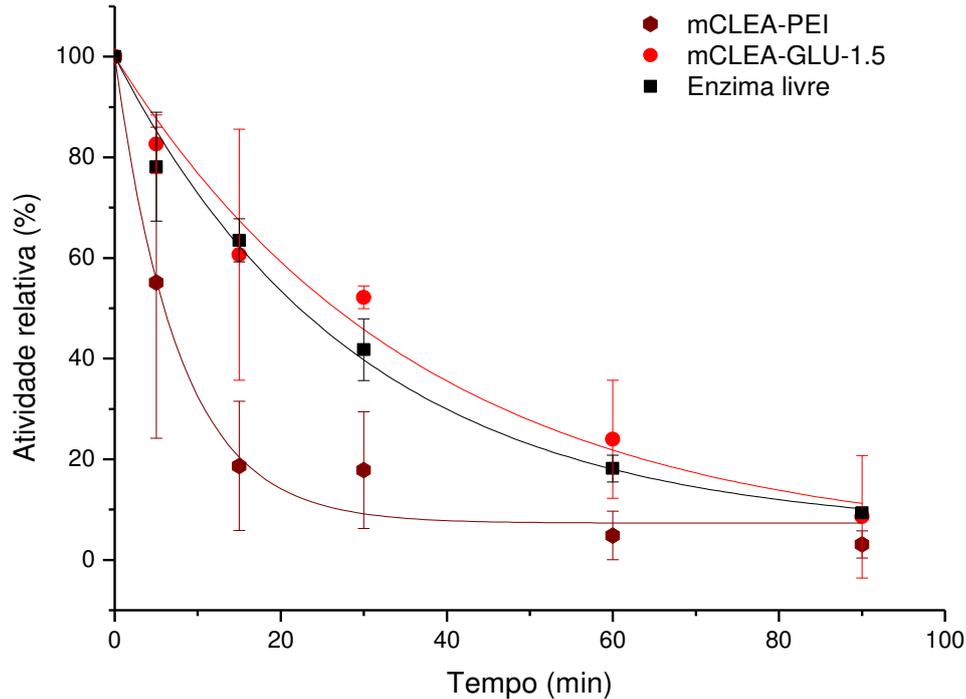
### **5.3 Efeitos do recobrimento do mCLEA produzido com glutaraldeído**

Investigou-se os efeitos do recobrimento do biocatalisador mCLEA-GLU-1.5 com polietilenoimina (PEI), gerando a amostra mCLEA-PEI. Como pode ser observado na Tabela 1, a adição de PEI à metodologia de produção do mCLEA de  $\beta$ -galactosidase resultou em uma perda de atividade em relação ao imobilizado sem modificação, mCLEA-GLU-1.5. A atividade após o recobrimento foi reduzida em cerca de quatro vezes, resultado provavelmente de problemas de difusão causadas pelas cadeias intensamente ramificadas do PEI.

A PEI é um polímero ramificado com múltiplos grupos amina, muito utilizado na imobilização de enzimas para incrementar o número de ligações covalentes ou para estabilizar os imobilizados. Como a estabilidade térmica do mCLEA-GLU-1.5 foi apenas um pouco superior à da enzima livre, a PEI foi utilizada a fim de promover um incremento no seu tempo de meia-vida. O recobrimento deveria promover uma proteção das moléculas de enzima à desativação por compactá-las, impedindo mudanças drásticas em sua conformação. No entanto, o efeito do recobrimento na estabilidade térmica a 60 °C também foi diferente do esperado.

Observa-se nos perfis de decaimento térmico na Figura 5, bem como nos parâmetros de desativação na Tabela 3, que mCLEA-PEI teve um desempenho drasticamente inferior a mCLEA-GLU-1.5, tornando a enzima mais suscetível à ação da temperatura.

Figura 5 – Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído 1,5%



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C da  $\beta$ -galactosidase livre e dos imobilizados produzidos com glutaraldeído 1,5%, incluindo o imobilizado recoberto com PEI, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos. O experimento ocorreu em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM.

Tabela 3 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com glutaraldeído 1,5%

Amostra	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)	FE	$\alpha$	$K_d$ ( $min^{-1}$ )
<b>mCLEA-PEI</b>	0,98	5,95	0,27	0,07	0,13
<b>mCLEA-GLU-1.5</b>	0,96	26,57	1,19	0,03	0,03
<b>Enzima livre</b>	0,97	22,24	-	0,06	0,03

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica dos CLEAs magnéticos de  $\beta$ -galactosidase produzidos com glutaraldeído 1,5% e da enzima livre. As condições empregadas para desativação foram tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, a 60 °C.  $R^2$  é o fator de correlação;  $t_{1/2}$  é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre  $t_{1/2}$  do imobilizado e

$t_{1/2}$  da enzima livre;  $\alpha$  representa a fração do biocatalisador que perde atividade;  $K_d$  é a constante de desativação térmica.

Ainda com a baixa performance apresentada pelo mCLEA-PEI na atividade recuperada medida com o substrato oNPG, o biocatalisador foi avaliado na hidrólise de lactose, para estudar sua performance frente ao substrato natural da enzima.

#### 5.4 Produção de mCLEA de $\beta$ -galactosidase com dextrana-aldeído

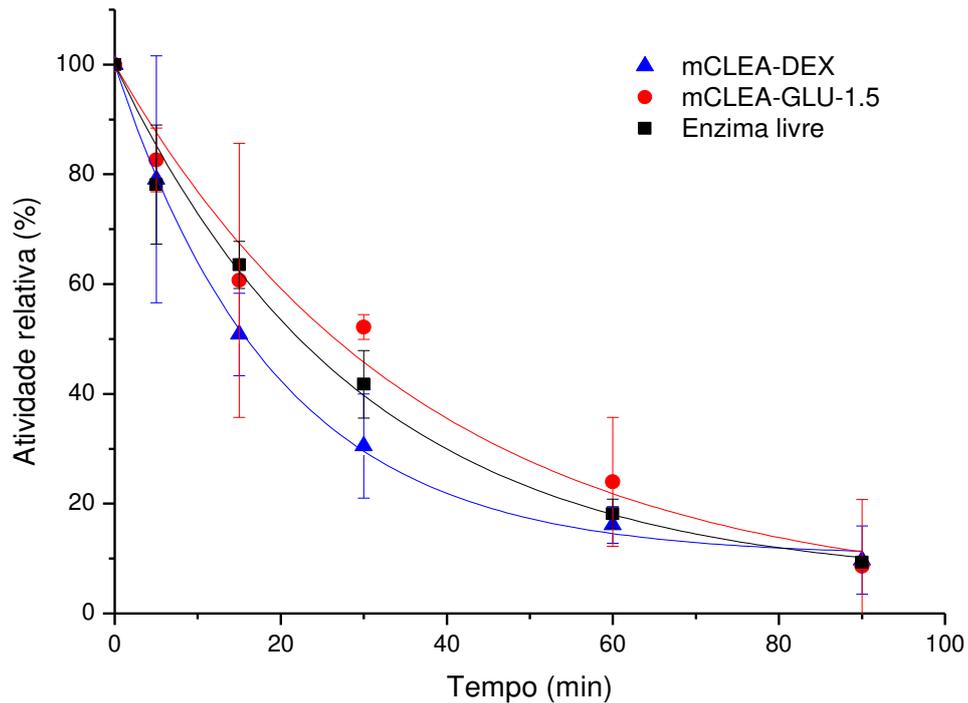
Uma alternativa investigada com a finalidade de aumentar a recuperação de atividade nos mCLEAs e melhorar sua estabilidade térmica foi a utilização da dextrana-aldeído como agente reticulante para os agregados de  $\beta$ -galactosidase. Como mostrado na Tabela 1, o imobilizado produzido com esse reticulante, mCLEA-DEX, alcançou uma taxa de imobilização de 99,7% (atividade teórica = 10,89 U), por apresentar um pouco de atividade no sobrenadante da mistura pós-reticulação, e sua atividade recuperada chegou ao valor de 8,024 U, representando 73,6% da atividade teórica e sendo o biocatalisador com maior atividade recuperada no presente trabalho, cerca de três vezes mais ativo que mCLEA-GLU-1.5.

Como mostrado no trabalho de Talekar *et al.* (2013), a flexibilidade conformacional da enzima diminui com a formação de ligações covalentes entre o glutaraldeído e resíduos básicos da enzima, o que também provoca alterações em volta do sítio ativo. Dessa forma, a razão mais provável para a diferença de recuperação de atividade observada no presente trabalho é que a ação do glutaraldeído promoveu a formação de ligações covalentes em resíduos de lisina críticos para a conformação espacial correta do sítio ativo das moléculas de  $\beta$ -galactosidase, inviabilizando a ação enzimática de grande parte destas (BARBOSA *et al.*, 2014). Apesar de não haver resíduos de lisina diretamente envolvidos no mecanismo de catálise da  $\beta$ -galactosidase, há alguns resíduos próximos do sítio ativo que podem influenciar a conformação espacial da molécula (Figura 1). Mateo *et al.* (2004) também avaliaram a eficácia de reticulantes de acordo com suas proporções moleculares, atestando que a dextrana-aldeído, por possuir grandes dimensões, não consegue reagir com resíduos do sítio ativo das enzimas, resultando em altos rendimentos de imobilização, o que se acredita ser o motivo para a alta recuperação de atividade para o mCLEA de  $\beta$ -galactosidase imobilizado com dextrana-aldeído no presente trabalho.

Diferente do observado quanto à recuperação de atividade, mCLEA-DEX apresentou um desempenho inferior na estabilidade térmica a 60 °C, com um perfil de decaimento

ligeiramente mais acentuado que ambos mCLEA-GLU-1.5 e enzima livre, como é mostrado na Figura 6. Ainda assim, com base no tempo de meia-vida e constante de desativação térmica, mostrados na Tabela 4, essa acentuação na desativação não é suficiente para descartar a viabilidade deste biocatalisador.

Figura 6 – Desativação térmica dos mCLEAs produzidos com diferentes reticulantes



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C dos imobilizados produzidos com dextrana-aldeído e com glutaraldeído e da enzima livre, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos. O experimento ocorreu em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM.

Tabela 4 – Parâmetros de desativação térmica dos mCLEAs produzidos com diferentes reticulantes

Amostra	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (min)	FE	$\alpha$	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )
<b>mCLEA-DEX</b>	0,99	15,87	0,71	0,10	0,05
<b>mCLEA-GLU-1.5</b>	0,96	26,57	1,19	0,03	0,03
<b>Enzima livre</b>	0,97	22,24	-	0,06	0,03

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica dos CLEAs magnéticos de  $\beta$ -galactosidase produzidos com glutaraldeído 1,5% e com dextrana-aldeído e da enzima livre. As condições empregadas para desativação foram tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, a

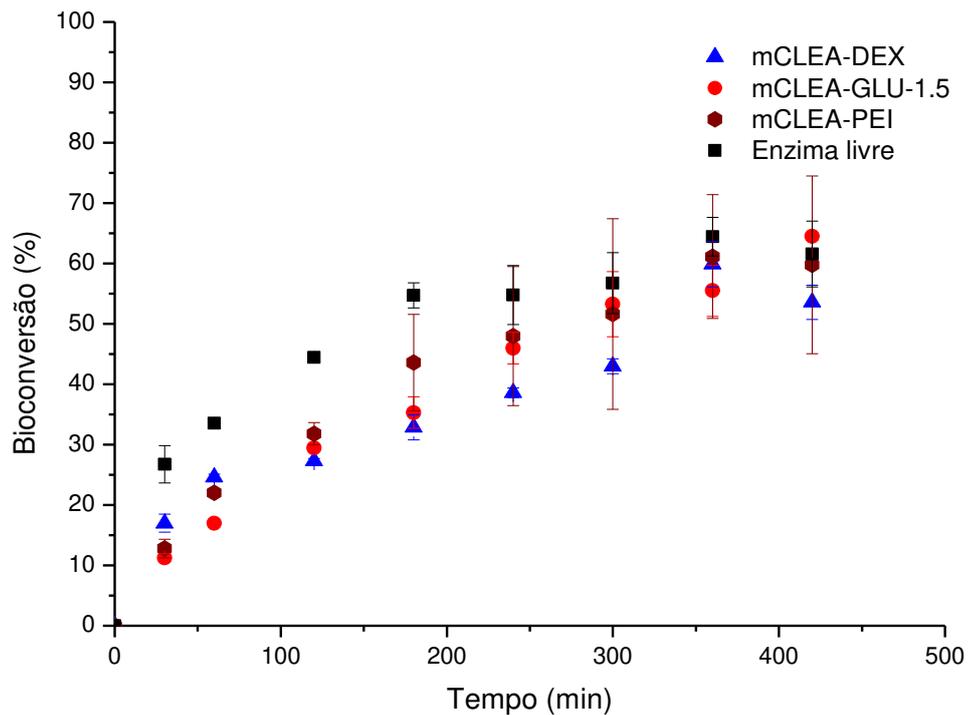
60 °C.  $R^2$  é o fator de correlação;  $t_{1/2}$  é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre  $t_{1/2}$  do imobilizado e  $t_{1/2}$  da enzima livre;  $\alpha$  representa a fração do biocatalisador que perde atividade;  $K_d$  é a constante de desativação térmica.

Considerando as vantagens dos melhores imobilizados produzidos, o destaque do mCLEA-DEX na recuperação de atividade e o do mCLEA-GLU-1.5 na estabilidade térmica a 60 °C, esses biocatalisadores, junto ao mCLEA-PEI foram selecionados para a aplicação no ensaio de hidrólise de lactose em biorreator.

### 5.5 Bioconversão de lactose em glicose e galactose

Como os ensaios de atividade primários realizados com os imobilizados e com a enzima livre utilizam um substrato artificial, o oNPG, faz-se necessária a experimentação da atividade desses biocatalisadores frente ao substrato natural da enzima, a lactose. Para esses ensaios, foi investigada a capacidade de hidrólise da enzima livre, do mCLEA-PEI e dos melhores imobilizados, mCLEA-DEX e mCLEA-GLU-1.5, e os perfis de hidrólise estão evidenciados na Figura 7.

Figura 7 – Hidrólise de lactose pelos mCLEAs e  $\beta$ -galactosidase livre



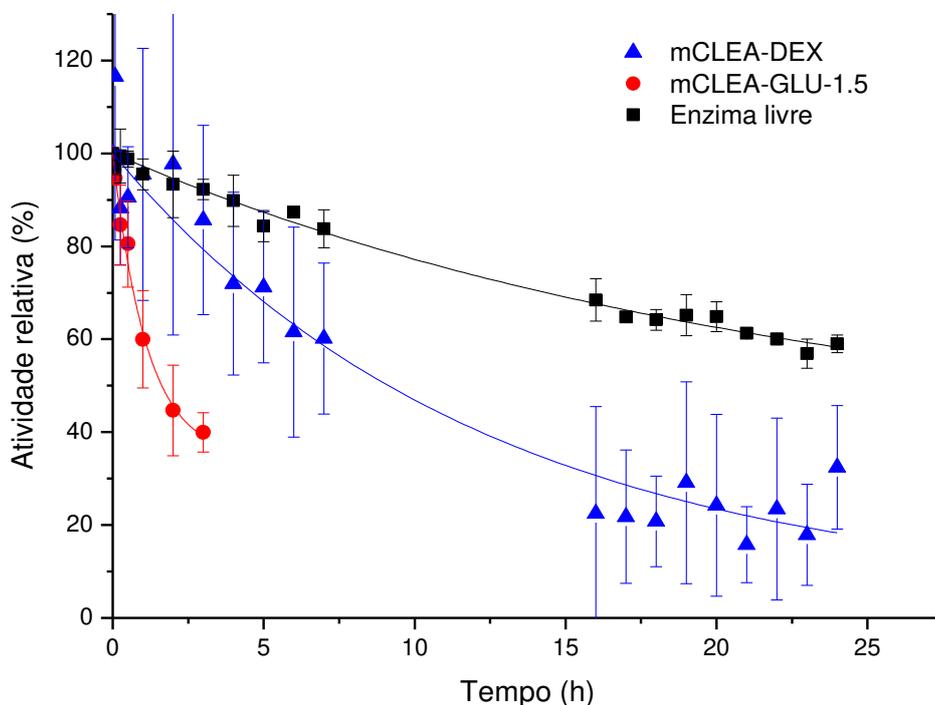
Fonte: elaborado pelo autor. Síntese enzimática de D-galactose e D-glicose catalisada por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada por mCLEAs e livre. As reações ocorreram em solução de lactose 164 mM, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $\text{MnCl}_2$  0,1 mM, a 37 °C. A conversão do substrato em produto está representada como porcentagem da concentração de lactose inicial em função do tempo de reação em minutos. As reações ocorreram em volume final de 5 mL. Os desvios padrões calculados estão mostrados como barras de erro.

A solução de lactose utilizada foi preparada na concentração de 164 mM, sendo esta baseada no soro de leite com alta concentração de lactose (OLIVEIRA, 2019). É perceptível, nas 7 primeiras horas de análise, que a hidrólise de lactose ocorre em velocidade semelhante para os três mCLEAs, sem diferenças significativas entre eles, e um pouco abaixo da velocidade da enzima livre nas quatro primeiras horas.

A maior velocidade ( $0,551 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de hidrólise da enzima livre nas horas iniciais pode estar relacionada a dificuldades de difusão que a enzima solubilizada não apresenta. Como nos imobilizados há moléculas de enzima mais próximas da superfície dos agregados e outras mais afastadas da superfície, o substrato pode enfrentar dificuldades para alcançar as enzimas mais interiores, causando um atraso inicial que é recuperado apenas após algumas horas de experimento, demonstrado em uma velocidade inicial inferior para as amostras:  $0,430 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  para o mCLEA-DEX,  $0,434 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  para o mCLEA-GLU-1.5 e  $0,421 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  para o mCLEA-PEI. O comportamento do mCLEA-PEI mostra que o recobrimento não afetou sua capacidade de hidrolisar o substrato natural da enzima, mas como há uma etapa adicional na sua produção e o biocatalisador é menos estável, decidiu-se descartá-lo como opção viável para os ensaios seguintes, prosseguindo apenas com os melhores biocatalisadores em atividade recuperada e estabilidade térmica, mCLEA-DEX e mCLEA-GLU-1.5.

## 5.6 Estabilidade térmica dos biocatalisadores a 50 °C

O presente trabalho, tendo como principal objetivo a imobilização de  $\beta$ -galactosidase para a atuação em reação de cascata com a L-arabinose isomerase, deve estar direcionado a parâmetros que viabilizem essa utilização conjunta. A LAI é a enzima que atua na etapa limitante da cascata, logo, para maximizar sua atividade, ela deve atuar nas suas condições ótimas, o que inclui a temperatura de 50 °C (SOUSA *et al.*, 2020). Dessa forma, para atestar a viabilidade de utilização da  $\beta$ -galactosidase imobilizada em mCLEAs no mesmo sistema de reação que os mCLEAs de LAI, é necessário avaliar a sua estabilidade térmica a 50 °C. Os perfis de decaimento térmico da enzima livre e dos mCLEAs estão mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Decaimento térmico a 50 °C dos mCLEAs e da  $\beta$ -galactosidase livre

Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 50 °C de mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase produzidos com glutaraldeído 1,5% e com dextrana-aldeído e da enzima livre dialisada, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em horas. Os experimentos ocorreram em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM.

Tabela 5 – Parâmetros de desativação térmica a 50 °C dos mCLEAs e enzima livre

Amostra	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)	FE	$\alpha$	$K_d$ ( $min^{-1}$ )
<b>mCLEA-DEX</b>	0,95	9,13	0,26	0,05	0,08
<b>mCLEA-GLU-1.5</b>	0,99	1,63	0,05	0,35	0,88
<b>Enzima livre</b>	0,99	34,67	-	0,36	0,04

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica a 50 °C dos CLEAs magnéticos de  $\beta$ -galactosidase produzidos com glutaraldeído 1,5% e com dextrana-aldeído e da enzima livre. As condições empregadas para desativação foram tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, a 50 °C.  $R^2$  é o fator de correlação;  $t_{1/2}$  é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre  $t_{1/2}$  do imobilizado e  $t_{1/2}$  da enzima livre;  $\alpha$  representa a fração do biocatalisador que perde atividade;  $K_d$  é a constante de desativação térmica.

Percebe-se uma diferença gradual entre os perfis da enzima livre, do mCLEA-DEX e do mCLEA-GLU-1.5, com uma redução do tempo de meia-vida na ordem apresentada, como

mostrado na Tabela 5. Por ter apresentado redução de 50% na atividade antes de 3 horas de análise, as análises com a amostra mCLEA-GLU-1.5 foram interrompidas neste ponto, enquanto as análises com a enzima livre e com mCLEA-DEX prosseguiram durante 24 horas.

Esses ensaios mostram um comportamento dos mCLEAs diferente em relação ao observado à temperatura de 60 °C, indicando que em condições ligeiramente mais brandas, a amostra produzida com dextrana-aldeído é capaz de garantir uma maior estabilidade térmica às moléculas de enzimas do que a amostra produzida com glutaraldeído. Comportamentos similares de inversão de comportamento dos imobilizados foram apresentados por Gaur *et al.* (2006), comparando-se diferentes metodologias de imobilização de  $\beta$ -galactosidase, onde em apenas uma das três temperaturas estudadas, a imobilização por CLEAs apresentou melhor estabilidade térmica que a imobilização em suporte de quitosana.

É válido ressaltar que, no presente experimento, os mCLEAs não estavam na presença de seu substrato natural, a lactose, o que retira da análise o fator de proteção da conformação enzimática pelo substrato. Como mCLEA-DEX apresentou uma maior estabilidade térmica nessa temperatura que o mCLEA-GLU-1.5, essa amostra foi escolhida para utilização nos ensaios de aplicação conjunta dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase e de LAI.

### 5.7 Avaliação dos modelos cinéticos utilizando lactose como substrato

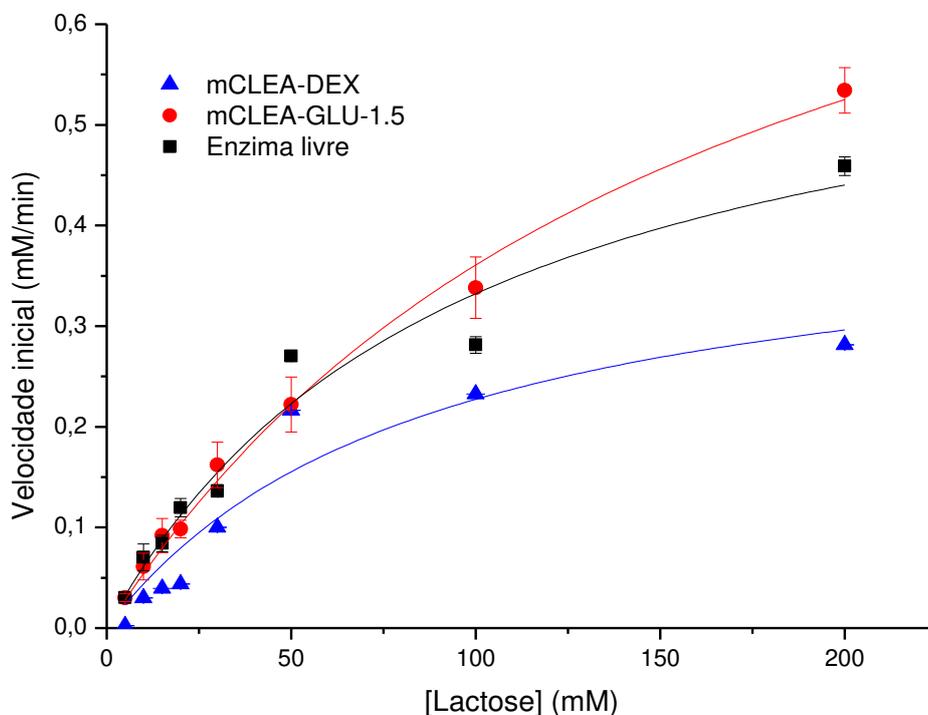
Obteve-se a velocidade inicial em cada concentração de substrato para a enzima livre e para as amostras mCLEA-DEX e mCLEA-GLU-1.5, através da aferição da quantidade de glicose produzida pela hidrólise de lactose catalisada pela enzima. Os parâmetros cinéticos obtidos estão mostrados na Tabela 6, e as curvas relacionando velocidade inicial à concentração de substrato estão mostradas na Figura 9.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da  $\beta$ -galactosidase imobilizada e livre

Amostra	R <sup>2</sup>	K <sub>M</sub> (mM)	V <sub>MAX</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )
<b>mCLEA-DEX</b>	0,91	86,783 ± 22,32	0,425 ± 0,05
<b>mCLEA-GLU-1.5</b>	0,99	167,425 ± 18,09	0,965 ± 0,06
<b>Enzima livre</b>	0,95	96,390 ± 18,41	0,653 ± 0,06

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo cinético de Michaelis-Menten para os biocatalisadores imobilizados produzidos com glutaraldeído 1,5% e com dextrana-aldeído, e para a enzima livre. As reações foram conduzidas em soluções de lactose preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com cofator MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM. R<sup>2</sup> é o fator de correlação; K<sub>M</sub> é a constante de Michaelis-Menten; V<sub>MAX</sub> é a velocidade máxima.

Figura 9 – Cinética da reação de hidrólise de lactose usando os mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase e a enzima livre



Fonte: elaborado pelo autor. Influência da concentração de lactose na taxa inicial da reação de hidrólise catalisada por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre e imobilizada por mCLEAs. As reações ocorreram em soluções de lactose preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, a 37 °C.

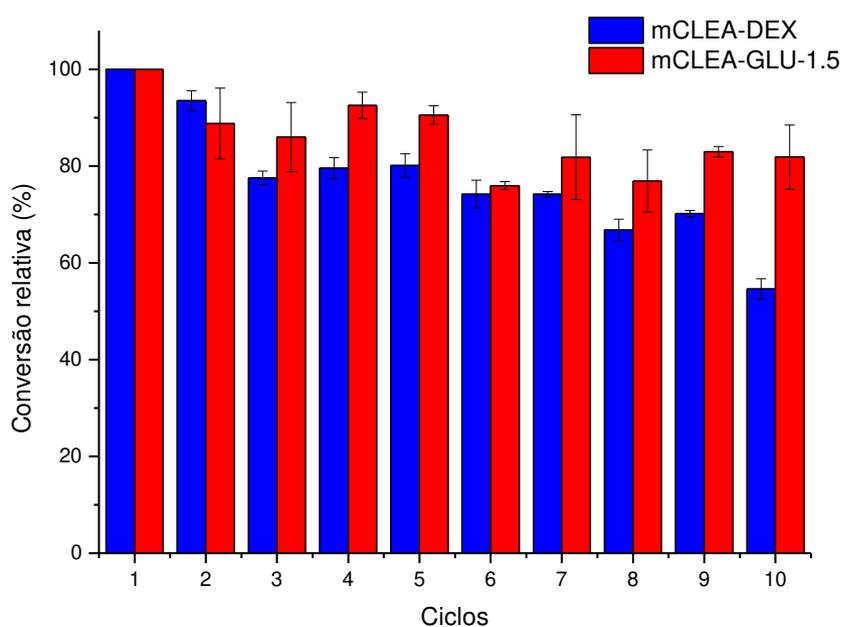
A obtenção dos parâmetros cinéticos dos biocatalisadores imobilizados e da enzima livre permitiram, além da obtenção de informações importantes acerca da taxa de reação enzimática, a avaliação da afinidade das enzimas pelo substrato, e como a imobilização com cada agente reticulante influenciou esse parâmetro. A princípio, os modelos cinéticos mostram que a enzima, tanto livre quanto imobilizada, segue uma cinética de Michaelis-Menten. Não houve uma diferença significativa entre o  $K_M$  do mCLEA-DEX e da enzima livre, porém a velocidade máxima do mCLEA-DEX foi um pouco inferior. Já para o mCLEA-GLU-1.5, o valor de  $K_M$  foi consideravelmente maior que o da enzima livre, implicando que a imobilização com glutaraldeído provocou uma redução de afinidade da enzima pelo seu substrato natural. Essa aparente redução de afinidade pode ter decorrido da dificuldade do substrato de acessar o sítio ativo das enzimas, pelo reduzido tamanho do glutaraldeído e, conseqüentemente, menores espaços entre enzimas adjacentes, o que também explicaria a menor atividade recuperada em

relação ao mCLEA-DEX. Esse menor valor também pode decorrer de alterações conformacionais ocasionadas pela ligação do reticulante com resíduos de lisina próximos ao sítio ativo. Essa mudança cinética, representada pelo aumento do valor do  $K_M$ , entre enzima livre e imobilizada também foi reportada por Li *et al.* (2015) e Gaur *et al.* (2006), que trabalharam com a imobilização em CLEA, com a utilização de glutaraldeído, de uma  $\beta$ -galactosidase obtida de biblioteca metagenômica e de *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

### 5.8 Reutilização e armazenamento dos biocatalisadores

A fim de investigar a estabilidade operacional dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase, repetidos ciclos de hidrólise de lactose foram conduzidos em reator usando 0,5 g de biocatalisador em 5 mL do meio reacional contendo 164 mM de lactose. A partir do 3º ciclo de operação, os biocatalisadores passaram a exibir diferenças significativas em suas atividades relativas, como pode ser visualizado na Figura 10, culminando na diferença observada ao final do 10º ciclo.

Figura 10 – Estabilidade operacional dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase



Fonte: elaborado pelo autor. Estabilidade operacional de mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, ao longo de 10 ciclos de 60 minutos de duração cada. As bateladas de hidrólise subsequentes

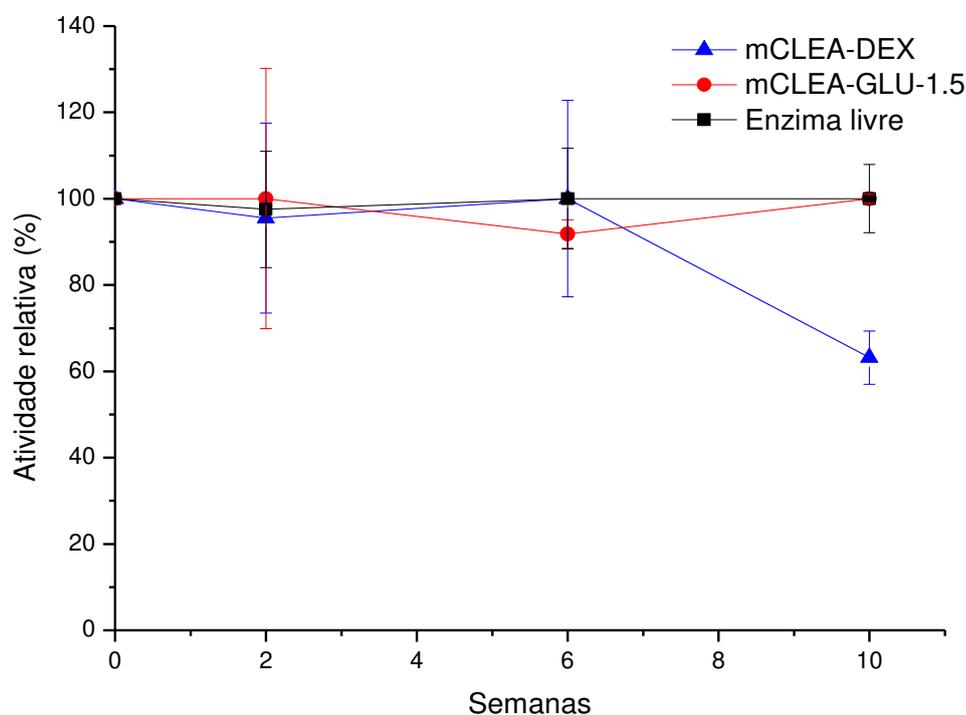
foram realizadas em solução de lactose 164 mM preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM ,pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, a 37 °C.

O mCLEA-DEX teve sua atividade reduzida a aproximadamente 60% da atividade inicial, mantendo-se com uma significativa estabilidade operacional. Já o mCLEA-GLU-1.5 manteve sua atividade relativa em aproximadamente 80% de sua atividade inicial, também indicando uma adequabilidade deste biocatalisador à reutilização. Resultados similares a esse foram obtidos no trabalho de Li *et al.* (2015), que também chegaram a uma atividade relativa próxima de 80% ao final de 10 ciclos de operação.

Ao final de cada ciclo, o mCLEA foi separado da solução contendo substrato e produto através da utilização de um super-ímã, permitindo a troca da solução por uma nova. O mesmo não pode ser realizado com a enzima livre, pois esta se encontra solúvel junto aos sacarídeos, o que acarretaria a perda do biocatalisador logo após o primeiro ciclo. Logo, a capacidade de reciclagem de ambos os sistemas imobilizados de  $\beta$ -galactosidase sugere que há alto potencial para a produção econômica quanto à hidrólise em glicose e galactose.

Outro parâmetro importante para a reutilização dos biocatalisadores imobilizados é sua capacidade de manter a estabilidade durante períodos de estocagem, quando não estão sendo utilizados constantemente. Para avaliá-lo, as amostras de mCLEA e a enzima livre, para efeito comparativo, foram armazenados em geladeira (4 °C) durante dez semanas. Durante as seis primeiras semanas de estocagem, todos os biocatalisadores mantiveram-se estáveis, próximos a 100% de atividade relativa à inicial, sem diferenças significativas entre eles, como é visto na Figura 11. Após o final das dez semanas, mCLEA-GLU-1.5 apresentou 100% de retenção de atividade, logo, completa estabilidade, semelhante ao comportamento da enzima livre. Já a amostra mCLEA-DEX, mostrou ao final desse período uma redução de atividade, restando 63% de sua atividade inicial. Como não houve avaliação da progressão entre a sexta e décima semana, considera-se o mCLEA-DEX estável até a sexta semana. Essa perda de atividade durante o armazenamento a 4 °C foi previamente relatada no trabalho de Shafi *et al.* (2021), onde a  $\beta$ -galactosidase imobilizada em nanosporte à base de prata reteve 85% de sua atividade inicial ao final de 60 dias. Dessa forma, sendo utilizados em processos industriais, o mais recomendado é que imobilizados de  $\beta$ -galactosidase imobilizados com glutaraldeído sejam utilizados em até dez semanas de armazenamento após produção, enquanto imobilizados produzidos com dextrana-aldeído sejam utilizados em até seis semanas de armazenamento.

Figura 11 – Estabilidade dos biocatalisadores à estocagem a 4 °C



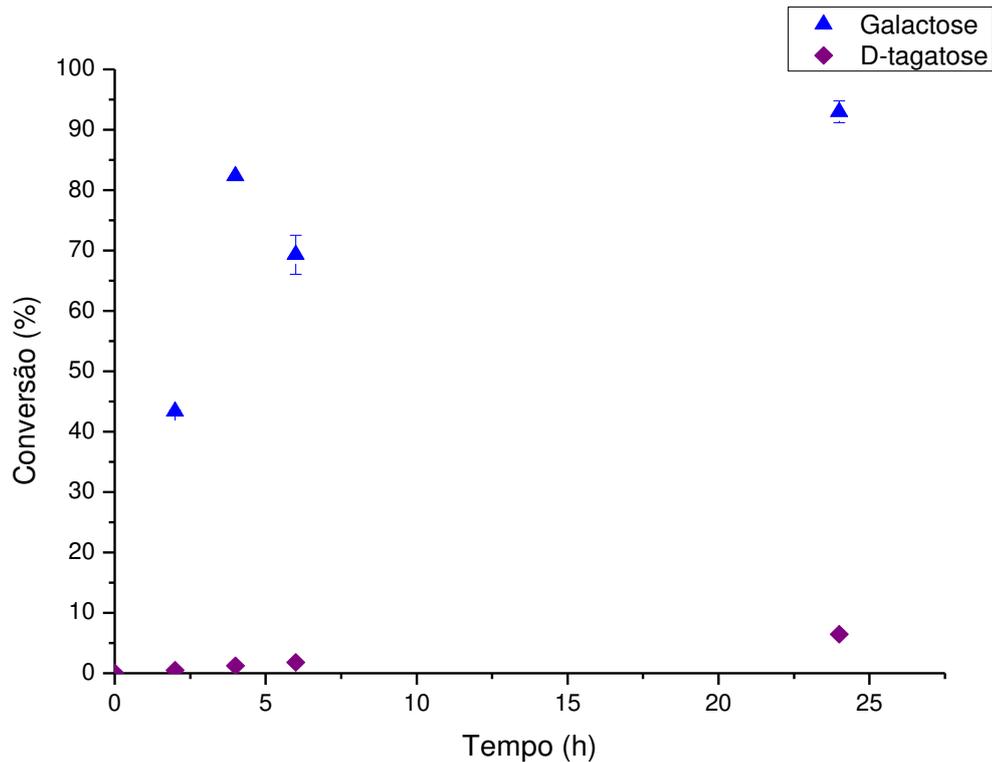
Fonte: elaborado pelo autor. Estabilidade à estocagem da enzima livre, do mCLEA-GLU-1.5 e do mCLEA-DEX de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, durante 10 semanas. Condições de análise: 0,1 g de mCLEA em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6, com  $MnCl_2$  0,1 mM, a 4 °C. A atividade foi obtida pelo método de absorbância a 420 nm após reação com oNPG.

### 5.9 Aplicação de mCLEAs de $\beta$ -galactosidase e de L-arabinose isomerase

A aplicação dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase e de LAI simultaneamente não foi estudada de imediato, sendo realizado primeiramente um teste com as enzimas livres simultaneamente. A progressão da produção de D-galactose e de D-tagatose neste sistema estão mostradas na Figura 12, representadas como porcentagem em relação à concentração molar inicial de lactose. O teste foi adaptado para que as enzimas livres fossem adicionadas com uma atividade total semelhante à presente nos mCLEAs, porém com uma concentração maior de substrato inicial. O valor máximo de conversão da lactose em D-tagatose após 24 horas foi de apenas 6,4% em relação ao total disponível. Como a LAI atua em uma reação de isomerização reversível, há a necessidade de elevadas concentrações de galactose para deslocar o equilíbrio da reação para a produção de D-tagatose (OLIVEIRA, 2019). No presente experimento, por iniciar com concentração 0 de galactose, que foi aumentando gradualmente com a hidrólise pela

$\beta$ -galactosidase, não houve um deslocamento satisfatório para a produção de D-tagatose. A aplicação simultânea dos mCLEAs foi então descartada como opção viável à produção de D-tagatose a partir da lactose, e a aplicação sequencial foi então estudada.

Figura 12 – Aplicação simultânea de  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase livres



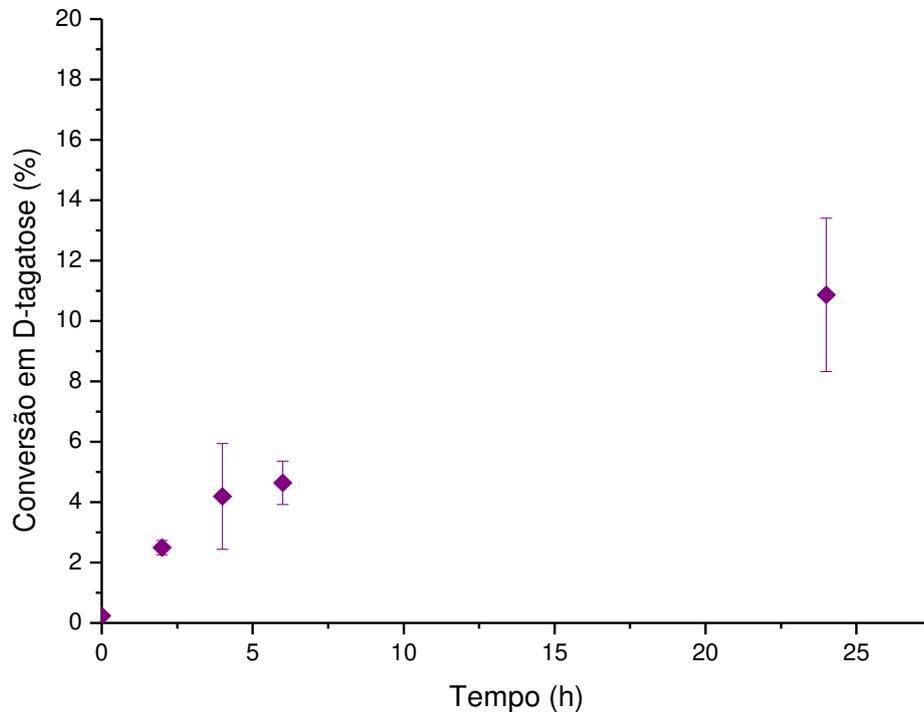
Fonte: elaborado pelo autor. Bioconversão de lactose 450 mm em galactose e D-tagatose pela aplicação simultânea de  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase livres. Experimento conduzido a pH 6,6, 50 °C, com  $MnCl_2$  1 mM.

A performance da aplicação dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e de L-arabinose isomerase recombinante de *Enterococcus faecium* (SOUSA *et al.*, 2020) no processo de bioconversão da lactose em D-tagatose foi estudada em biorreatores sequenciais, utilizando 0,3 g do mCLEA-DEX em 5 mL do substrato lactose 164 mM, a 37 °C no primeiro biorreator, seguida da utilização de 0,8 g do mCLEA-LAI na solução resultante, a 50 °C no segundo biorreator.

A primeira etapa, de hidrólise da lactose pelo mCLEA-DEX, foi realizada durante 24 h, resultando em 100% de conversão da lactose, e o produto foi separado do mCLEA com o auxílio de um super-ímã, para a utilização na segunda etapa. A atividade do mCLEA-DEX ao final da conversão se manteve condizente à estabilidade operacional obtida no experimento anterior. A

isomerização da D-galactose em D-tagatose pelo mCLEA-LAI foi conduzida também durante 24 h, resultando em 10,9% de conversão ao final do processo, como pode ser visualizado na Figura 13. O mCLEA-LAI reteve 100% de sua atividade ao final do processo. Apesar da taxa de conversão aparentemente baixa, há dois pontos importantes a serem ressaltados. O primeiro é que o mCLEA-LAI atua na etapa limitante da reação em cascata, que é naturalmente mais lenta e, na temperatura de 55 °C, ligeiramente maior que a utilizada no presente trabalho, atinge o máximo de conversão de 29,77%, a partir de 164 mM de substrato, como permitido pelo equilíbrio da reação (OLIVEIRA, 2019). Além disso, a recuperação de atividade do mCLEA-LAI mantém-se na faixa de 10% em relação ao extrato da enzima livre, logo, se o extrato possui baixa atividade, como o utilizado no presente trabalho, o mCLEA apresentará também baixa atividade. No trabalho de Sousa *et al.* (2020) é possível verificar a produção de um mCLEA-LAI com atividade cerca de 30 vezes maior que o do presente trabalho, com atividade recuperada na mesma faixa de 10%, o que indica a produção a partir de um extrato mais ativo. Logo, o resultado demonstra que os mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase são aplicáveis como parte da produção sequencial de D-tagatose a partir da lactose, sendo limitados apenas pela etapa final de produção, garantindo ainda maior reciclabilidade pela aplicação dos biocatalisadores em suas condições ideais.

Figura 13 – Produção de D-tagatose em biorreatores sequenciais



Fonte: elaborado pelo autor. Bioconversão de galactose 164 mM em D-tagatose por mCLEA-LAI no segundo biorreator da aplicação sequencial de mCLEAs, utilizando como substrato a galactose produzida pelo mCLEA-DEX no primeiro biorreator. Experimento conduzido a pH 6,6, 50 °C, com cofator MnCl<sub>2</sub> 1 mM.

### 5.10 Considerações e recomendações de uso dos mCLEAs de $\beta$ -galactosidase

A aplicação industrial dos mCLEAs selecionados deverá ponderar as características mais compatíveis com o tipo de processo que se deseja atingir. Considerando suas vantagens e desvantagens, ambos os biocatalisadores mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX apresentam perfis que podem favorecer sua escolha. A Tabela 7 mostra um panorama geral das características dos mCLEAs produzidos neste estudo, bem como de suas recomendações.

Tabela 7 – Quadro de características dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase

Característica	mCLEA-GLU-1.5	mCLEA-DEX
Atividade recuperada	32,3%	73,7%
Tempo de meia-vida a 60 °C	26,5 min	15,9 min
Tempo de meia-vida a 50 °C	1,63 h	9,13 h

<b>Velocidade máxima de hidrólise</b>	0,965 mM·min <sup>-1</sup>	0,425 mM·min <sup>-1</sup>
<b>Constante de Michaelis-Menten</b>	167,4 mM	86,8 mM
<b>Estabilidade após 10 ciclos de uso</b>	81,8%	54,6%
<b>Tempo recomendado de armazenagem</b>	10 semanas	6 semanas

Fonte: elaborado pelo autor. Resumo comparativo entre características dos mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase selecionados como viáveis para aplicação industrial.

A escolha do biocatalisador mCLEA-GLU-1.5 implica a adoção de um biocatalisador que recupera menos atividade em relação à enzima livre e tem menor afinidade pelo substrato, mas que garante uma maior estabilidade, logo pode ser reutilizado por maiores períodos. Já a escolha de mCLEA-DEX abdica da estabilidade prolongada, mas resulta na posse de um biocatalisador mais ativo e biocompatível.

## 6 CONCLUSÃO

Duas principais abordagens foram selecionadas para imobilização de  $\beta$ -galactosidase por mCLEAs, utilizando dextrana-aldeído ou glutaraldeído 1,5% como agentes reticulantes, ambos apropriados para o objetivo final de hidrólise da lactose. Embora em alguns aspectos os mCLEAs tenham se mostrado inferiores à enzima livre, ambos cumprem o papel principal da enzima imobilizada, que é sua eficiente reutilização, o que foi facilitado pela característica magnética resultado da incorporação de nanopartículas de magnetita.

Foi também atestada a viabilidade da utilização de mCLEAs de  $\beta$ -galactosidase junto a mCLEAs de L-arabinose isomerase em reatores sequenciais, para a produção de D-tagatose, açúcar de alto valor agregado. Tendo sido aplicada na mesma concentração de lactose presente no soro de leite de alta concentração, os resultados indicam que há uma oportunidade de abertura ou crescimento do mercado de produção de D-tagatose em locais com presença de indústrias de laticínios, que produzem muito soro de leite, como no estado do Ceará.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, Soleiman; SAEEDABADIAN, Arman. Influences of lactose hydrolysis of milk and sugar reduction on some physical properties of ice cream. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 367-374, 27 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1011-1>.

ABDUSSALAM-MOHAMMED, Wanisa; ALI, Amna Qasem; ERRAYES, Asma O.. Green Chemistry: principles, applications, and disadvantages. **Chemical Methodologies**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 408-423, 1 jun. 2020. Sami Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.33945/sami/chemm.2020.4.4>.

ASRAF, S. Sheik; GUNASEKARAN, P. Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application. 2010.

BAILEY, Michael J; LINKO, Matti. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. **Journal Of Biotechnology**, [s. l], v. 16, p. 57-66, 1990.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **Rsc Adv.**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 1583-1600, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3ra45991h>.

BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, [S.L.], v. 479, p. 110607, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.

BEADLE, James R.; SAUNDERS, James P.; WAJDA, Thomas J.. **PROCESS FOR MANUFACTURING TAGATOSE**. Titular: Biospherics Incorporated. USA n. 5,078,796. Depósito: 25 mar. 1991. Concessão: 7 jan. 1992.

BERNARDO, Braian. Confirma as tendências de redução e substituição de açúcar em refrigerantes. **Associação dos Fabricantes de Refrigerantes do Brasil (Afebras)**, [s. l], 13 maio 2020. Disponível em: <https://afrebras.org.br/noticias/confira-as-tendencias-de-reducao-e-substituicao-de-acucar-em-refrigerantes/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

BEZERRA, Rayanne M.; ANDRADE NETO, Davino M.; GALVÃO, Wesley S.; RIOS, Nathalia S.; CARVALHO, Ana Caroline L. de M.; CORREA, Marcio A.; BOHN, Felipe; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; FECHINE, Pierre B.A.; MATTOS, Marcos C. de.; SANTOS, José C.S. dos; GONÇALVES, Luciana R.B. Design of a lipase-nano particle

biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 125, p. 104-115, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.024>.

BORNSCHEUER, Uwe T. Immobilizing Enzymes: how to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 42, n. 29, p. 3336-3337, 28 jul. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200301664>.

BOSSO, Alessandra; MORIOKA, Luiz Rodrigo Ito; SANTOS, Leandro Freire dos; SUGUIMOTO, Hélio Hiroshi. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial  $\beta$ -galactosidase in UHT and skimmed milk. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 159-165, 4 mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.0085>.

BRADFORD, Marion M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÁS, Natércia F.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. QM/MM Studies on the  $\beta$ -Galactosidase Catalytic Mechanism: hydrolysis and transglycosylation reactions. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 421-433, 13 jan. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct900530f>.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. Granhen. Effluent generation by the dairy industry: preventive attitudes and opportunities. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 487-497, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-66322007000400003>.

CHENG, Shouyun; HUMMEL, Matt; DAHAL, Bishnu; GU, Zhengrong; KHAREL, Parashu; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, Sergio I.. A two-step process for the synthesis of sweetening syrup from aqueous lactose. **Lwt**, [S.L.], v. 117, p. 108659, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108659>.

CHENG, Shouyun; METZGER, Lloyd E.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, Sergio I.. One-pot synthesis of sweetening syrup from lactose. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, 17 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59704-x>.

CUI, Jian Dong; JIA, Shi Ru. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Critical Reviews**

**In Biotechnology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 15-28, 25 jul. 2013. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.795516>.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-9, 6 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DEMAN, John M. *et al.* **Principles of Food Chemistry**. 4. ed. Guelph: Springer, 2018.

DISCHE, Zacharias; BORENFREUND, Ellen. A NEW SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETECTION AND DETERMINATION OF KETO SUGARS AND TRIOSSES. **J Biol Chem**, [s. l], p. 583-587, out. 1951.

DONG, Tao; ZHAO, Lin; HUANG, Yu; TAN, Xin. Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 101, n. 16, p. 6569-6571, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.061>.

ECONODATA. **Setor de Laticínios no Ceará**. Disponível em:  
<https://www.econodata.com.br/setor/INDUSTRIA-ALIMENTOS-LATICINIOS/CEARA>.  
Acesso em: 22 nov. 2021.

EDVÂNIA RODRIGUES BRILHANTE. Federação das Indústrias do Estado do Ceará (Sistema Fiec). **MASTERPLAN**: agenda prioritária - biotecnologia. 2020. 50 p.

EDVÂNIA RODRIGUES BRILHANTE. Federação das Indústrias do Estado do Ceará (Sistema Fiec). **MASTERPLAN**: agenda prioritária - indústria agroalimentar. Fortaleza, 2020. 46 p.

ENERGY SIREN (org.). **Outbreak on D-Tagatose Market Report 2020-2026**:: current scenario for business opportunities, drivers and trends. Current Scenario for Business Opportunities, Drivers and Trends. 2021. Disponível em:  
<https://energysiren.co.ke/2021/12/25/outbreak-on-d-tagatose-market-report-2020-2026-current-scenario-for-business-opportunities-drivers-and-trends/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

FABER, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry**: a textbook. 5. ed. Graz: Springer, 2004.

FREITAS, Maria de Fátima Matos de. **PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 EM SORO DE LEITE E IMOBILIZAÇÃO EM QUITOSANA**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

GARCIA-GALAN, Cristina; BERENQUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C.. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S.L.], v. 353, n. 16, p. 2885-2904, nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100534>.

GAUR, R; PANT, H; JAIN, R; KHARE, S. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 97, n. 3, p. 426-430, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.020>.

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

HENRISSAT, Bernard. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.**, Grã-Bretanha, v. 280, p. 309-316, 1991.

HUSAIN, Qayyum.  $\beta$  Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews In Biotechnology**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 41-62, 9 fev. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388550903330497>.

JOKAR, A.; KARBASSI, A. In-house Production of Lactose-hydrolysed Milk by Beta-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal Of Agricultural Science And Technology**, [s. l], v. 13, n. 4, p. 577-584, 2011.

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

LEILAMARA DO NASCIMENTO ANDRADE. Federação das Indústrias do Estado do Ceará (Sistema Fiec). **MASTERPLAN**: diagnóstico de demandas e entraves do setor de laticínios do sertão central. 2020. 21 p.

LEUENBERGER, H. G. W.. BIOTRANSFORMACION-A USEFUL TOOL IN ORGANIC CHEMISTRY. **Pure & Appl. Chem.**, [s. l], v. 62, n. 4, p. 753-768, 1990.

LI, Liang; LI, Gang; CAO, Li-Chuang; REN, Guang-Hui; KONG, Wei; WANG, Si-Di; GUO, Geng-Shan; LIU, Yu-Huan. Characterization of the Cross-Linked Enzyme Aggregates of a Novel  $\beta$ -Galactosidase, a Potential Catalyst for the Synthesis of Galacto-Oligosaccharides. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 894-901, 15 jan. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf504473k>.

LIANG, Min; CHEN, Min; LIU, Xinying; ZHAI, Yafei; LIU, Xian-Wei; ZHANG, Houcheng; XIAO, Min; WANG, Peng. Bioconversion of d-galactose to d-tagatose: continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable l-arabinose isomerase and efficient purification by selective microbial degradation. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 93, n. 4, p. 1469-1474, 26 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3638-z>.

MADANI, R.; ZARIF-FARD, M.R.; GOLCHIN-FAR, F. Effect of Activators and Inhibitors on Lactase Activities to Determine its Kinetic Model. **Arch. Razi Ins.**, [s. l], v. 50, 1999

MAKSIMAINEN, Mirko M.; LAMPIO, Anja; MERTANEN, Mirka; TURUNEN, Ossi; ROUVINEN, Juha. The crystal structure of acidic  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 60, p. 109-115, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.003>.

MANZO, Ricardo Martín; ANTUNES, André Saraiva Leão Marcelo; MENDES, Jocélia de Sousa; HISSA, Denise Cavalcante; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; MAMMARELLA, Enrique José. Biochemical Characterization of Heat-Tolerant Recombinant l-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 Strain with Feasible Applications in d-Tagatose Production. **Molecular Biotechnology**, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 385-399, 27 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00161-x>.

MARTINS, Tabata. Tendência: Expansão do consumo. **Food Service News**, [s. l], 6 dez. 2018. Disponível em: <https://www.foodservicenews.com.br/tendencia-expansao-do-consumo/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

MATEO, Cesar; PALOMO, José M.; VAN LANGEN, Luuk M.; VAN RANTWIJK, Fred; SHELDON, Roger A.. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 273-276, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20033>.

NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science And Convergence Technology**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 157-163, 30 nov. 2017. The Korean Vacuum Society. <http://dx.doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>.

NOORI, Rubia; PERWEZ, Mohammad; SARDAR, Meryam. Cross-linked Enzyme Aggregates: Current Developments and Applications. In: HUSAIN, Qayyum; ULLAH, Mohammad Fahad. **Biocatalysis: enzymatic basics and applications**. Cham: Springer, 2019. Cap. 5. p. 83-112.

OH, Deok-Kun. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 1-8, 10 maio 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0981-1>.

OLIVEIRA, Ravena Casemiro. **ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

PARK, Y. K.; SANTI, M. S. S. de; PASTORE, G. M. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GALACTOSIDASE FROM ASPERGILLUS ORYZAE. **Journal Of Food Science**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 100-103, 1979.

RAVIKUMAR, Yuvaraj; PONPANDIAN, Lakshmi Narayanan; ZHANG, Guoyan; YUN, Junhua; QI, Xianghui. Harnessing L-arabinose isomerase for biological production of -tagatose: recent advances and its applications. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 107, p. 16-30, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.020>.

RICHARD, John P.; WESTERFELD, John G.; LIN, Sue. Structure—Reactivity Relationships for  $\beta$ -Galactosidase (*Escherichia coli*, lac Z): 1. Bronsted parameters for cleavage of alkyl  $\beta$ -d-galactopyranosides. **Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 37, p. 11703-11712, 1995

RICHMOND, M. L.; GRAY, J. I.; STINE, C. M. Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal Of Dairy Science**, [s. l.], v. 64, n. 9, p. 1759-1771, 1981.

ROSOLEN, Michele Dutra; GENNARI, Adriano; VOLPATO, Giandra; SOUZA, Claucia Fernanda Volken de. Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial  $\beta$ -Galactosidases. **Enzyme Research**, [S.L.], v. 2015, p. 1-7, 26 out. 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/806240>.

ROY, Sohini; CHIKKERUR, Jayaram; ROY, Sudhir Chandra; DHALI, Arindam; KOLTE, Atul Puroshtam; SRIDHAR, Manpal; SAMANTA, Ashis Kumar. Tagatose as a Potential Nutraceutical: production, properties, biological roles, and applications. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 83, n. 11, p. 2699-2709, 18 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14358>.

SADANA, Ajit; HENLEY, James P.. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics. **Biotechnology And Bioengineering**, [s. l], v. 30, p. 717-723, 14 abr. 1987.

SCHECKERMANN, Christian; WAGNER, Fritz; FISCHER, Lutz. Galactosylation of antibiotics using the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme And Microbial Technology**, [s. l], v. 20, p. 629-634, 1997.

SCHOEVAART, R.; WOLBERS, M.W.; GOLUBOVIC, M.; OTTENS, M.; KIEBOOM, A.P.G.; VAN RANTWIJK, F.; WIELEN, L.A.M. van Der; SHELDON, R.A.. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 754-762, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20184>.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica. **Advances In Cleaner Production**, São Paulo, v. 2, p. 1-10, 22 maio 2009.

SHAFI, Azra; AHMED, Faizan; HUSAIN, Qayyum.  $\beta$ -Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: its stability and application in the hydrolysis of lactose. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 184, p. 57-67, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.034>.

SHELDON, Roger A.. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 213-223, 7 dez. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/op100289f>.

SHUKLA, Himakshi; CHAPLIN, Martin. Noncompetitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*A. oryzae*) by galactose. **Enzyme Microb. Technol.**, [s. l], v. 15, p. 297-299, abr. 1993.

SIMOVIĆ, Milica; MILIVOJEVIĆ, Ana; ČOROVIĆ, Marija; BANJANAC, Katarina; BEZBRADICA, Dejan. Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized

$\beta$ -galactosidase. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 54, n. 11, p. 3074-3082, 17 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.14222>.

SOUSA, Marylane de; MANZO, Ricardo; GARCÍA, José; MAMMARELLA, Enrique; GONÇALVES, Luciana; PESSELA, Benevides. Engineering the l-Arabinose Isomerase from *Enterococcus Faecium* for d-Tagatose Synthesis. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 2164, 6 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22122164>.

SOUSA, Marylane de; GURGEL, Bárbara Silva; PESSELA, Benevides C.; GONÇALVES, Luciana R.B.. Preparation of CLEAs and magnetic CLEAs of a recombinant l-arabinose isomerase for d-tagatose synthesis. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 138, p. 109566, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmitec.2020.109566>.

SOUZA, Ticiane C. de; OLIVEIRA, Ravena Casemiro; BEZERRA, Saulo Gonçalves Santiago; MANZO, Ricardo M.; MAMMARELLA, Enrique J.; HISSA, Denise Cavalcante; GONÇALVES, Luciana R. B.. Alternative Heterologous Expression of l-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 By Residual Whey Lactose Induction. **Molecular Biotechnology**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 289-304, 27 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-021-00301-2>.

SWAGERTY, Daniel L.; WALLING, Anne D.; KLEIN, Robert M. Lactose Intolerance. **American Family Physician**, [s. l], v. 65, n. 9, p. 1845-1850, 1 maio 2002.

TALEKAR, Sachin; GHODAKE, Vishal; GHOTAGE, Trupti; RATHOD, Pavan; DESHMUKH, Priyant; NADAR, Shamraja; MULLA, Mosin; LADOLE, Mayur. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 123, p. 542-547, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.044>.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **Rsc Advances**, [S.L.], v. 3, n. 31, p. 12485, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3ra40818c>.

TANAKA, Yuji; KAGAMIISHI, Akihiro; KIUCHI, Akira; HORIUCHI, Tadao. Purification and Properties of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **J. Biochem.**, [s. l], v. 77, p. 241-247, 1975.

ULRICH, L. G.; MAFRA, A. C. O.; TARDIOLI, P. W.; RIBEIRO, M. P.A..  
IMOBILIZAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO A TÉCNICA CLEA

(CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES). **XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, São Carlos, 2017.

VELASCO-LOZANO, Susana; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; FAVELA-TORRES, Ernesto. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 166-177, 25 jan. 2016. Portico. <http://dx.doi.org/10.1515/boca-2015-0012>.

WANG, Anming; ZHANG, Fangkai; CHEN, Feifei; WANG, Meizhang; LI, Haifeng; ZENG, Zhaowu; XIE, Tian; CHEN, Zhenming. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using p-benzoquinone as cross-linking agent. **Korean Journal Of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1090-1095, 28 mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11814-010-0476-0>.

WANG, Mengfan; JIA, Chenxi; QI, Wei; YU, Qingxin; PENG, Xin; SU, Rongxin; HE, Zhimin. Porous-CLEAs of papain: application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 3, p. 3541-3545, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.120>.

WANG, Shuguang; ZHENG, Debing; YIN, Lingyu; WANG, Fei. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 107, p. 22-31, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.008>.

WINTER, Karel de; SOETAERT, Wim; DESMET, Tom. An Imprinted Cross-Linked Enzyme Aggregate (iCLEA) of Sucrose Phosphorylase: combining improved stability with altered specificity. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 11333-11342, 11 set. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms130911333>.

XENOS, K.; KYROUDIS, S.; ANAGNOSTIDIS, A.; PAPASTATHOPOULOS, P.. Treatment of lactose intolerance with exogenous beta-D-galactosidase in pellet form. **European Journal Of Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 350-355, jun. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03189363>.

XU, Zheng; LI, Sha; FENG, Xiaohai; LIANG, Jinfeng; XU, Hong. L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 98, n. 21, p. 8869-8878, 4 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6073-0>.

## ANEXO A – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DERIVADA DO TRABALHO

### 1. Resumos publicados em anais de congressos

1. **FREITAS, L. A.**; SOUSA, M.; GONCALVES, L. R. B. IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEA) MAGNÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE DERIVADOS DA LACTOSE. In: XXXVIII Encontro de Iniciação Científica, 2019, Fortaleza. Revista Encontros Universitários da UFC, 2020. v. 4. p. 1567.

2. **FREITAS, L. A.**; SOUSA, M.; GONCALVES, L. R. B. IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEA) MAGNÉTICOS. In: XXXIX Encontro de Iniciação Científica, 2021, Fortaleza. Revista Encontros Universitários da UFC. Fortaleza, 2021. v. 5. p. 1262.

3. **FREITAS, L. A.**; SOUSA, M.; GONCALVES, L. R. B. CONVERSÃO DE LACTOSE EM TAGATOSE USANDO MISTURAS DE CLEAS DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE E L-ARABINOSE ISOMERASE. In: XL Encontro de Iniciação Científica, 2021, Fortaleza. Revista Encontros Universitários da UFC. Fortaleza, 2021. v. 6 n. 2. p. 1061.

### 2. Premiações

2021 Prêmio UFC, Ciência e Sociedade – Melhor trabalho na categoria Iniciação Científica, grande área de conhecimento Ciências Exatas, da Terra e Engenharias – UFC, Universidade Federal do Ceará.

**ANEXO B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA D-TAGATOSE**

Curva de calibração da D-Tagatose para o método colorimétrico ácido sulfúrico-cisteína-carbazol

<b>Concentração de D-Tagatose (mM)</b>	<b>Absorbância</b>
<b>0,020</b>	0
<b>0,035</b>	0,0210
<b>0,050</b>	0,0320
<b>0,075</b>	0,1115
<b>0,100</b>	0,1615
<b>0,125</b>	0,1690
<b>0,150</b>	0,2600
<b>0,175</b>	0,2903
<b>0,200</b>	0,3355
<b>0,350</b>	0,6600
<b>0,500</b>	0,8440

Fonte: OLIVEIRA (2019).