



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

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

**CO-IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE
EM SUPORTE AGAROSE-EPÓXIDO**

FORTALEZA

2017

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

CO-IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE EM
SUPORTE AGAROSE-EPÓXIDO

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

Orientador: Prof. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2017

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

CO-IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE EM
SUPORTE AGAROSE-EPÓXIDO

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Sueli Rodrigues (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais César e Cléa pela educação, pelo incentivo e dedicação e por serem minha inspiração como pessoas e como profissionais. A minha irmã Patrícia e a todos meus familiares pelo apoio.

Ao CNPq e a FUNCAP pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela manutenção da bolsa de iniciação tecnológica e industrial.

A Professora Sueli Rodrigues, pela excelente orientação, paciência e conhecimentos compartilhados durante a iniciação científica.

A professora Luciana pelo auxílio e colaboração durante a execução desse projeto.

A professora Márjory por aceitar colaborar com este trabalho e participar da banca.

Aos grandes amigos que fiz durante graduação, Janise, Débora, Cadu, Luca, Amanda, Juliany, Guilherme e Ludmilla pela amizade, apoio nos momentos difíceis e companheirismo durante todo o curso.

A Dayane, Viviane, Amanda, Bia, Luma e Ívyna pela amizade de muitos anos, apesar da distância.

Aos meus amigos do LABIOTEC, Dayana, Rhonyele, Ronnyely, Iane, Tati Maciel, Thaty Vidal, Cris, Fátima, Karol, Nathan e Dyana, que tenho muita gratidão por tê-los no meu dia-a-dia, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

Enzimas são amplamente aplicadas na indústria de alimentos. Dentre elas, a enzima dextrana-sacarase (DS) se destaca por sua capacidade de produzir dextrana, quando na presença de sacarose, e oligossacarídeos prebióticos, na presença de um aceptor tais como glicose, maltose e frutose. Sua forma imobilizada é útil para uma produção mais econômica e eficiente desses produtos. Entretanto, a sua implementação em larga escala se torna um obstáculo por ser uma enzima de difícil imobilização. A co-imobilização com a enzima dextranase (DN) é uma alternativa para melhorar sua estabilidade. Com esta técnica, pode-se obter um catalisador multifuncional, que exhibe não apenas as atividades catalíticas desejadas de cada enzima individualmente, mas também outras funções devido seu efeito sinérgico. Este trabalho teve como objetivo a co-imobilização de dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido para a síntese de oligossacarídeos prebióticos. Foram determinadas a quantidade de suporte agarose-epóxido a ser utilizada e as condições de armazenamento do biocatalisador imobilizado. O ensaio contendo 1 mL de DS (26,16 UI) e 0,5 µL de DN (2,76 UI) apresentou os melhores resultados na avaliação dos parâmetros de rendimento, eficiência e atividade recuperada. Na análise de temperatura e pH ótimos, observou-se que a enzima co-imobilizada foi capaz de aumentar a sua faixa de atuação ótima em comparação com a enzima livre. Foi realizada a quantificação dos oligossacarídeos produzidos na síntese por meio de cromatografia de camada delgada. Os resultados mostraram que a co-imobilização foi realizada com sucesso, sendo produzido oligossacarídeos com até 5 graus de polimerização, similarmente ao obtido com as enzimas livres.

Palavras-chave: Co-imobilização. Dextrana-sacarase. Oligossacarídeos.

ABSTRACT

Enzymes are widely applied in the food industry. Among them, the enzyme dextranase has the ability to produce dextran in the presence of sucrose, while it synthesizes prebiotic oligosaccharides in the presence of an acceptor, examples being, glucose, maltose and fructose. Its immobilized form is useful for a more economical and efficient synthesis of these products. However, as it may not be immobilized easily, it can become an obstacle to its large-scale implementation. The co-immobilization with the enzyme dextranase is an alternative to improve its stability. The co-immobilization will form a multifunctional catalyst, which exhibits not only the desired catalytic activities of each enzyme individually, but also other functions due to their synergistic effect. This work aimed to co-immobilize dextranase and dextranase in epoxy-agarose support and to synthesize prebiotic oligosaccharides. The amount of epoxy-agarose support which was going to be used and the storage conditions were determined. Immobilization parameters such as yield, efficiency and recovered activity were analyzed, which presented the test with 1 mL of DS (26.16 UI) and 0.5 μ L DN (2.76 UI) as being the best for these parameters. In the analysis of optimum temperature and pH, it was observed that the co-immobilized enzyme was able to expand the range of optimum activity in comparison with the free enzyme. The oligosaccharides produced by the synthesis were quantified by thin layer chromatography. The results showed that the co-immobilization was carried out successfully and allowed to produce oligosaccharides with degrees of polymerization up to 5, similarly to what was obtained by using the free enzymes.

Keywords: Co-immobilization. Dextranase. Oligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Reação do acceptor para a produção de oligossacarídeos	18
Figura 2	– Métodos de imobilização de enzimas.....	20
Figura 3	– Ligação covalente de uma enzima à um suporte funcionalizado com epícloridrina	24
Figura 4	– Fermentação em batelada alimentada para obtenção da dextrana-sacarase	28
Figura 5	– Oligossacarídeos detectados através de cromatografia de camada delgada	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da quantidade de suporte para a co-imobilização de dextrana sacarase e dextranase	37
Gráfico 2 – Armazenamento das enzimas dextrana-sacarase e dextranase imobilizadas em suporte agarose-epóxido.....	38
Gráfico 3 – Atividade relativa da dextrana-sacarase em função da temperatura	39
Gráfico 4 – Atividade relativa da dextranase em função da temperatura	40
Gráfico 5– Atividade relativa da dextrana-sacarase em função do pH	41
Gráfico 6– Atividade relativa da dextranase em função do pH	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio padrão otimizado para a ativação do micro-organismo	27
Tabela 2 – Composição da solução enzimática	31
Tabela 3 – Parâmetros de imobilização da dextrana-sacarase em suporte agarose-epóxido, após 24 horas de imobilização.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DS	Dextrana-sacarase
DN	Dextranase
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
CCD	Cromatografia de camada delgada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (reorganizei os parágrafos)	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Leuconostoc mesenteroides	17
2.2 Dextrana-sacarase	17
2.3 Dextranase	18
2.4 Imobilização de enzimas	18
2.5 Co-imobilização	21
2.6 Suporte agarose-epóxido	22
2.7 Oligossacarídeos prebióticos (reorganizei os parágrafos).....	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção e ativação do micro-organismo	27
4.2 Fermentação para a produção da enzima dextrana-sacarase.....	28
4.3 Determinação dos açúcares redutores	29
4.4 Determinação da atividade enzimática	29
4.5 Ativação do suporte agarose-epóxido	30
4.6 Preparo da solução enzimática	31
4.7 Co-imobilização em suporte epóxido.....	31
4.8 Determinação da quantidade de suporte	32
4.9 Avaliação da estabilidade à estocagem.....	32
4.10 Detecção de oligossacarídeos por cromatografia de camada delgada (CCD).....	32
4.11 Análise de carboidratos por densitometria	33
4.12 Síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Imobilização	35
5.2 Efeito da quantidade de suporte.....	36
5.3 Avaliação da estabilidade à estocagem.....	38
5.4 Análise densitométrica de carboidratos.....	38

5.5 Síntese de oligossacarídeos prebióticos	42
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por produtos biotecnológicos, tem levado os pesquisadores a buscar novas ferramentas capazes de otimizar processos e produtos em escala industrial, como a imobilização de enzimas.

A enzima dextrana-sacarase é uma glicosiltransferase produzida por processo fermentativo, a partir da inoculação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose. Essa enzima hidrolisa a sacarose para produzir dextrana, liberando frutose, e quando na presença de um aceptor (glicose, maltose, frutose), a mesma produz oligossacarídeos prebióticos. Estes oligossacarídeos, por não serem hidrolisados pelo trato gastrointestinal, chegam até o colón promovendo o crescimento seletivo de bactérias benéficas como as bifidobacterias e lactobacilos (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004).

A dextrana-sacarase já foi estudada e utilizada com sucesso para a síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos pelo grupo de pesquisa, apresentando protocolos de produção, tanto em meio sintético como em sucos de frutas, e determinação de parâmetros enzimáticos para a forma livre (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2012; RABELO et al., 2006; VERGARA, 2007; VERGARA et al., 2010)

Um método de imobilização apropriado é necessário para o desenvolvimento de uma aplicação comercial para a síntese de oligossacarídeos, visto que a dextrana-sacarase é uma enzima de difícil imobilização (HEINCKE et al., 1999). A principal razão para isso é o fato de dela ter seus grupos reativos escondidos por uma camada de dextrana ligada a ela covalentemente e, portanto, ser impedida de interagir completamente com o suporte. Desse modo, são utilizadas técnicas de co-imobilização com a enzima dextranase para a hidrolise da dextrana. Além disso, é conseguido um efeito sinérgico pois a dextranase também atua favorecendo a produção de oligossacarídeos (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002).

A imobilização de enzimas em suportes porosos pode aumentar a estabilidade enzimática, evitando processos intermoleculares como a proteólise e agregação, pela prevenção de interações com fatores externos. (MATEO et al., 2000a). Apesar do alto custo de se trabalhar com enzimas, há diversas vantagens adquiridas com o processo de imobilização, tais como a reutilização da enzima por mais de um ciclo catalítico, a possibilidade de recuperação dos produtos e a

diminuição dos riscos de contaminação.

Para a utilização de técnicas de imobilização de enzimas, é fundamental a escolha de uma matriz adequada de acordo com as características estruturais de cada enzima. A agarose é um biopolímero poroso inerte, de baixo custo, extraído de fonte natural e dificilmente digerido por micro-organismos. Portanto, ela se torna interessante para a sua aplicação em técnicas de imobilização (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Os grupos hidroxila da agarose podem ser ativados por agentes bifuncionais como a epicloridrina, produzindo grupos epóxidos. Estes grupos ligam-se covalentemente aos grupos das cadeias laterais da enzima como lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol), ácido aspártico e glutamato (grupo carboxílico) (AHMAD; SARDAR, 2015).

Dessa forma, uma vez imobilizada, a enzima pode realizar a síntese de oligossacarídeos prebióticos de forma mais econômica, facilitando a recuperação dos produtos e reutilização do catalisador.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Leuconostoc mesenteroides*

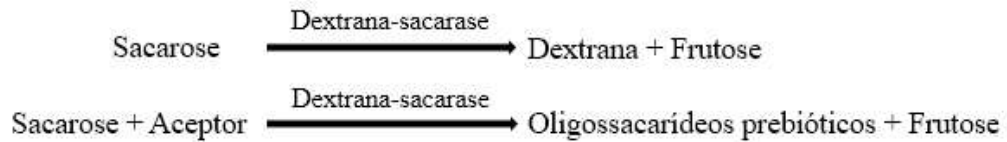
O micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F é uma bactéria ácido-láctica, não patogênica e a mais frequentemente utilizada para a produção de dextrana. Este micro-organismo produz, além da dextrana, dextrana-sacarase, frutose e oligossacarídeos prebióticos (CHAGAS et al., 2007). Por estar naturalmente presente em alimentos fermentados, *L. mesenteroides* é considerada uma bactéria GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (AMAN; SIDDIQUI; QADER, 2012). A dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F é secretada em grandes quantidades e com poucos contaminantes enzimáticos, ao contrário da enzima obtida a partir de outras cepas da mesma espécie e de *Streptococcus* da placa dentária, que produzem mais de um tipo da dextrana-sacarase, além de grande quantidade de enzimas contaminantes como invertases e levanasacarase (ROBYT; WALSETH, 1979). A linhagem B512F é a mais utilizada em fermentações industriais.

2.2 Dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) é uma glicosiltransferase bacteriana extracelular que promove a síntese de dextrana e oligossacarídeos prebióticos. A sua produção pode ser realizada via processo fermentativo através da inoculação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em um meio de cultura sintético contendo sacarose como única fonte de carbono. A sacarose é essencial para produção da enzima, pois sua expressão é indutiva, sendo o único indutor conhecido. No entanto, o micro-organismo se desenvolve em meios contendo outras fontes de carbono sem a produção da enzima (RODRIGUES; LONA; FRANCO, 2003). Quando, além da sacarose, é adicionado outro carboidrato como acceptor no meio reacional, as unidades de glicose são desviadas da cadeia de dextrana, sendo incorporadas na molécula acceptora, formando os oligossacarídeos (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004). As unidades de glicose são unidas por ligações α -(1 \rightarrow 6) na extremidade não redutora do acceptor (SEO et al., 2007). Essa reação (Figura 1) é chamada de reação do acceptor e a proporção sacarose/acceptor afeta a produção de dextrana, oligossacarídeos e o

grau de polimerização deles (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2012).

Figura 1 - Reação do acceptor para a produção de oligossacarídeos



Fonte: Vergara *et al.* (2010).

A atividade ótima da dextrana-sacarase ocorre em torno de 30 °C e na faixa de pH de 5,0 - 5,5. No entanto, a sua estabilidade a longo prazo é maior em temperaturas mais baixas (HEINCKE *et al.*, 1999).

2.3 Dextranase

Dextranases (EC 3.2.1.11) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações α -1,6 da dextrana. Elas são produzidas por vários micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos como *Chaetomium gracile* e *Chaetomium erraticum*, sendo estas as principais fontes de dextranases utilizadas comercialmente por apresentarem maior atividade enzimática do que as dextranases de bactérias e leveduras (EGGLESTON; MONGE, 2005; KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005). Dextranases podem ser empregadas em diferentes áreas, como na preparação e processamento de alimentos, na modificação de carboidratos, na medicina e na produção açucareira, reduzindo os efeitos deletérios causados pela dextrana (KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005). Além disso, a enzima desperta interesse pela síntese de isomalto-oligossacarídeos, os quais possuem efeitos prebióticos (ERHARDT; JÖRDENING, 2007).

2.4 Imobilização de enzimas

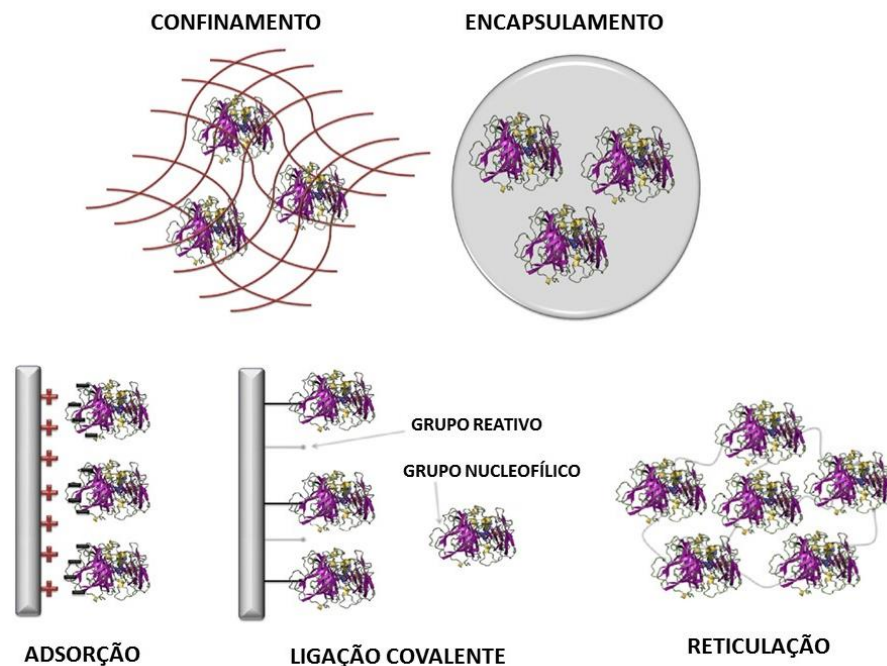
As enzimas são potenciais catalisadores e atuam em diversas condições de temperatura, pH, pressão e substrato para a produção de produtos desejados sem a formação de intermediários como contaminantes, por exemplo. Devido as diversas

vantagens que elas proporcionam, as enzimas possuem uma vasta aplicação na indústria. No entanto, elas também possuem algumas limitações como a alta sensibilidade às condições do processo, além do alto custo para a recuperação de produtos em enzimas solúveis. A fim de reduzir esses problemas, técnicas de imobilização de enzimas estão sendo estudadas e aprimoradas.

A imobilização enzimática corresponde às técnicas destinadas a aprisionar enzimas em matrizes sólidas, mantendo pelo menos parte de sua atividade catalítica (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Polímeros inertes e materiais inorgânicos são comumente utilizados como matrizes para imobilização. Além de ser acessível, uma matriz ideal deve ter características como inércia, força física, estabilidade, regenerabilidade, capacidade de aumentar a especificidade/atividade enzimática e reduzir a inibição do produto, a adsorção não específica e a contaminação microbiana (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012). Apesar do alto custo da utilização em larga escala de enzimas imobilizadas, esse problema é ofuscado por possuir uma eficiente e imediata recuperação, diminuir a possibilidade de contaminação dos produtos, e a atividade catalítica pode ser completamente explorada em muitos ciclos catalíticos (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Existem diversos métodos de imobilização disponíveis atualmente, tais como: adsorção física, ligação covalente, confinamento, encapsulamento e reticulação (figura 2).

Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Fernández-Fernández, Sanromán e Moldes (2013).

O encapsulamento e confinamento de enzimas são definidos como um aprisionamento de uma enzima dentro de uma rede de matriz 3D ou membrana, na qual a estrutura da enzima não é afetada. No entanto, problemas de limitação de transferência de massa e vazamentos podem ocorrer (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

A adsorção é um método bastante utilizado devido a sua simplicidade e baixo custo de operação, além de não requerer modificações químicas e estruturais na enzima (BRADY; JORDAAN, 2009). Nessa técnica, as enzimas são imobilizadas por meio de interações fracas como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações iônicas. Assim, uma desvantagem da técnica é a possibilidade de dessorção da enzima quando em variações de temperatura, pH e força iônica (GUIDINI et al., 2010).

A ligação covalente é um método bastante convencional no qual os grupamentos químicos da superfície do suporte são ativados e reagem com os grupamentos nucleofílicos da proteína por meio de uma ligação forte e estável (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). A ligação covalente da enzima com o suporte envolve duas etapas principais, a ativação do material de

suporte pela adição de um composto reativo e a modificação estrutural do polímero para ativar a matriz (KARTHICK, 2012). Em consequência das modificações estruturais promovidas por esse tipo de ligação, a atividade catalítica da enzima pode ser afetada negativamente, embora, em outros casos, a rigidez da estrutura tridimensional possa aumentar a atividade enzimática sob condições adversas (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Estudos visando a não utilização de suportes para a imobilização vem sendo desenvolvidos nas últimas décadas. Nestes casos, a imobilização é feita a partir da reação com agentes bifuncionais como o glutaraldeído que irá reagir com os grupos amino da enzima formando agregados sem o envolvimento de suportes. As vantagens do método de reticulação são a possível estabilização enzimática, a alta força de interação e não ocorrer vazamento de catalisador, enquanto as desvantagens são a limitação de transferência de massa, o uso de reagentes caros e tóxicos e a possível perda de atividade enzimática (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Diversos estudos relatam a imobilização da enzima dextrana-sacarase em sílica (ALCALDE et al., 1999; KABOLI; REILLY, 1980), alginato (BERENSMEIER et al., 2004; HASHEM et al., 2012; TANRISEVEN; DOĞAN, 2002), quitosana (GRAEBIN et al., 2016) e em suportes epóxi-ativados como o Eupergit C (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004). Neste trabalho, foi utilizado o método de imobilização covalente multipontual a partir da ativação da agarose com epicloridrina para a formação de grupamentos epóxi, como será descrito posteriormente.

2.5 Co-imobilização

Em alguns casos, para catalisar uma reação específica é necessária a utilização de múltiplas enzimas. Desse modo, técnicas de co-imobilização permitem o desenvolvimento de biocatalisadores multifuncionais, que exibem não apenas as atividades catalíticas desejadas de cada enzima, mas também um efeito sinérgico (ERHARDT et al., 2008).

As enzimas dextrana-sacarase e dextranase podem ser utilizadas juntas para a produção de isomalto-oligossacarídeos, a primeira o faz por meio da reação do acceptor e a segunda pela hidrólise de dextrana (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Ambas

enzimas possuem a vantagem de ter o mesmo pH ótimo (5,2). Dextrana-sacarase e dextranase já foram co-imobilizadas com sucesso em matriz de alginato para obtenção de oligossacarídeos a partir da sacarose (MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES; RODRIGUES, 2017; ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Entretanto, devido a formação de dextrana, a cápsula de alginato tende a se romper com o tempo.

2.6 Suporte agarose-epóxido

A escolha do suporte para a imobilização deve ser adequada às propriedades da enzima e suas condições de uso após imobilizada. De maneira geral, algumas características são desejáveis, como por exemplo: baixo custo, suporte e reagentes de natureza inofensiva à saúde e ao meio ambiente, suporte inerte do ponto de vista microbiano e químico, propriedades mecânicas compatíveis com as aplicações práticas, grande área superficial, elevada porosidade e tamanho de partícula adequadas (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

O suporte comercial Eupergit C está entre os mais estudados para imobilização de enzimas. Ele consiste em uma matriz de esferas microporosas e epóxi-ativadas com diâmetro entre 100 a 250 μm . Ele é obtido a partir da copolimerização de N,N-metileno-bis-(meta)acrilamida, glicidil metacrilato, alil glicidil éter e metacrilamida (BOLLER; MEIER; MENZLER, 2002; KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). A imobilização de enzimas neste suporte é rápida e fácil, tanto em escala de laboratório como em escala industrial, além de não necessitar de reagentes adicionais ou equipamentos especiais. Devido a densidade dos grupos oxiranos na superfície das esferas, as enzimas são imobilizadas em vários sítios da sua estrutura. Este fenômeno é chamado de ligação multipontual, e é considerada um fator importante para a alta estabilidade operacional das enzimas ligadas ao Eupergit C (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). Apesar do sucesso como matriz de imobilização o Eupergit C foi descontinuado e não se encontra mais disponível no mercado.

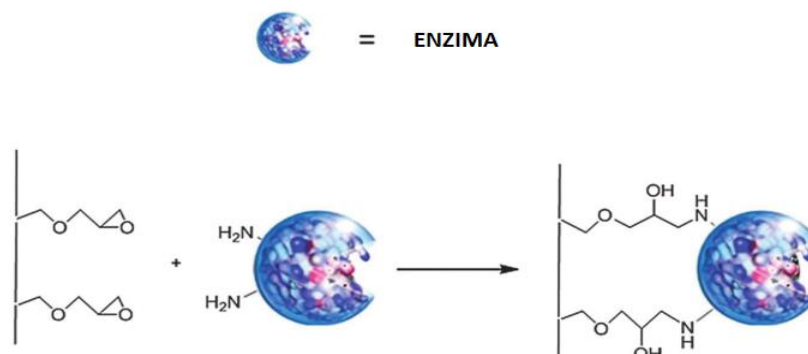
Desse modo, devido à facilidade de preparação, aos custos e à compatibilidade com micro-organismos, compostos como agarose ou alginato são de grande interesse para a utilização em processos de imobilização (ERHARDT et al.,

2008). Os géis de agarose, por sua vez são facilmente manipulados e ativados devido à presença de grupos hidroxila. Eles têm diâmetro poroso adequado para imobilização de proteínas e possui boas propriedades mecânicas, sendo utilizados com sucesso para imobilização/estabilização de diversas enzimas (RODRIGUES et al., 2008). Além disso, a grande superfície de géis de agarose permite a formação de várias ligações entre os grupos aldeídos do suporte e os grupos amino da enzima. Quanto maior o número de ligações entre enzima e suporte, mais rígida é a estrutura enzimática e, portanto, maior a estabilidade térmica da enzima imobilizada (MANRICH et al., 2010).

Na água, a agarose é fortemente hidrofílica, liofílica e extremamente inerte. Ao contrário de outros suportes hidrofílicos (tais como suportes à base de dextrana, poliacrilamida e álcool polivinílico), o volume da agarose não é alterado com a mudança de solventes. A arquitetura 3D da rede de polímeros permanece praticamente inalterada quando as moléculas de água são retiradas e substituídas por outros solventes, como a acetona (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Tendo em vista uma aplicação em larga escala, suportes epóxidos ativados são sistemas quase ideais por apresentar protocolos de imobilização fáceis e por sua estabilidade de armazenamento. Sob baixas temperaturas, eles podem ser armazenados por meses sem alterar a sua reatividade. Os grupos epóxi permanecem estáveis durante semanas a pH neutro em condições úmidas e à temperatura ambiente, entretanto sob pH alcalino, os grupos epóxi são menos estáveis. Como demonstrado na Figura 3, os suportes epóxidos são capazes de reagir com diferentes grupos nucleofílicos da superfície da proteína (por exemplo, grupos amino, hidroxila, tiol) para formar ligações extremamente fortes com mínima modificação química da proteína (BARBOSA et al., 2013; MATEO et al., 2000b).

Figura 3 – Ligação covalente de uma enzima à um suporte funcionalizado com epícloridrina



Fonte: Sheldon e Van Pelt (2013).

2.7 Oligossacarídeos prebióticos

Oligossacarídeos são carboidratos de baixo peso molecular com grau de polimerização de 3 a 10 unidades de monossacarídeos. Os oligossacarídeos prebióticos não são digeríveis devido à configuração dos átomos de carbono anoméricos (C1 ou C2) dos monossacarídeos, e isso faz com que suas ligações glicosídicas não sejam suscetíveis à atividade hidrolítica das enzimas digestivas (ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Eles apresentam doçura na ordem de 0,3 a 0,6 vezes a da sacarose. Esta característica de baixa doçura é explorada em formulações alimentares como substituto da sacarose. Além disso, as baixas densidades calóricas tornam os oligossacarídeos úteis como aditivos de volume em formulações alimentares. Eles podem ser encontrados naturalmente em alimentos ou produzidos por síntese enzimática ou química a partir de dissacarídeos ou outros substratos, bem como por hidrólise de polissacarídeos (JAVIER MORENO et al., 2017; PATEL; GOYAL, 2011).

Prebióticos são definidos como ingredientes fermentados seletivamente por bactérias do cólon e que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal e conferem benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2004). Estudos relatam que o consumo de prebióticos pode ser relacionado a melhora no sistema imunológico, modulação na microflora gastrointestinal, alívio em doenças inflamatórias intestinais, prevenção do câncer,

metabolismo de lipídios, redução da diarreia e efeito sobre a absorção de minerais (MAAWIA et al., 2016).

Entre os oligossacarídeos com efeitos bifidogênicos que são produzidos comercialmente estão ciclodextrinas, frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, gentiooligossacarídeos, glicosilacarose, isomaltoligossacarídeos, isomaltulose, lactusacarose, lactulose, maltooligossacarídeos, rafinose, oligossacarídeos de soja e xilooligossacarídeos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Os oligossacarídeos obtidos a partir da reação do acceptor da dextransacarase possuem várias aplicações na área alimentícia. Quando maltose é utilizada como acceptor da reação, o principal produto são os isomalto-oligossacarídeos, que podem ser usados como adoçantes não cariogênicos e agentes estabilizantes de bebidas. Quando glicose ou frutose são utilizadas como aceptores, há formação de gluco-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos, respectivamente, que da mesma forma que os malto-oligossacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos impedindo o crescimento de micro-organismos patógenos como *Salmonella* e *Escherichia coli* (RABELO, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a co-imobilização da enzima dextrana-sacarase em suporte agarose-epóxido e determinar os parâmetros de imobilização para a aplicação na produção de oligossacarídeos prebióticos.

3.2 Objetivos específicos

- Imobilizar a enzima dextrana-sacarase em suporte agarose-epóxido;
- Estudar o efeito da co-imobilização de dextrana-sacarase e dextranase;
- Definir a quantidade de suporte necessária para a imobilização;
- Avaliar o armazenamento das enzimas co-imobilizadas;
- Determinar a temperatura e pH ótimos da enzima co-imobilizada;
- Sintetizar oligossacarídeos com a enzima co-imobilizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e ativação do micro-organismo

A linhagem do micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F foi obtida em meio MRS (Meio de Man, Rogosa e Sharpe) e sua ativação realizada utilizando o meio padrão otimizado por Guimarães *et al.* (1999), descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Meio padrão otimizado para a ativação do micro-organismo

Reagente	Concentração (g/L)
Sacarose	50
Extrato de levedura	20
Fosfato de potássio dibásico	20
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,02
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01

Fonte: GUIMARÃES *et al.* (1999)

As soluções salinas foram preparadas separadamente em concentrações superiores (soluções estoque), sendo posteriormente diluídas para preparação do meio padrão de forma a atingirem as concentrações da Tabela 1. Foram dissolvidos a sacarose e o extrato de levedura e adicionadas as soluções salinas exceto o fosfato de potássio, de forma que após a adição dele as concentrações da tabela 1 fossem obtidas. O pH do meio foi ajustado com ácido fosfórico para 6,7 e então dividido em Erlenmeyers contendo alíquotas de 100 mL, cada um, os quais foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Preparou-se separadamente na forma concentrada o fosfato de potássio dibásico (200g/L), ajustou-se o pH para 6,7 e esterilizou-se em tubos rosqueados contendo 10 mL cada, que foram adicionados à frio aos Erlenmeyers contendo o meio de cultura na hora da inoculação.

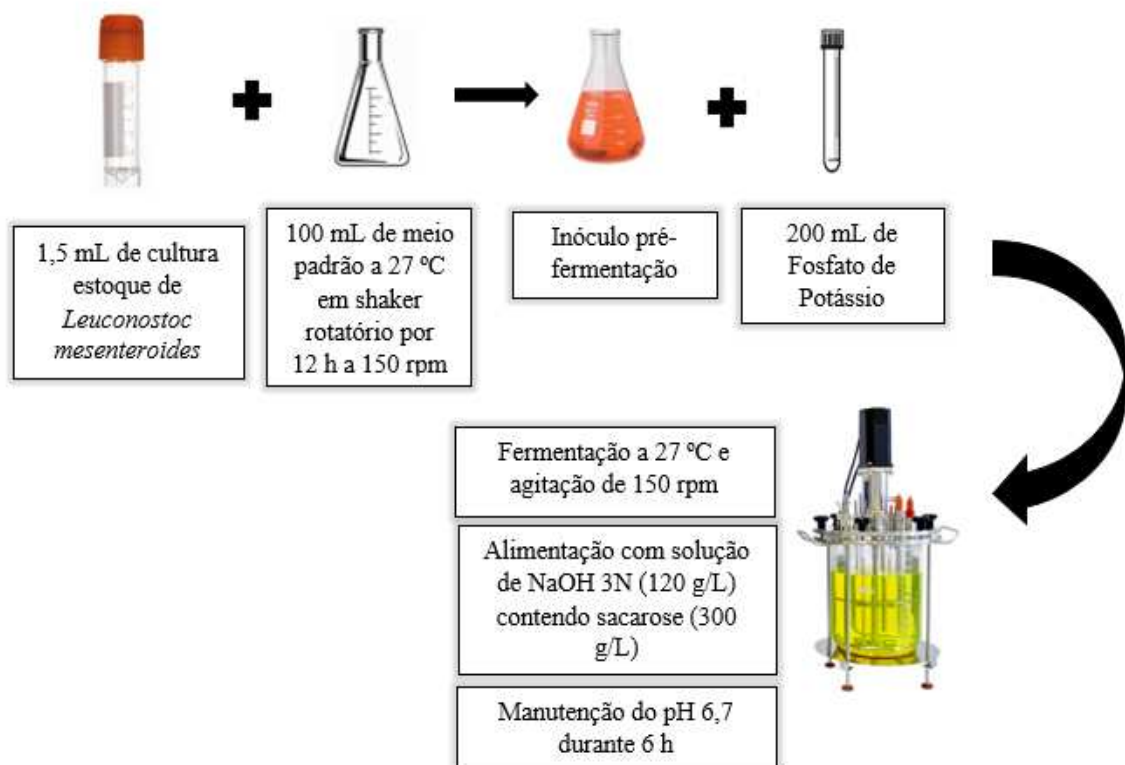
Foi realizada a inoculação do micro-organismo em 100 mL de meio padrão otimizado por GUIMARÃES *et al.* (1999), e a ativação foi conduzida em agitador

rotatório a 27 °C com agitação de 150 rpm por aproximadamente 12 horas. O pH do meio foi registrado e mantido acima de 5,2, pH limite para o crescimento do micro-organismo. Em seguida, o micro-organismo foi armazenado em solução de glicerol 10% (v/v) e congelado a -20 °C em tubos criogênicos para ser usado como inóculo da fermentação.

4.2 Fermentação para a produção da enzima dextrana-sacarase

A fermentação em batelada alimentada foi realizada no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará e foi realizada de acordo com a metodologia previamente estabelecida por Rodrigues (2003). O controle do pH em 6,7 foi realizado através da adição automática de uma solução de NaOH 120 g/L contendo sacarose (300 g/L). A fermentação se deu de acordo com a Figura 4.

Figura 4 - Fermentação em batelada alimentada para obtenção da dextrana-sacarase



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 6 horas, a alimentação foi interrompida. A fermentação foi encerrada quando o pH atingiu o valor de 5,8. As células foram então removidas por meio de centrifugação do caldo a 11600 x g por 10 minutos a 4 °C. Desta forma, a enzima bruta (contida no sobrenadante) é separada das células. A purificação da enzima foi realizada por meio da sua precipitação pela adição de polietilenoglicol (PEG), de acordo com a seguinte metodologia (RODRIGUES, 2003):

- 1) Adicionar lentamente ao concentrado uma solução de polietilenoglicol (PEG) a 50 % de mesmo volume;
- 2) Centrifugar a mistura a 11600 g por 10 minutos a 4 °C;
- 3) Ressuspender o precipitado (fase rica em dextrana-sacarase) em tampão acetato de sódio 20 mM com pH ajustado para 5,2, contendo 0,05 g/L de CaCl₂. A enzima obtida foi estocada em freezer (-20 °C).

4.3 Determinação dos açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Miller (1959). Nesta metodologia, a amostra em estudo reage com o ácido dinitrosalicílico (DNS) a 100 °C por 5 minutos. Transcorrido este período reacional determinou-se a concentração desses açúcares na amostra baseando-se princípio de que este valor é proporcional a absorbância no espectro visível a 540 nm.

Para tanto, construiu-se uma curva padrão de calibração utilizando soluções padrões de glicose cujas concentrações já eram conhecidas. Foi utilizado 125 µL de cada solução padrão e adicionado 125 µL da solução de DNS. A mistura foi diluída com 2.250 µL de água destilada e lida a 540 nm. Esta curva consistiu de uma reta que passa pela origem dos eixos e cuja equação foi determinada por meio de regressão linear.

4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da dextrana-sacarase foi determinada através da quantificação da frutose liberada em meio reacional contendo sacarose como

substrato. A atividade enzimática é dada em unidade internacional de dextrana-sacarase (UI/mL), que corresponde a quantidade de enzima que produz 1 μmol de frutose a partir da sacarose por minuto (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002).

Para a determinação da atividade da enzima obtida no meio sintético, foram preparados 100 mL de uma solução de atividade contendo 18,2 mL de uma solução estoque de sacarose (600 g/L) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl_2 e 4,5 mL de tampão de acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/L de CaCl_2 . O pH da solução foi ajustado para 5,2. Uma alíquota de 450 μL desta solução de atividade foi adicionada a dois tubos de ensaio e, em seguida, uma alíquota de 50 μL da enzima livre foi adicionada a cada tubo de ensaio, foram adicionados 500 μL do reagente de DNS ao tubo de tempo 0, e após 10 minutos de incubação a 30 °C foi adicionado no tubo de tempo 10. Para a enzima imobilizada foi realizado o mesmo processo com a adição da etapa de centrifugação para separar a solução de atividade do suporte após os 10 minutos. Os tubos foram aquecidos por 5 minutos a 100°C e a cada um dos tubos foram adicionados 9,0 mL de H_2O destilada, homogeneizados e lidos a 540 nm.

A atividade enzimática foi determinada pela equação 1:

$$\text{Atividade} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{((\text{Abs } 10 - \text{Abs } 0) \times d \times 10^3)}{\alpha \times 180 \times t} \quad (1)$$

Sendo:

α → coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ABS.ml);

Abs10 → valor médio das leituras de absorbância no tempo 10 minutos;

Abs0 → valor médio das leituras de absorbância no tempo zero;

d → diluição da amostra;

t → tempo de reação.

4.5 Ativação do suporte agarose-epóxido

Realizou-se a ativação do suporte agarose-epóxido de acordo com a metodologia descrita por Mateo *et al.* (2010). O procedimento consistiu na adição de uma solução contendo 3,28 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,2 g borohidreto de sódio (NaBH_4) em 44 mL de água destilada à 10 g de agarose 6BCL, previamente

lavada com água destilada. Preparou-se uma solução de 11 mL de epicloridrina e 16 mL de acetona, à frio, que foi adicionada lentamente à solução anterior. Manteve-se sob suave agitação por 16 horas a temperatura em torno de 25°C. Depois deste tempo, o suporte foi lavado abundantemente com água destilada e, em seguida, seco a vácuo.

4.6 Preparo da solução enzimática

Foram preparados quatro diferentes ensaios contendo a enzima dextrana-sacarase e variando-se a quantidade de dextranase (Tabela 2). Em todos os ensaios, acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ pH 5,2 foi utilizado como solução tampão.

Tabela 2 – Composição da solução enzimática

Ensaio	Dextranase (µL)	Dextrana-sacarase (mL)
0	0	1 (26,16 UI)
1	0,5 (2,76 UI)	1 (26,16 UI)
2	2,5 (13,80 UI)	1 (26,16 UI)
3	4,5 (24,84 UI)	1 (26,16 UI)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Co-imobilização em suporte epóxido

A co-imobilização das enzimas dextrana-sacarase e dextranase se deu pela adição de 1 mL de solução enzimática no suporte agarose-epóxido. A mistura foi incubada por 24 horas sob agitação leve a 4 °C. Os parâmetros de imobilização, rendimento, eficiência e atividade recuperada, foram calculados como descrito por Sheldon e Van Pelt (2013). As equações 2, 3 e 4 referentes ao rendimento, eficiência e atividade recuperada, respectivamente, estão mostradas abaixo:

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo a atividade imobilizada, a atividade inicial menos a atividade residual do sobrenadante após a imobilização.

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \times 100 \quad (3)$$

Sendo a atividade observada a atividade medida no suporte imobilizado.

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (4)$$

4.8 Determinação da quantidade de suporte

Para a determinação da quantidade de suporte a ser utilizada no protocolo de imobilização, foi realizado um ensaio com diferentes proporções de atividade oferecida (U/g) para 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg de suporte em cada tubo. A imobilização ocorreu por 24 horas sob agitação leve em agitador rotativo à 4 °C. Após esse período foi realizada a análise de atividade enzimática para cada ensaio.

4.9 Avaliação da estabilidade à estocagem

Determinou-se a atividade enzimática de suportes previamente co-imobilizados, armazenados a 4 ° C durante 60 dias. A atividade enzimática foi determinada a cada 7 dias. O ensaio 1, contendo 1 mL DS (26,16 UI) e 0,5 µL de dextranase (2,76 UI) co-imobilizadas em 300 mg de suporte agarose-epóxido em solução tampão com pH 5,2 foi escolhido para teste.

4.10 Detecção de oligossacarídeos por cromatografia de camada delgada (CCD)

A análise dos açúcares e oligossacarídeos foi feita através de cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 (Merk). Foi utilizado o

amostrador automático CCD (ATS4 *sampler*, Camag) e realizada a técnica de múltiplas ascensões, para uma melhor separação dos produtos de interesse. Para a separação dos oligossacarídeos foi utilizado o sistema acetonitrila/acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90), sendo realizadas duas ascensões, enquanto que para a separação de açúcares foi utilizado o sistema acetonitrila/água (85:15), sendo realizadas três ascensões (RODRIGUES, 2003). Para cada sistema de solvente foi utilizada uma nova placa. Ao término de cada ascensão, a placa foi seca com auxílio de secador de cabelos para remoção completa da fase móvel. Como sistema de detecção, foi utilizada uma solução constituída de 0,3 % (p/v) de 1-naftiletlenodiamina e 5 % (v/v) de H₂SO₄ concentrado em metanol. Ao término da última ascensão, as placas foram removidas da cuba, secas com auxílio de secador de cabelos, e mergulhadas rapidamente no reagente de detecção. Após secagem natural ou com uso de secador com jato de ar frio, as placas foram colocadas em aquecedor TLC Plate Heater (Camag) a 120 °C por 10 minutos para revelação (ROBYT, 2000).

4.11 Análise de carboidratos por densitometria

Foram utilizadas como parâmetro para determinar a atividade de cada enzima a glicose e a frutose liberadas pela dextranase e dextrana-sacarase, respectivamente. Esta análise foi realizada em densitômetro TLC scanner 4 (Camag) em comprimento de onda 490 nm e a avaliação dos cromatogramas pelo software winCATS. Uma curva de calibração dos açúcares foi usada para a quantificação de açúcares liberados. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi mensurado de 15 °C a 40 °C usando o tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ pH 5,2. O efeito do pH foi avaliado no intervalo de 4,5 a 7,0 com tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ mM para 4,5 a 5,5 e tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ para intervalo de 6,0 a 7,0, todos a 30 °C. Temperatura e pH foram avaliados pela quantidade de frutose e glicose liberadas nos ensaios com diferentes quantidades de dextranase (0,5 µL, 2,5 µL e 4,5 µL). Os resultados foram expressos em atividade relativa e foi calculado pela razão entre a atividade a cada temperatura ou pH e o máximo obtido.

4.12 Síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos

A síntese de oligossacarídeos foi realizada usando as enzimas dextran-sacarase e dextranase livres e co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido (1 UI/mL, 0,9 UI/g). Os substratos utilizados foram maltose (45 g/L) e sacarose (40 g/L) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ pH 5,2. A síntese foi realizada por 6 horas a 4°C e 25 °C, sob agitação leve e em seguida analisada por cromatografia de camada delgada conforme metodologia previamente descrita.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imobilização

A tabela 3 mostra os resultados dos parâmetros de imobilização cujas atividades foram realizadas pelo método de DNS. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o Teste de Tukey foi utilizado para determinar a diferença entre os ensaios, com nível de confiança de 95 % usando o software Statistica e os resultados expressos como médias \pm desvio padrão.

Tabela 3 - Parâmetros de imobilização da dextrana-sacarase em suporte agarose-epóxido, após 24 horas de imobilização

Ensaio	Rendimento de imobilização (%)	Eficiência de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)	Atividade do biocatalisador imobilizado (U/g de suporte)
0	21,50 \pm 0,49 ^a	184,44 \pm 5,10 ^a	39,62 \pm 1,10 ^a	4,20 \pm 0,12 ^a
1	11,16 \pm 0,42 ^b	534,17 \pm 8,11 ^b	59,54 \pm 0,91 ^b	4,93 \pm 0,07 ^b
2	12,51 \pm 1,13 ^b	435,72 \pm 1,83 ^c	54,25 \pm 0,23 ^c	5,66 \pm 0,02 ^c
3	16,65 \pm 2,62 ^a	333,54 \pm 1,57 ^d	50,65 \pm 2,08 ^d	5,95 \pm 0,04 ^d

Ensaio 0 (controle, DS 26,16 UI / mL), ensaio 1 (DS 26,16 UI / mL + DN 0,5 μ L, 2,76 UI), ensaio 2 (DS 26,16 UI / mL + DN 2,5 μ L, 13,80 UI) e ensaio 3 (DS 26,16 UI / mL + DN 4,5 μ L, 24,84 UI). Os valores na mesma coluna que compartilham a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora o ensaio 0 (controle) tenha apresentado maior rendimento de imobilização (21,50%), nos outros parâmetros analisados este ensaio foi o de menor atividade recuperada e eficiência de imobilização, portanto, pode-se inferir que a quantidade de enzima que teoricamente está ligada ao suporte, pode não estar cataliticamente ativa ou se encontra inacessível após a imobilização.

A dextrana-sacarase co-imobilizada com dextranase em agarose-epóxido apresentou uma grande eficiência, superior a 100%. Isso demonstra que a enzima sofreu uma ativação após a co-imobilização, pois sua atividade final foi maior do que a atividade oferecida inicialmente. Este aumento na atividade da dextrana-sacarase já foi relatado na literatura em diferentes solventes e pode ser explicado por mudanças

na conformação da enzima (GIRARD; LEGOY, 1999). Neste caso, a imobilização favoreceu a atividade da dextrana-sacarase, demonstrando a boa compatibilidade da enzima e do suporte.

Podemos observar que o aumento da quantidade de dextranase afeta negativamente a atividade recuperada e a eficiência de imobilização. O ensaio 1 apresenta 59,54 % de atividade recuperada, enquanto o ensaio 3, com nove vezes mais dextranase, apresentou 50,65 %. Apesar disso, os ensaios 1, 2 e 3 ainda possuem maior atividade recuperada do que o ensaio 0, com 39,62 %. Isso pode ter sido causado pela ação da dextranase na camada de dextrana da dextrana-sacarase, pois apesar da dextranase facilitar o acesso aos grupos funcionais da dextrana-sacarase promovendo as ligações covalentes multipontuais, a remoção da dextrana também pode causar a inativação da dextrana-sacarase (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010).

A enzima dextrana-sacarase é de difícil imobilização devido a algumas características da sua estrutura. Os melhores resultados de imobilização obtidos com esta enzima se deram em matriz de alginato e em Eupergit C. No entanto, a utilização do alginato apresenta baixa estabilidade operacional, com problemas difusionais e de vazamento do catalizador (BERENSMEIER et al., 2004). Enquanto que o Eupergit C possui a vantagem de ter um grande número de ligações epóxido disponíveis, favorecendo a imobilização (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). Porém, este suporte não é mais comercializado. A dextrana-sacarase livre de dextrana foi imobilizada em Eupergit C 250L apresentando uma atividade máxima recuperada de 22% (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004). Na co-imobilização por encapsulamento em alginato de dextrana-sacarase solúvel e dextranase ligada ao Eupergit C, Ölçer e Tanriseven (2010) conseguiram uma atividade recuperada de 71%. Para solucionar as dificuldades na imobilização da dextrana-sacarase, Parlak e colaboradores (2013) desenvolveram uma dextrana-sacarase truncada no N e C terminais e fusionada à glutathione S-transferase, a nova enzima foi imobilizada covalentemente em Eupergit C 250 L com até 83 % de atividade recuperada.

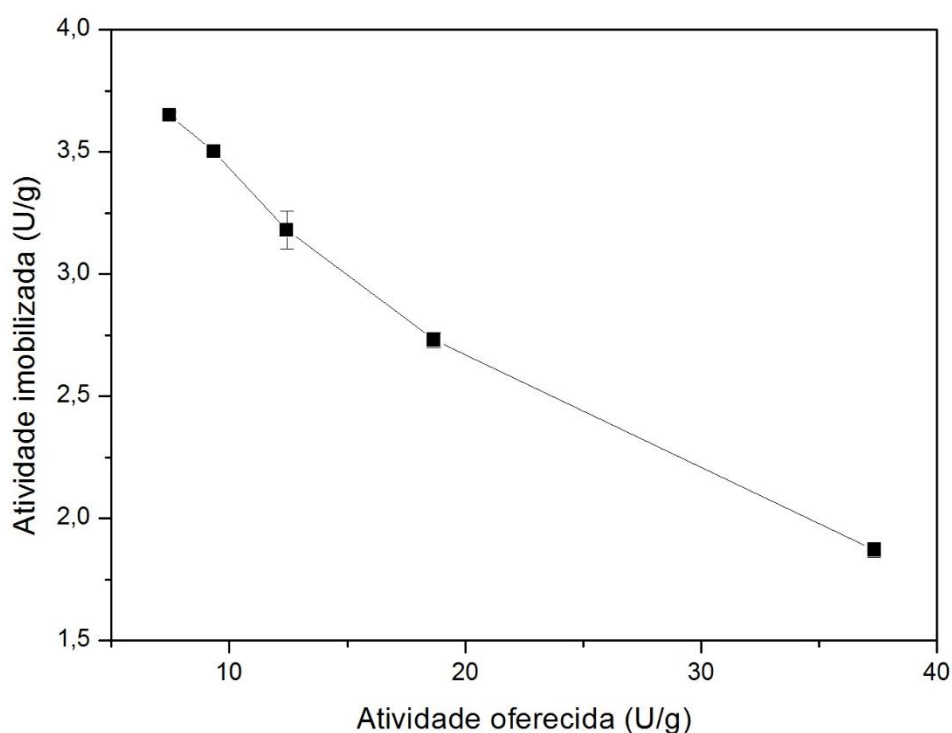
5.2 Efeito da quantidade de suporte

Para determinar a quantidade de suporte agarose-epóxido necessária para

a imobilização, foram testadas diferentes quantidades de atividade oferecida para 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg e 500 mg de suporte. Os resultados da imobilização demonstraram que a atividade imobilizada foi inversamente proporcional à atividade oferecida. Quando é fornecido uma alta quantidade de enzima para pouco suporte, temos uma saturação das ligações do suporte, dessa forma, a enzima não tem mais grupamentos disponíveis para interagir. Enquanto que, diminuir a proporção de atividade oferecida, apresentou as melhores atividades por grama de suporte. Provavelmente, uma maior quantidade de sólido favorece à interação entre enzima e suporte, devido à área ocupada por ele permitir que as enzimas estejam dispostas mais espaçadamente.

Desse modo, como pode-se ver no Gráfico 1, foi observada uma variação de somente 13 % na atividade imobilizada obtida entre 3,65 U/g (500 mg) e 3,18 U/g (300 mg). Assim, visando uma maior economia de suporte, foi estabelecido a atividade oferecida de 12,43 U/g, encontrada no ensaio com 300 mg de suporte, como a quantidade a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Gráfico 1 - Efeito da quantidade de suporte para a co-imobilização de dextrana-sacarase e dextranase

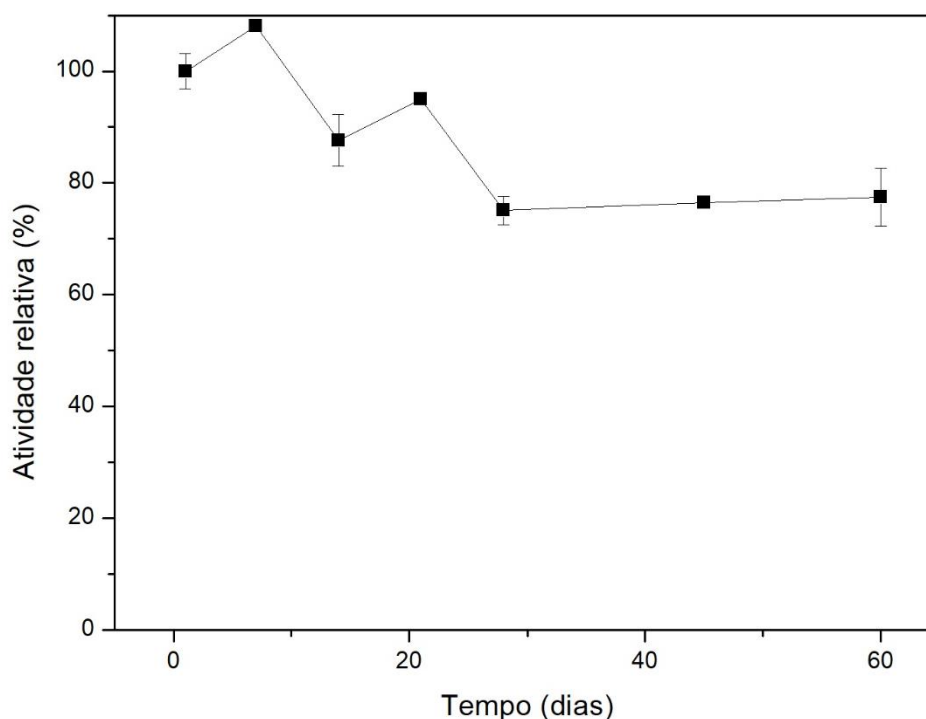


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Avaliação da estabilidade à estocagem

A partir dos resultados obtidos podemos observar que não houve grande perda de atividade durante o armazenamento das enzimas co-imobilizadas (Gráfico 2). Foi mantida uma atividade relativa acima de 70 % ao fim de 60 dias de armazenamento. Autores já reportaram a manutenção mais de 75 % de atividade após 1 mês de armazenamento da dextrana-sacarase imobilizada em matriz de alginato e quitosana (GRAEBIN et al., 2016; KOTHARI; BARUAH; GOYAL, 2012; MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES; RODRIGUES, 2017).

Gráfico 2 - Armazenamento das enzimas dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido



Fonte: Elaborado pelo autor.

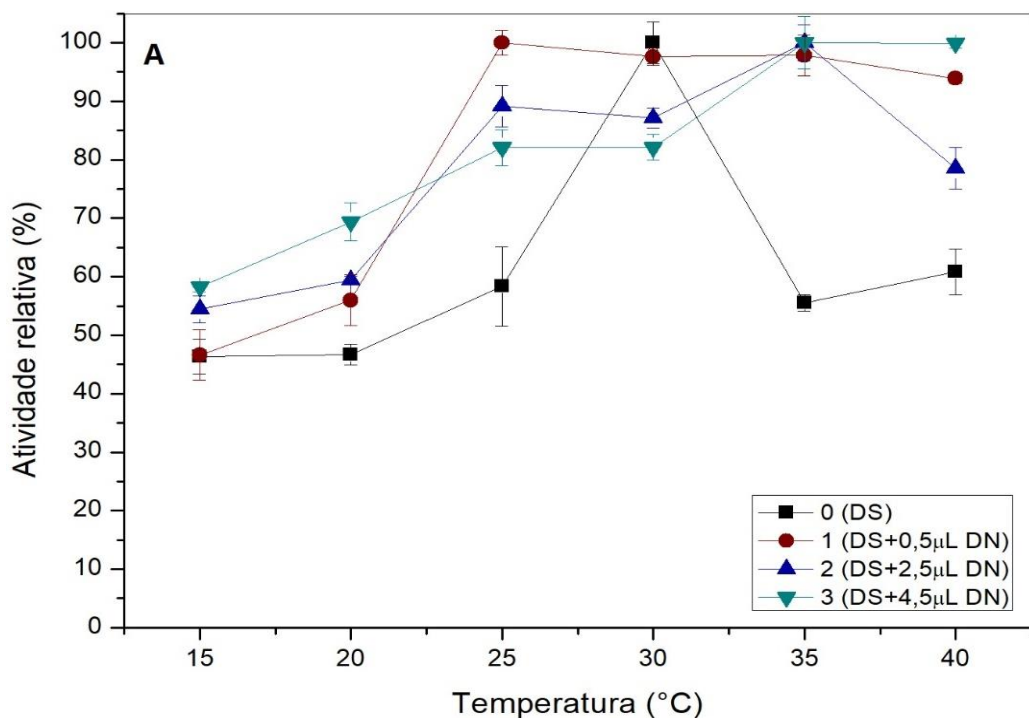
5.4 Análise densitométrica de carboidratos

A atividade enzimática da dextrana-sacarase e dextranase foram mensuradas por análise densitométrica. Os Gráficos 3 e 4 mostram a temperatura ótima para todos os ensaios, para a atividade de dextrana-sacarase e dextranase,

respectivamente.

A dextrana-sacarase (ensaio 0) apresentou atividade relativa menor que 50 % em todas as temperaturas, exceto a 30 °C (Gráfico 3). Comportamento semelhante foi relatado na literatura para a enzima livre e imobilizada em sílica e alginato (HASHIM et al., 2012; KABOLI; REILLY, 1980). A temperatura ótima para o ensaio 1 foi de 25 °C, enquanto para o 2 e 3 foi de 35 °C. As enzimas co-imobilizadas apresentaram uma maior faixa de temperaturas com atividades maiores que 75 %. Isso pode ser explicado pelo efeito sinérgico da co-imobilização, no qual a dextranase aumenta a estabilidade da dextrana-sacarase pela remoção da camada de dextrana e modifica a conformação da enzima apresentando melhor atividade sob temperaturas maiores. Esse resultado corrobora com o obtido por outros autores em diferentes matrizes (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004; GRAEBIN et al., 2016; MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES; RODRIGUES, 2017).

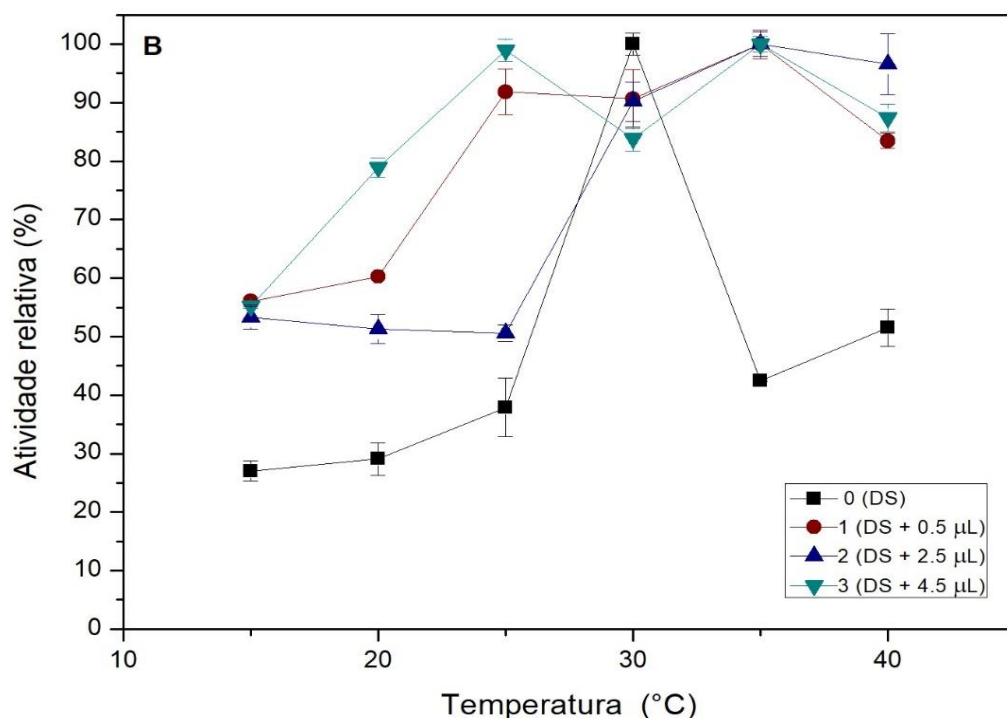
Gráfico 3 - Atividade relativa da dextrana-sacarase em função da temperatura



Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade da dextranase (Gráfico 4) apresentou um comportamento similar ao da dextransa-sacarase, aumentando a estabilidade da enzima sob maior amplitude de temperaturas. A temperatura ótima para o ensaio 0 foi 30 °C e para as co-imobilizadas (ensaios 1, 2 e 3) foi de 35 °C. Uma grande faixa de temperaturas ótimas para a dextranase pode não ser tão desejável, pois essa enzima é capaz de hidrolisar os oligossacarídeos. Entretanto, com o controle das condições de síntese dos aceptores, a dextranases pode atuar primeiramente na cadeia de dextransa para a síntese de oligossacarídeos. Em comparação com a dextransa-sacarase imobilizada (ensaio 0), a atividade da dextranase aumentou em ensaios co-imobilizados (1, 2 e 3) com valores maiores de 50%, como era esperado, pois quanto maior a carga de dextransa oferecida, mais glicose será liberada. As endodextranases hidrolisam as ligações α -(1,6) da dextransa liberando glicose, que pode ser ligada à cadeia de dextransa ou à cadeia de oligossacarídeos (ERHARDT et al., 2008).

Gráfico 4 - Atividade relativa da dextranase em função da temperatura

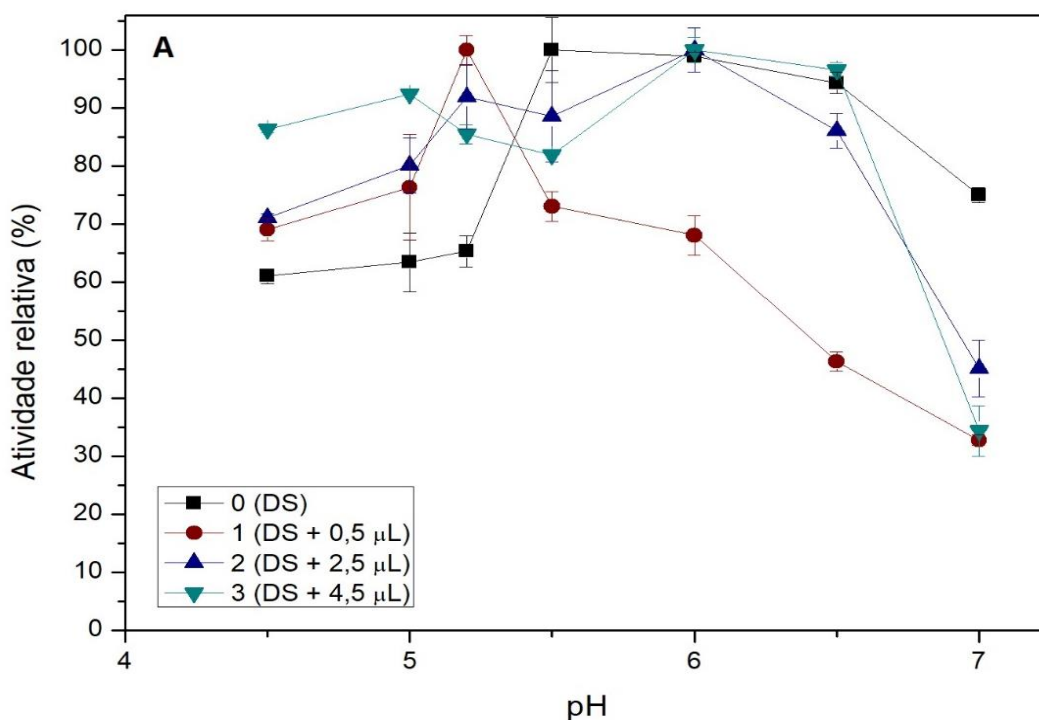


Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma das vantagens da imobilização é a maior estabilidade sob condições adversas, as quais a enzima livre não é capaz de atuar. No gráfico 5 é apresentado

um perfil da ação da dextrana-sacarase sob diferentes pH. O ensaio 0 (controle) mostra atividade maiores que 90% na faixa de pH de 5,5 a 6,5. Estes resultados sugerem que a imobilização aumenta a estabilidade da enzima. Isso é consistente com trabalhos anteriores que mostram o pH ideal de imobilização da dextrana-sacarase na faixa de 5 a 6 em cápsulas alginato e em Eupergit C 250L (GOMEZ DE SEGURA et al., 2004; MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES; RODRIGUES, 2017). Os ensaios co-imobilizados tiveram comportamento semelhante à dextrana-sacarase imobilizada (ensaio 0), com exceção do ensaio 1, que mostra uma diminuição do pH acima de 5,2. Os ensaios co-imobilizados tiveram atividade remanescente maiores que 70% a pH 4,5. Bons rendimentos em pH ácidos podem ser interessantes para aplicação de enzimas imobilizadas na produção de bebidas prebióticas (MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES; RODRIGUES, 2017).

Gráfico 5 - Atividade relativa da dextrana-sacarase em função do pH

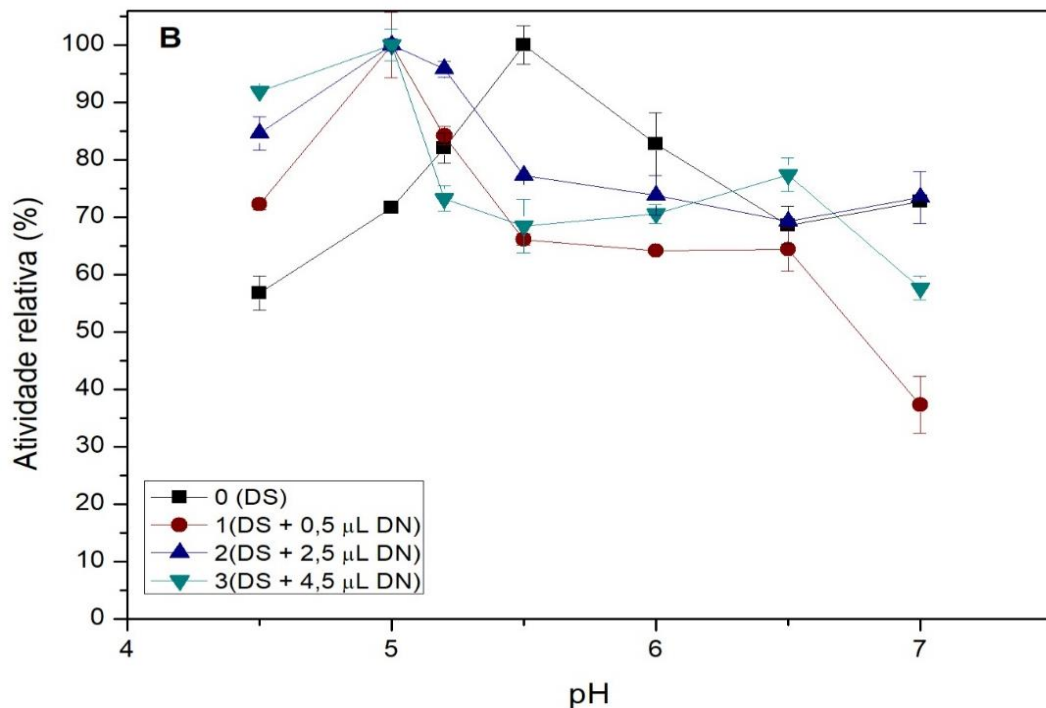


Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade relativa da dextranase (Gráfico 6) para os ensaios co-imobilizados mostraram pH ótimo de 5,0, com atividade maior que 60 % até o pH 7,0, enquanto

para a dextrana-sacarase foi em 5,5. A dextranase imobilizada na Eupergit C mantém a atividade superior a 90% na faixa de 3,5-6,5 (ASLAN; TANRISEVEN, 2007). Estas enzimas co-imobilizadas foram utilizadas em outros trabalhos científicos devido ao efeito sinérgico na produção de oligossacarídeos, que pode ser usado como ingrediente alimentar (ERHARDT et al., 2008; GOULAS et al., 2004; MOHAN RAO TINGIRIKARI; FARIA GOMES RODRIGUES, 2017).

Gráfico 6 - Atividade relativa da dextranase em função do pH



Fonte: Elaborado pelo autor.

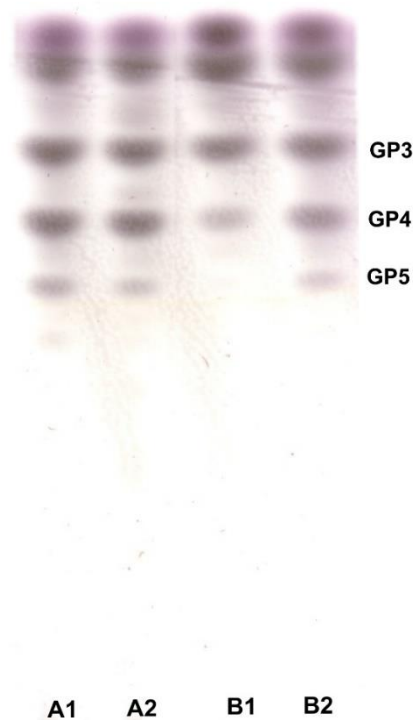
5.5 Síntese de oligossacarídeos prebióticos

A síntese foi realizada utilizando maltose como aceptor para uma melhor eficiência na produção de oligossacarídeos. Na Figura 5, a placa de CCD mostra o grau de polimerização alcançado pela síntese com as enzimas livres e co-imobilizadas. Ambas apresentaram o mesmo grau de polimerização, sendo a enzima

co-imobilizada (B2) similar à livre (A2) com produção de oligossacarídeos com até 5 graus de polimerização a 25 °C. Para a enzima immobilizada podemos concluir que a síntese a 25 °C foi mais vantajosa, pois apresentou oligossacarídeos com um grau de polimerização a mais se comparado à síntese que ocorreu a 4 °C. Isto se deve ao fato dessa temperatura ser próxima da atividade ótima da dextrana-sacarase.

Maiores graus de polimerização da cadeia de oligossacarídeos são importantes para seu uso como prebiótico pois permite que eles alcancem o colón e, assim, possam promover benefícios ao corpo humano.

Figura 5 – Oligossacarídeos detectados através de cromatografia de camada delgada



A1 e A2: enzima livre 4 °C e 25 °C, respectivamente. B1 e B2: enzimas co-imobilizadas 4 °C e 25 °C, respectivamente. GP: grau de polimerização. Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização do suporte agarose-epóxido para a co-imobilização das enzimas dextrana-sacarase e dextranase é interessante, e este biocatalisador pode ser empregado na obtenção de oligossacarídeos.

Foi possível determinar a carga máxima de enzima por grama de suporte agarose-epóxido para a co-imobilização e desenvolver um biocatalisador estável por 60 dias de armazenamento a 4°C, similar ao relatado em outros métodos de imobilização. Além disso, podemos concluir que a co-imobilização com a dextranase favoreceu o aumento de pH e de temperatura de atuação ótima da enzima dextrana-sacarase.

Demonstrou-se possível a síntese de oligossacarídeos utilizando as enzimas co-imobilizadas no suporte agarose-epóxido, resultado promissor para futuros estudos e aplicação do biocatalisador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALDE, M. et al. Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 11, p. 749–755, 1999.
- AMAN, A.; SIDDIQUI, N. N.; QADER, S. A. U. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 910–915, 2012.
- BARBOSA, O. et al. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013.
- BERENSMEIER, S. et al. Design of immobilised dextransucrase for fluidised bed application. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 255–267, 2004.
- BOLLER, T.; MEIER, C.; MENZLER, S. EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis. **Organic Process Research & Development**, p. 509–519, 2002.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.
- CHAGAS, C. M. A. et al. Dextransucrase production using cashew apple juice as substrate: Effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 3, p. 207–215, 2007.
- DA SILVA, I. M.; RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. Cashew juice containing prebiotic oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2078–2084, 2012.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, p. 1–9, 2012.
- EGGLESTON, G.; MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranses. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1881–1894, 2005.
- ERHARDT, F. A. et al. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase for the facilitated synthesis of isomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 673–683, 2008.
- ERHARDT, F. A.; JÖRDENING, H.-J. J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 4, p. 440–447, 2007.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259, 10 dez. 2004.

GIRARD, E.; LEGOY, M.-D. Activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in the presence of organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 425–432, 1999.

GOMEZ DE SEGURA, A. et al. Immobilization of Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C Supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1414–1420, 2004.

GRAEBIN, N. G. et al. Dextransucrase immobilized on activated-chitosan particles as a novel biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.

GUIDINI, C. Z. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* b-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 137–143, 2010.

GUIMARÃES, D. P. et al. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 129–139, jun. 1999.

HASHEM, A. M. et al. Immobilization of *Leuconostoc-paraesenteroides* Dextransucrase Enzyme and Characterization of its Enzyme Properties. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 8, n. 2, 2012.

HEINCKE, K. et al. Kinetics of the dextransucrase acceptor reaction with maltose — experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 229, p. 523–534, 1999.

JAVIER MORENO, F. et al. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides Evolution of the prebiotic concept. **Current Opinion in Food Science**, 2017.

KABOLI, H.; REILLY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 5, p. 1055–1069, 1980.

KARTHICK, A. S. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 1–3, p. 157–176, 2000.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes : Fundamentals and Applications. v. 69, n. 2, p. 306–325, 2005.

KOTHARI, D.; BARUAH, R.; GOYAL, A. Immobilization of glucansucrase for the production of gluco-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnology Letters**, p. 2101–2106, 2012.

MAAWIA, K. et al. Production of impure prebiotic galacto-oligosaccharides and their effect on calcium, magnesium, iron and zinc absorption in Sprague-Dawley rats. **PharmaNutrition**, v. 4, n. 4, p. 154–160, 2016.

MANRICH, A. et al. Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 455–467, 2010.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000a.

MATEO, C. et al. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000b.

MATEO, C. et al. Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959.

MOHAN RAO TINGIRIKARI, J.; FARIA GOMES, W.; RODRIGUES, S. Efficient Production of Prebiotic Gluco- oligosaccharides in Orange Juice Using Immobilized and Co-immobilized Dextranase. **Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 178, 2017.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, abr. 2007.

ÖLÇER, Z.; TANRISEVEN, A. Co-immobilization of dextranase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1645–1651, 2010.

PARLAK, M.; USTEK, D.; TANRISEVEN, A. A novel method for covalent immobilization of dextranase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 52–60, 2013.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1119–1128, 2011.

RABELO, M. C. et al. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. v. 133, p. 31–40, 2006.

RABELO, M. C. Aproveitamento do pedúnculo do caju para síntese de oligossacarídeos prebióticos. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará**, p. 103, 2008.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible Oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 6, p. 461–480, nov. 2000.

ROBYT, J. F. Thin-layer (planar) chromatography. p. 2235–2244, 2000.

ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. Production, purification, and properties of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v. 68, p. 95–111, 1979.

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

RODRIGUES, S. Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor. **Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas**, p. 250, 2003.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Effect of phosphate concentration on the production of dextranase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 1, p. 57–62, 2003.

SEO, E. S. et al. Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextranase with high concentration of sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1117–1123, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

TANRISEVEN, A.; DOĞAN, Ş. , Production of isomalto-oligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibres. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1111–1115, 2002.

VERGARA, C. M. DE A. C. Obtenção de oligossacarídeos prebióticos por processo fermentativo a partir do suco de caju clarificado. 2007.

VERGARA, C. M. DE A. C. et al. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 141–145, 2010.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.