



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

MARYLANE DE SOUSA

**OBTENÇÃO DE UM CATALISADOR INSOLÚVEL PARA A PRODUÇÃO DE D-
TAGATOSE POR L-ARABINOSE ISOMERASE**

**FORTALEZA – CE
2015**

MARYLANE DE SOUSA

OBTENÇÃO DE UM CATALISADOR INSOLÚVEL PARA A PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE POR L-ARABINOSE ISOMERASE

Tese apresentada ao Doutorado em Engenharia Química do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientação: Prof^ª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Co-orientação: Dr. Benevides Costa C. Pessela João

FORTALEZA – CE
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- S697o Sousa, Marylane de.
 Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-Tagatose por L-Arabinose
Isomerase / Marylane de Sousa. – 2015.
 139 f. : il. color. enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.
 Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
 Coorientação: Prof. Dr. João Benevides Costa C. Pessela.
1. Engenharia química. 2. Imobilização. I. Título.

MARYLANE DE SOUSA

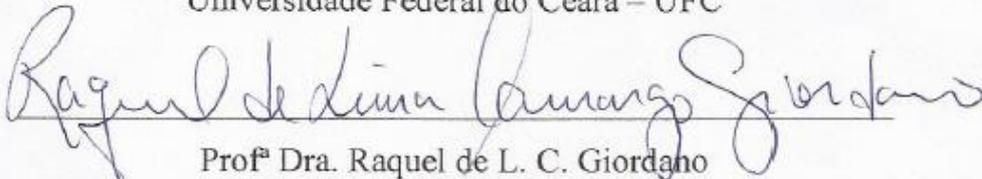
OBTENÇÃO DE UM CATALISADOR INSOLÚVEL PARA A PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE POR L-ARABINOSE ISOMERASE

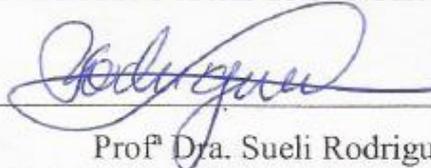
Tese apresentada ao Doutorado em Engenharia Química do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

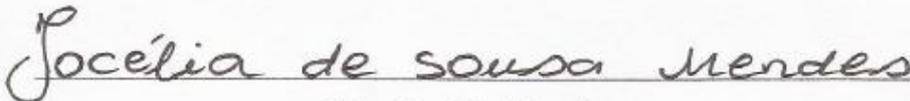
Em: 04/05/2015

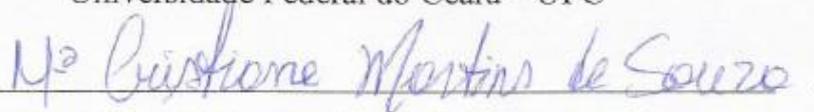
BANCA EXAMINADORA


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


Profª Dra. Raquel de L. C. Giordano
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar


Profª Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará – UFC


Dra. Jocélia Mendes
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profª Dra. Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira –UNILAB

AGRADECIMENTOS

Esta tese de doutorado foi o culminar de quatro anos de estudo árduo. Após a passagem por diversas dificuldades, principalmente com a enzima, eu posso dizer que agora estou satisfeita com o resultado final, pois só em ter resultados quantitativos da enzima de interesse, fico orgulhosa, pois a partir daqui, agora podemos fazer diversos estudos com esta enzima. Agradeço a Deus por ter me dado muita força para ter continuado com meus ideais.

Quero agradecer o grande e incondicional apoio dos meus pais, Ângela Meirice de Souza e José Dornelis de Sousa. A minha irmã Mary Elen de Sousa pela paciência e pela admiração.

A Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela qual tenho profundo respeito e admiração, agradeço pelas oportunidades que tem me proporcionado, pela colaboração, paciência e conhecimentos repassados para o meu desenvolvimento pessoal e deste trabalho.

Ao Dr. Benevides Costa Chitunda Pessela João, pela oportunidade e por toda ajuda durante os seis meses finais deste trabalho, cuja excelência profissional conferiu prestígio e valor inestimáveis, foi o momento chave para a realização de boa parte da minha tese, agradeço pelo enriquecimento pessoal e profissional.

Ao Dr. José Luis García, do Departamento de Biología Molecular do Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid, meus sinceros agradecimentos e minha profunda admiração.

Ao Dr. Enrique J. Mammarella e Ricardo Manzo, da Universidad Nacional del Litoral-Argentina, pela parceria, pelo apoio durante esta tese e pela amizade.

Ao GPbio, um obrigada a todos os integrantes que compõe o grupo, em especial as minhas amigas Anne Kamilly, Camilla Salviano, Jessyca Aline, Ticiane Cavalcante, sempre presentes que me apoiaram bastante, a Maria Cristiane por todo apoio dado no início desta pesquisa, ao Cleiton, por toda ajuda em Madrid.

A Universidade Federal do Ceará e a Universidade Autônoma de Madrid pela infra-estrutura e oportunidade concedida para a realização de um ensino de qualidade.

Enfim, a todos os professores, funcionários, amigos e colegas do Departamento de Engenharia de Alimentos, Engenharia Química, Universidad Autónoma de Madrid, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Dentro das possibilidades terapêuticas atuais para o tratamento de pacientes com problemas congênitos de metabolismo, a dieta constitui o pilar mais importante e a D-tagatose tem atraído uma grande atenção nos últimos anos devido a seus benefícios à saúde humana, bem como à semelhança de suas propriedades com a sacarose. Dentre as suas muitas aplicações, ressalta-se o potencial em auxiliar no controle de peso, uma preocupação crescente no Brasil, uma vez que a obesidade cresce a ritmos alarmantes. No entanto, a L-arabinose isomerase, enzima que catalisa isomerização de D-galactose em D-tagatose, ainda não está disponível comercialmente e, portanto, estudos visando à obtenção deste biocatalisador se fazem necessários de maneira a viabilizar a implantação do processo industrial. Portanto neste trabalho, estudou-se a obtenção da enzima L-arabinose isomerase utilizando uma cepa de *Enterococcus faecium*. A enzima produzida por fermentação foi caracterizada e imobilizada em suportes a base de quitosana. Os resultados de estabilidade térmica, operacional e de estocagem obtidos para a enzima imobilizada covalentemente sobre quitosana em meio alcalino (pH 10), confirmou a importância do controle do pH durante a imobilização, uma vez que a formação de uniões multipontuais é favorecida quando comparado ao pH 7,0. No entanto, baixas concentrações de proteína eram obtidas na etapa de fermentação, portanto, estudou-se a produção da enzima L-AI de forma heteróloga em *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes expressas foram purificadas por cromatografia de afinidade em uma única etapa, e visualizadas em SDS-PAGE. O sucesso na construção do gene e na clonagem em vetores de expressão em *E. coli* resultou em quantidade satisfatória de expressão das proteínas recombinantes, pois apresentaram-se na forma solúvel, facilmente purificadas e ativas, permitindo suas caracterizações. Por ultracentrifugação analítica foi possível descobrir que a enzima L-AI recombinante tem uma tendência para formação de estruturas com maior tamanho (oligômeros). A seguir, suportes multifuncionais foram preparados para a imobilização da L-AI e observou-se uma rápida imobilização, apresentando um elevado rendimento de imobilização, superior a 75%. Devido à baixa estabilidade térmica dos derivados, estudos futuros serão necessários para a estabilização da estrutura quaternária desta enzima.

Palavras-chave: D-tagatose, L-arabinose isomerase, D-galactose, Imobilização

ABSTRACT

Within the current therapeutic options for treatment of patients with congenital metabolic problems, diet is the most important pillar and D-tagatose has attracted great attention in recent years because of its benefits to human health and due to its similarities with sucrose. Among its many applications, it emphasizes the potential to assist in weight management, a growing concern in Brazil, since obesity is growing at alarming rates. However, L-arabinose isomerase, the enzyme that catalyses the isomerization of D-galactose into D-tagatose, is not yet commercially available and therefore studies in order to obtain this biocatalyst are necessary in order to enable the implementation of the industrial process. Therefore, in this work, the production of L-arabinose isomerase by *Enterococcus faecium* was investigated. The produced enzyme was characterized and immobilized onto chitosan. Results of thermal, operational stability and self-life obtained by using L-AI, covalently immobilized onto chitosan in an alkaline medium (pH 10), confirmed the importance of the pH during immobilization, since multipunctuality is favored compared to pH 7.0. Nevertheless, enzyme concentration after fermentation was low and, therefore, we have studied the production of heterologous enzyme in *Escherichia coli*. The expressed recombinant proteins were purified by affinity chromatography by a single step, and displayed as a single band on SDS-PAGE. The successful construction of the gene and cloning into expression vectors in *E. coli* resulted in higher amount of the recombinant proteins, which are soluble, easily purified and active, allowing their characterization. Through analytical ultracentrifugation, it was possible to find that the recombinant L-AI has a tendency to form larger structures (oligomers). Multifunctional supports were prepared to L-AI immobilization, allowing achieving high yields (more than 75%) at short contact times. Due to the low thermal stability of the immobilized enzyme, future studies will be needed to stabilize its quaternary structure.

Keywords: D-tagatose, L-arabinose isomerase, D-galactose, Immobilization

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1	O primeiro passo intracelular do catabolismo da L-arabinose que é catalisada pela enzima L-arabinose isomerase in vivo e a bioconversão de D-galactose em D-tagatose in vitro também é indicada.....	23
Figura 2.2	Imobilização de enzima em suportes heterofuncional.....	30
Figura 2.3	Imobilização reversível de enzimas sobre suportes ativados com etilenodiamina (MANAE).....	31
Figura 2.4	Estabilização de enzimas multiméricas por entrecruzamento das multi-subunidades.....	33

Capítulo 3

Figura 3.1	Influência do pH e do agente tamponante na atividade (AE) da L-arabinose isomerase.....	45
Figura 3.2	Eletroforese. 1 - Marcador de alto peso molecular; 2 – Marcador de baixo peso molecular; 3 e 4 – Duplicata do Extrato enzimático da (L-AI) concentrado; 5 e 6 – Duplicata do Extrato enzimático bruto; 7 e 8 – Duplicata do Branco inicial da imobilização em pH 10; 9 e 10 – Duplicata do Sobrenadante depois da imobilização em pH 10.....	50
Figura 3.3	Estabilidade térmica a 60 °C da (♦) L-arabinose isomerase solúvel e dos derivados ativados com glutaraldeído, com imobilização a (▲) pH 5,6; (○) pH 7,0; (□) pH 10,0, com carga oferecida de 5mg proteína.g ⁻¹ gel.....	52
Figura 3.4	Estabilidade operacional da L-arabinose isomerase imobilizada em quitosana reticulada com glutaraldeído. Atividade inicial foi definida como 100%.....	54
Figura 3.5	Estabilidade a estocagem a 4°C do (■) extrato solúvel (extrato bruto) e (○) enzima imobilizada.....	55
Figura 3.6	Isomerização da D-galactose em D-tagatose em reator batelada a 50 °C por 7h catalisada pela enzima L-AI (■) solúvel e (○) imobilizada.....	56
Figura 3.7	Ajuste ao modelo cinético de Michaelis e Menten à velocidade de isomerização catalisada por L-arabinose isomerase nativa, determinados a tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 e cofator 1 mM MnCl ₂ , a 50 °C. L-arabinose isomerase solúvel (■) e imobilizada (●). Modelo de uma cinética hiperbólica através do software Origin 8.1.....	58

Figura 3.8	Gráfico de eluição de proteínas em atividade específica durante a cromatografia em DEAE-Sepharose em modo batelada e contínuo. Eluição realizada com 1- 25 mM, 2- 50 mM, 3- 100 mM, 4- 150 mM, 5- 200 mM e 6- 300 mM, de NaCl em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0.....	59
Capítulo 4		
Figura 4.1	Fluxograma demonstrando o isolamento dos plasmídeos.....	65
Figura 4.2	Mapa do Vetor pET29a. Este plasmídeo contém uma região para resistência a Kanamicina (<i>Kan</i>), o gene <i>lacI</i> , uma origem <i>fl</i> de replicação.....	70
Figura 4.3	Mapa do Vetor pBAD/HisA aberto (INVITROGEN), onde aparecem todas modificações e o resíduo de histidinas introduzidos.....	71
Figura 4.4	Eletroforese em Agarose (0,7%) da purificação dos plasmídeos utilizados para todas as modificações presentes nesta tese. 1 é o padrão de massa molecular. 2 e 3 são os plasmídeos puros utilizados na etapa de expressão para produzir a enzima de interesse (L-AI).....	72
Figura 4.5	Imagens ao microscópio óptico de cultivos na fase exponencial das cepas de <i>E. coli</i> DH10B (A) e BL21 (DE3) (B) induzidas com L-arabinose e IPTG, respectivamente. As células cresceram a 37 °C em meio de cultivo LB.....	73
Figura 4.6	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaio de expressão dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em <i>E. coli</i> . 1 - Padrões de peso molecular; 2, 3 e 4 - Extrato transformado por pBAD/HisA em DH10B sem a presença do indutor; 5, 6 e 7 - Extrato produzido por pBAD/HisA em DH10B induzidas com 0,5% de L-arabinose; 8, 9, 10 - Extrato transformado pela cepa <i>E.coli</i> BL21 (DE3) com o plasmídeo PET 29a(+) P 209 induzidas por IPTG. As análises foram injetadas em triplicata.....	74
Figura 4.7	Efeito do pH na atividade da L-arabinose isomerase em (■) DH10B e (▨) BL21 (DE3). As reações ocorreram em tampão acetato de sódio pH 5,6, na presença de Mn ²⁺ 1mM, como descrito anteriormente.....	77

Figura 4.8	Efeito da temperatura na atividade da L-arabinose isomerase. (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As reações ocorreram em tampão acetato de sódio pH 5,6.....	78
Figura 4.9	Estabilidade da L-AI, a 60 °C. (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As reações ocorreram em tampão acetato de sódio pH 5,6.....	79
Figura 4.10	Efeito do pH na estabilidade da L-arabinose isomerase de <i>E. coli</i> (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As amostras de enzima foram incubadas em sistemas tampões de pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) a 50 mM.....	80
Figura 4.11	Síntese enzimática de D-Tagatose catalisada por L-arabinose isomerase de <i>E. coli</i> (■) DH10B e (●) BL21 (DE3) em tampão acetato de sódio pH 5,6, 1 mM de cofator Mn ⁺² : concentração de produto e conversão de substrato (D-galactose, S ₀ = 400 mM) em função do tempo de reação.....	81
Figura 4.12	Influência da concentração de substrato (D-galactose) na velocidade inicial de reação de isomerização catalisada pela L-arabinose isomerase de <i>E. coli</i> (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As linhas representam o ajuste de um modelo hiperbólico (A) e de um modelo sigmoidal (B) usando o software Origin 8.1.....	83
Capítulo 5		
Figura 5.1	Fluxograma demonstrando a ativação via epícloridrina dos géis preparados.....	87
Figura 5.2	Esquema de ativação por epícloridrina, acoplamento do agente quelante (IDA) e imobilização de íon metálico (Ni ²⁺) em matrizes poliméricas.....	88
Figura 5.3	Processo de adsorção do extrato bruto da <i>L-AI de Enterococcus faecium</i> , (DH10B e BL21), representados respectivamente A e B, sobre suportes quelato ativados com cobre (●) e níquel (■) com o mesmo grau de ativação. O processo de adsorção realizou-se a pH 7,0 e a temperatura ambiente.....	92
Figura 5.4	Dessorção da <i>L-AI de Enterococcus faecium</i> , adsorvida aos suportes quelato de níquel e cobre. As condições de reação estão descritas no item 5.3.5.1.2 de métodos. (■) Atividade relativa da L-AI. (◆) Proteínas totais dessorvidas. (A) e (B) - L-arabinose isomerase procedentes de DH10B sobre suportes quelatos com Níquel e Cobre, respectivamente. (C) e (D) - L-arabinose isomerase procedentes de BL21 sobre suportes	

	quelatos com Níquel e Cobre, respectivamente.....	94
Figura 5.5	Análise por SDS-PAGE 12% do processo de purificação da L-AI de <i>Enterococcus faecium</i> sobre suportes quelato de Níquel e Cobre. A e B - L-arabinose isomerase procedentes de <i>E. coli</i> DH10B. C e D - L-arabinose isomerase procedentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3). 1- padrão de peso molecular; 2 a 10- proteínas eluídas com concentrações crescentes de imidazol em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 (25 a 400 mM).	95
Figura 5.6	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação da L-arabinose isomerase procedentes DH10B e BL21. 1- Padrões de peso molecular; 2- Extrato bruto; 3- Adsorção da enzima L-AI em suporte quelato IDA-Níquel; 4- Adsorção da enzima L-AI em suporte quelato IDA-Cobre; 5- Dessorção da enzima L-AI do suporte IDA-Níquel, com 50 mM de Imidazol; 6- Dessorção da enzima L-AI do suporte IDA-Cobre, com 25 mM de Imidazol.....	98
Figura 5.7	Análise por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS/PAGE), a 12 %, dos derivados glioxil. 1- Padrões de peso molecular; 2- Derivado L-AI em DH10B glioxil-agarose; 3- Derivado L-AI BL21 (DE3) glioxil-agarose; 4 e 5- Subunidades das proteínas que não foram estabilizadas ao suporte glioxil, para L-AI em DH10B e L-AI em BL21 (DE3), respectivamente.....	99
Figura 5.8	Distribuições dos coeficientes de sedimentação diferencial, $c(s)$, calculados por modelo de mínimos quadrados dos dados de velocidade de sedimentação, utilizando o programa SEDFIT, determinou-se o coeficiente de sedimentação, s , o qual é diretamente proporcional à massa das partículas. Análise da velocidade de sedimentação correspondeu a $0,43 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de proteína, respectivamente para enzimas puras LAI-DH10B (A) e LAI-BL21 (B).....	101
Capítulo 6		
Figura 6.1	Influência da temperatura na estabilidade da LAI-DH10B (A) e LAI-BL21(B) imobilizadas a MANAE-agarose (■), em IDA-Ni (▲) e IDA-Ni-glioxil (●). Os derivados foram incubados a 50 °C em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.....	110

Figura 6.2	Influência da temperatura na estabilidade da LAI-DH10B (A) e (C) e LAI-BL21 (B) e (D), immobilizadas a MANAE-agarose (■), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●). Os derivados foram incubados a 60 e 70 °C em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.....	112
Figura 6.3	Efeito do pH na estabilidade da LAI-DH10B (A) e LAI-BL21(B), immobilizadas sobre MANAE-agarose (■), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●). As amostras de enzima foram incubadas em sistemas tampões de pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) a 50 mM.....	114
Figura 6.4	Influencia da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam os pontos experimentais e as retas, o ajuste do modelo de Michaelis Menten, utilizando software Origin 8.1. LAI-DH10B (A) e LAI-BL21 (B) immobilizadas sobre suportes: MANAE-agarose (■), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●).....	115

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 2.1 Propriedades bioquímicas da L-arabinose isomerase utilizando D-galactose como substrato..... 24
- Tabela 2.2 Aplicações e Benefícios à saúde da D-tagatose..... 26

Capítulo 3

- Tabela 3.1 Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em quitosana 2,5%, ativada com diferentes agentes: Glutaraldeído, Epícloridrina, Glicidol. Carga enzimática oferecida de 5mg de proteína.g⁻¹ de gel (0,084 U.g⁻¹ de gel) sendo rendimento de imobilização (RI), atividade do derivado (A_d), atividade recuperada (A_R)..... 46
- Tabela 3.2 Influência do pH nos parâmetros de imobilização de L-arabinose isomerase em quitosana ativada com 2% (m/v) de Glutaraldeído. Carga enzimática oferecida de 5mg de proteína.g⁻¹ de gel (0,149 U.g⁻¹ de gel) sendo rendimento de imobilização (RI), atividade do derivado (A_d), atividade recuperada (A_R)..... 48
- Tabela 3.3 Dessorção da L-AI imobilizada via incubação em NaCl 1M por 12 horas..... 51
- Tabela 3.4 Valores estimados para as constantes de desativação térmica K_d, tempo de meia vida e fator de estabilização em função do tipo de imobilização, aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987)..... 52

Capítulo 4

- Tabela 4.1 Composição do meio LB..... 64
- Tabela 4.2 Composição do meio TB..... 67
- Tabela 4.3 Atividade dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3), em meio LB..... 75
- Tabela 4.4 Atividade dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3), em meio TB..... 76

Capítulo 5

Tabela 5.1	Cinética de adsorção da L-arabinose isomerase procedentes de DH10B e BL21 sobre suportes quelatos com Níquel e/ou Cobre, com o mesmo grau de ativação.....	92
Tabela 5.2	Purificação da L-arabinose isomerase procedentes de DH10B e BL21 em suporte quelato de Níquel ou Cobre. Usando uma solução de imidazol (50 mM) durante a dessorção. Fator de purificação (FP) = Atividade Enzimática Específica Recuperada/ Atividade Enzimática Específica Inicial. Recuperação da atividade enzimática (RA) = Atividade Enzimática Recuperada/ Atividade Enzimática Inicial.....	97

Capítulo 6

Tabela 6.1	Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em suportes heterofuncionais (Ag-IDA-Ni-glioxil) e (MANAE). Carga enzimática oferecida de aproximadamente 15 U de enzima.g ⁻¹ de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 145 mg de proteínas totais.g ⁻¹ de suporte, sendo rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada (AR). O derivado imobilizado covalentemente foi filtrado e lavado com uma solução de EDTA 200 mM, para a retirada do metal.....	107
Tabela 6.2	Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em suportes heterofuncionais (Ag-IDA-Ni-glioxil) e reversível (MANAE). Carga enzimática oferecida de aproximadamente 24 U de enzima.g ⁻¹ de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 290 mg de proteínas totais.g ⁻¹ de suporte, sendo rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada (AR).....	109
Tabela 6.3	Parâmetros cinéticos das LAI-DH10B e LAI-BL21 imobilizadas em suportes Ag-IDA-NI, Ag-IDA-NI-glioxil e MANAE-Agarose, utilizando D-galactose como substrato. Atividade enzimática oferecida de 2 U. mL ⁻¹	116

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.	Princípios da Química Verde	22
2.2.	Caracterização da L-arabinose isomerase	22
2.3.	D-tagatose: propriedades, aplicações e processos biotecnológicos.....	25
2.4.	Purificação por cromatografia de afinidade	26
2.5.	Imobilização e estabilização de enzimas.....	28
2.5.1.	Imobilização de proteínas em suportes epóxidos multifuncionais.....	29
2.5.2.	Imobilização reversível de enzimas por adsorção iônica.....	30
2.5.3.	Estabilização da estrutura quaternária das enzimas multiméricas.....	31
2.6.	Produção de D-tagatose utilizando biocatalisador (L-AI) imobilizado	33
2.7.	Suportes para imobilização de enzimas	35
2.7.1.	Suportes a base de Quitosana e Agarose para imobilização de enzimas.....	35
3.	CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NATIVA DE <i>Enterococcus faecium</i>	38
3.1.	OBJETIVOS	38
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.2.1.	Enzima.....	38
3.2.2.	Quantificação de Proteínas.....	38
3.2.3.	Ensaio da Atividade Enzimática.....	39
3.2.4.	Preparação do gel de quitosana.....	39
3.2.5.	Ativação por Glutaraldeído.....	40
3.2.6.	Ativação por Epícloridrina.....	40
3.2.7.	Ativação por Glicidol.....	40
3.2.8.	Imobilização Enzimática.....	41
3.2.9.	Avaliação do enlace enzima-suporte.....	41
3.2.10.	Ensaio de Estabilidade Térmica da L-AI Solúvel e Imobilizada.....	41
3.2.11.	Estabilidade operacional da L-AI imobilizada.....	42
3.2.12.	Análise da Massa Molar da L-Arabinose Isomerase.....	42
3.2.13.	Condições de Bioconversão de D-galactose em D-tagatose.....	42
3.2.14.	Estabilidade de estocagem da enzima L-AI solúvel e imobilizada.....	43

3.2.15.	Estimativa dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	43
3.2.16.	Ensaio Preliminares de Purificação do Extrato Enzimático.....	43
3.2.17.	Parâmetros de imobilização.....	44
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.3.1.	Influência do pH e do Tampão na Atividade Enzimática da Enzima Solúvel	45
3.3.2.	Avaliação dos Parâmetros de Imobilização da L-Arabinose Isomerase em Quitosana.....	46
3.3.3.	Avaliação dos Parâmetros de Imobilização da L-Arabinose Isomerase em Quitosana Ativada com Glutaraldeído.....	48
3.3.4.	Análise da Massa Molar pela Análise de Eletroforese.....	49
3.3.5.	Avaliação do enlace enzima-suporte ativado por glutaraldeído.....	51
3.3.6.	A estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada em quitosana.....	51
3.3.7.	A estabilidade operacional do derivado de quitosana.....	53
3.3.8.	Estabilidade à Estocagem em geladeira.....	54
3.3.9.	Conversões em Tagatose utilizando enzima livre e imobilizada em reator Batelada.....	55
3.3.10.	Estimativa das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$	57
3.3.11.	Estudo de purificação preliminar do Extrato Enzimático bruto da L- arabinose isomerase.....	59
3.4.	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	60
4.	CLONAGEM, FERMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L-ARABINOSE ISOMERASE DE <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	62
4.1.	OBJETIVOS	62
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.2.1.	Plasmídeo.....	63
4.2.2.	Enzima.....	63
4.2.3.	Preparação das cepas DH10B e BL21 (DE3) competentes.....	64
4.2.4.	Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH10B e BL21 (DE3) competentes com os plasmídeos correspondentes.....	64
4.2.5.	Análise e isolamento dos plasmídeos pBAD His-A-A-236 e PET 29a(+) P209 ARA.....	65

4.2.6.	Expressão.....	66
4.2.7.	Ensaio de expressão para aumentar a biomassa e a concentração de enzima de interesse.....	66
4.2.8.	Ensaio de atividade enzimática.....	67
4.2.9.	Quantificação de Proteínas.....	67
4.2.10.	Análise da Massa Molar da L-Arabinose Isomerase.....	68
4.2.11.	Caracterização cinética da proteína produzida.....	68
4.2.11.1.	Influência do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	68
4.2.11.2.	Estabilidade frente ao pH e temperatura para a L-AI.....	68
4.2.12.	Estimativa das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$	69
4.2.13.	Rendimento de Bioconversão de D-galactose em D-tagatose.....	69
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.3.1.	Construção do plasmídeo para produzir a proteína L-arabinose isomerase	69
4.3.2.	Fermentação e extração da proteína de interesse (L-AI).....	73
4.3.3.	Ensaio de expressão da proteína recombinante utilizando um meio mais rico em nutrientes a fim de aumentar a concentração da enzima de interesse	75
4.3.4.	Caracterização e Propriedades bioquímicas da enzima L-AI.....	76
4.3.4.1.	Estudo da Atividade da L-arabinose isomerase frente ao pH.....	76
4.3.4.2.	Estudo da Atividade da L-arabinose isomerase frente à temperatura.....	78
4.3.4.3.	Estabilidade térmica e pH da enzima solúvel.....	78
4.3.4.4.	Rendimento de Bioconversão de D-galactose em D-tagatose utilizando L-arabinose isomerase.....	80
4.3.4.5.	Influência da concentração de substrato (D-galactose) na velocidade inicial de reação de isomerização catalisada pela L-arabinose isomerase.....	82
4.4.	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	83
5.	PURIFICAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE DE <i>Enterococcus faecium</i>	86
5.1.	OBJETIVOS	86
5.2.	MATERIAS E MÉTODOS.....	86
5.2.1.	Materiais.....	86
5.2.2.	Preparação do extrato protéico.....	86
5.2.3.	Ativação do suporte para formação de agarose-epóxido	87
5.2.4.	Preparação dos suportes Quelato-Epóxido.....	87

5.2.4.1.	Suporte Iminodiacético (IDA) Epóxido (Agarose-IDA).....	88
5.2.4.2.	Suporte IDA-Cu-epóxido e IDA-Ni-epóxido.....	88
5.2.5.	Purificação da proteína por cromatografia de afinidade.....	89
5.2.5.1.	Adsorção.....	89
5.2.5.2.	Dessorção.....	89
5.2.6.	Determinações do tamanho e da forma da proteína L-AI por ensaios em ultracentrífuga analítica.....	90
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.3.1.	Purificação da L-AI de <i>Enterococcus faecium</i> através de cromatografia de afinidade sobre quelatos metálicos.....	91
5.3.1.1.	Adsorção.....	91
5.3.1.2.	Dessorção.....	93
5.3.2.	Influência de uma pré-lavagem seletiva com 15 mM de imidazol na purificação da L-AI de <i>Enterococcus faecium</i>	96
5.3.3.	Estudos de interação da proteína com suportes glioxil para analisar possíveis presenças de multímeros da proteína.....	98
5.3.4.	Ultracentrifugação analítica.....	100
5.4.	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	102
6.	IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE DE <i>Enterococcus faecium</i>	104
6.1.	OBJETIVOS	104
6.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	104
6.2.1.	Preparação de suportes multifuncionais a base de agarose.....	104
6.2.1.1.	Suportes IDA-Metal.....	105
6.2.1.2.	Suportes MANAE- agarose.....	105
6.2.2.	Imobilização covalente multipontual.....	105
6.2.3.	Imobilização enzimática em suporte MANAE.....	106
6.2.4.	Parâmetros de imobilização.....	106
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
6.3.1.	Imobilização em suportes Quelato epóxido Agarose.....	106
6.3.2.	Estabilidade frente à temperatura da enzima L-AI imobilizada em diferentes suportes.....	110
6.3.3.	Estabilidade frente ao pH da L-AI imobilizada sobre suportes de agarose.....	113

6.3.4.	Estudo dos parâmetros cinéticos da L-Arabinose Isomerase imobilizada.....	114
6.4.	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	117
7.	CONCLUSÃO.....	119
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	121
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
	ANEXO A.....	138
	ANEXO B.....	139

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Dentro das possibilidades terapêuticas atuais para o tratamento de pacientes com problemas congênitos de metabolismo, a dieta constitui o pilar mais importante. Existe uma variedade diversificada de adoçantes, que têm sido desenvolvidos com reduzida caloria para substituir o açúcar (sacarose) em alimentos. No entanto, ainda não foi produzido um adoçante que seja ideal, com propriedades similares às da sacarose, em termos de doçura, sabor, cor e odor. Um dos candidatos promissores é a D-tagatose, uma cetohexose natural, classificada como GRAS - Generally Recognized as Safe, uma substância reconhecida como segura (Hong *et al.*, 2007). A D-tagatose tem grande potencial para uso como um substituto do açúcar (sacarose) em alimentos, de sabor e propriedades edulcorantes semelhantes, com menor valor calórico, uma vez que é pouco degradada pelo corpo humano tornando-o um agente anti-hiperglicemiante, possui potenciais aplicações em muitos produtos em que a sacarose é utilizada, por exemplo, em doces, sorvetes, refrigerantes (Hong *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 1995; Livesey e Brown, 1996; Mazur, 1989). No entanto, devido ao seu custo, o uso deste açúcar é limitado.

Há relatos da produção de D-tagatose desenvolvida comercialmente por Arla Foods, uma empresa dinamarquesa, que apostou no mercado do adoçante funcional, que não tem efeito glicêmico, aprovado para venda nos EUA e é esperado para ser aprovado em outros mercados também, obtido através de processo químico (Beadle *et al.*, 1992; Arla Foods, 2003). No método químico, a D-tagatose é produzida a partir de D-galactose utilizando um catalisador de cálcio, porém este processo químico tem algumas desvantagens, tais como: complexas etapas de purificação, a separação do produto é à base de ácido, formação de resíduos químicos e formação de subprodutos (Cheetham e Wootton, 1993), logo um processo biológico é preferível por razões ambientais.

Assim, a produção bioquímica de D-tagatose a partir de D-galactose usando L-arabinose isomerase (L-AI) tem sido estudada intensivamente nos últimos anos (Torres *et al.*, 2014; Men *et al.*, 2014; Hung *et al.*, 2014). A biotransformação, através da síntese enzimática, é cada vez mais interessante como um processo industrial (Gonçalves *et al.*, 2000) e tem algumas vantagens sobre o processo químico, como condições reacionais brandas, ausência de subprodutos, ausência de sal na água residual e possibilidade de recirculação, durante a purificação, da D-galactose não reagida. Entre os biocatalisadores, a enzima L-arabinose isomerase, que catalisa a conversão de D-galactose para D-tagatose, tem sido a mais estudada

devido à viabilidade industrial deste bioprocesso, uma vez que utiliza galactose como substrato (Oh, 2007; Zang *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2014; Prabhu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Rhimi *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012). Segundo Liang *et al.*, 2012, a reação de conversão atinge um equilíbrio em aproximadamente 20 h de reação enzimática, obtendo 198 mM (35,6 g.L⁻¹) de D-tagatose, o que corresponde a um rendimento de 39,5%, a partir de 500 mM de solução de D-galactose (90 g.L⁻¹).

No entanto, a rota enzimática ainda apresenta gargalos que precisam ser vencidos, como por exemplo, a baixa concentração de proteína na etapa de fermentação usando cepas nativas (Lima *et al.*, 2013; Brígida *et al.*, 2014), baixa produtividade na reação de isomerização (rendimento de conversão) e reduzida termoestabilidade da enzima (Lee *et al.*, 2004; 2005a; b). Segundo Rodrigues (2009), as enzimas não são plenamente utilizadas em escala industrial devido à instabilidade de suas estruturas ocasionada, principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em aplicações em condições desnaturantes (pH e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos). Neste contexto, buscou-se abordar alguns destes aspectos. Inicialmente, estudou-se a imobilização da enzima nativa de *Enterococcus faecium* em suportes a base de quitosana. Posteriormente, realizou-se uma clonagem que permitiu expressar, em *Escherichia coli*, o gene que codifica a enzima L-AI, fusionada a seis resíduos de histidina nas extremidades amino e carboxi terminal, o que facilitou a purificação por técnicas de cromatografia de afinidade, com resinas de agarose combinadas com metal. A seguir, a L-AI recombinante foi imobilizada em suportes multifuncionais a base de agarose, para a produção de D-tagatose. Com a imobilização é possível o reuso de enzimas caras, facilita o processo de separação, como também, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada (Villeneuve *et al.*, 2000).

A partir deste estudo, busca-se a obtenção de um biocatalisador (L-AI) que possa ser usado na produção de D-Tagatose por rota enzimática, a partir da isomerização da D-galactose utilizando a L-arabinose isomerase. Inicialmente, avaliaram-se as características da enzima nativa na forma solúvel e imobilizada em quitosana, tais como: massa molar, atividade enzimática, bem como capacidade catalítica de conversão de D-galactose em produto. Em seguida, foi realizada a expressão da enzima em *E. coli* e avaliou-se a enzima recombinante (na forma livre e imobilizada em agarose).

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo trata de uma breve teoria sobre propriedades enzimáticas, com foco sobre a enzima de interesse (L-arabinose isomerase) seguida por sua caracterização, comparação entre a isomerização química e a enzimática, propriedades, aplicações e processos biotecnológicos do produto (D-tagatose). Finalizando, serão apresentadas as características importantes dos suportes e imobilização.

2.1. Princípios da química verde

Há uma necessidade de preservação do meio ambiente, utilizando práticas menos agressivas, redução de resíduos e utilização de matérias-primas de fontes renováveis. A biocatálise é uma tecnologia que se tornou uma parte central da química verde, pois as enzimas são de alta especificidade, biodegradáveis, em prol do desenvolvimento sustentável (Chen e Kazlauskas *et al.*, 2011).

Química verde, química ambiental ou química para o desenvolvimento sustentável tem como objetivo final conduzir as ações científicas e/ou processos industriais ecologicamente corretos. Os processos enzimáticos podem ser inseridos nos princípios (prevenção, síntese de produtos menos perigosos, desenhos de produtos seguros, etc) da química verde, visto que as enzimas são biocatalisadores seguros, são altamente seletivas, que possibilitam condições brandas de operação, reduzindo a demanda energética do processo, são seguros, de baixa ou nenhuma toxicidade e vastamente aplicados na utilização de fontes renováveis de matérias-primas (Química Verde no Brasil 2010–2030, 2010).

2.2. Caracterização da L-arabinose isomerase

As isomerases são cada vez mais importantes na síntese comercial de açúcares raros (Zhang *et al.*, 2009). A maioria das L-arabinose isomerases são metaloproteínas envolvendo uma concentração relativamente alta (1 a 5 mM) de íons metálicos, Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , sendo o Mn^{2+} o metal que possui um maior efeito sobre a produção de D-tagatose seguido do Co^{2+} , visto através da atividade e estabilidade térmica (Jung *et al.*, 2005; Rhimi e Bejar, 2006; Manzo *et al.*, 2012). Desta forma, os cofatores mais comuns para a enzima L-AI tem sido Mn^{2+} e Co^{2+} (Tabela 2.1).

A L-arabinose isomerase converte a galactose em tagatose, assim como arabinose em ribulose, devido os substratos possuírem configurações semelhantes (Oh, 2007). A L-arabinose isomerase (L-AI) é uma enzima intracelular que catalisa a isomerização reversível de L-arabinose para L-ribulose, que são açúcares via pentoses-fosfato convertendo arabinose em ribulose, in vivo. Esta enzima também é conhecida como, D-galactose isomerase, devido à sua capacidade de isomerizar D-galactose em D-tagatose, in vitro. (Cheetham and Wootton, 1993; Roh *et al.*, 2000a), Figura 2.1.

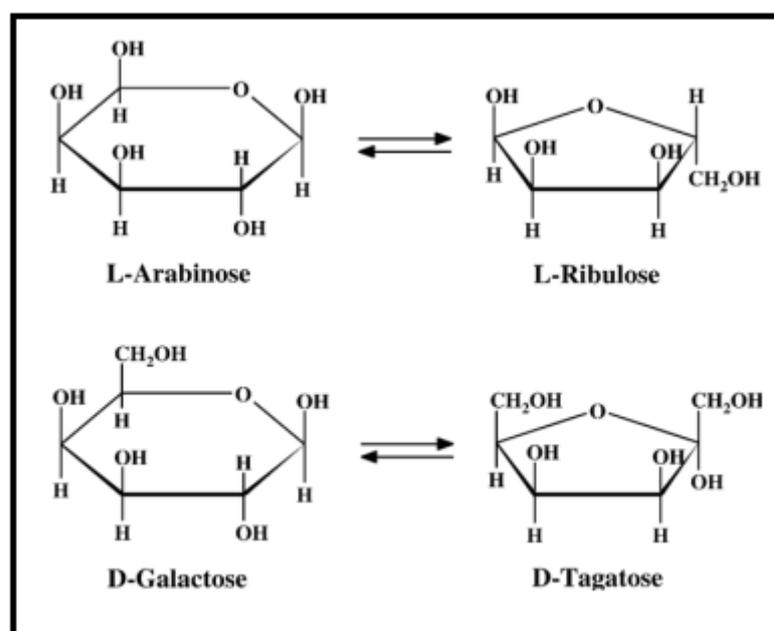


Figura 2.1. O primeiro passo intracelular do catabolismo da L-arabinose in vivo e a bioconversão de D-galactose em D-tagatose in vitro. Fonte: Kim, 2004.

A L-arabinose isomerase ainda não está disponível comercialmente e, portanto, estudos visando à obtenção deste biocatalisador se fazem necessários de maneira a viabilizar a implantação do processo industrial. Diferentes micro-organismos são descritos na literatura como produtores de L-arabinose isomerase, dentre os quais destacamos cepas de *Lactobacillus* (Xu *et al.*, 2011; Rhimi *et al.*, 2010; Zang *et al.*, 2007), *Bacillus* (Prabhu *et al.*, 2010; Zang *et al.*, 2009; Zang *et al.*, 2011; Roh *et al.*, 2000b) e *Geobacillus* (Kim *et al.*, 2005), *Enterococcus* (Torres *et al.*, 2014).

A Tabela 2.1 apresentam os micro-organismos utilizados como fontes dos genes da L-AI para a recombinação, as condições operacionais de pH, temperatura, afinidade da L-AI com o substrato D-galactose e o cofator, na atividade enzimática da enzima.

Tabela 2.1. Propriedades bioquímicas da L-arabinose isomerase utilizando D-galactose como substrato.

Fonte da enzima	T ótima (°C)	pH ótimo	K _m (mM)	Íon metálico	Referência
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	60	8,0	145	Mn ²⁺	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	65	8,0	578	Co ²⁺	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	70	8,5	408	Mn ²⁺	Kim e Oh, 2005
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	65	8,0	120	Mn ²⁺	Jorgensen <i>et al.</i> , 2004
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	70	5,5-9,0	117	Mn ²⁺	Lee <i>et al.</i> , 2005a
<i>Bacillus halodurans</i>	50	7,5-8,0	167	Mn ²⁺	Lee <i>et al.</i> , 2005a
<i>Aerobacter aerogenes</i>	50	6,4-6,9	270	Mn ²⁺	Yamanaka and Wood, 1966
<i>Thermotoga maritima</i>	90	7,0-7,5	60	Co ²⁺	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus gayonii</i>	30-40	6,0-7,0	-	Mn ²⁺	Nakamatu and Yamanaka, 1969
<i>Bacillus stearothermophilus US100</i>	80	7,5 - 8,0	57	Mn ²⁺ e Co ²⁺	Rhimi <i>et al.</i> , 2006
<i>T. neapolitana</i>	85	7,0	250	Mn ²⁺ e Co ²⁺	Kim <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus pentosus</i>	60	5,5 - 7,0	1110	Mn ²⁺	Ibrahim e Spradlin, 2000

Há alguns estudos que utilizam bactérias em sua forma nativa para a produção da L-AI, com destaque para espécies do gênero *Lactobacillus* (Chakravorty, 1964; Nakamatu e

Yamanaka, 1969; Cheetham e Wootton, 1993; Zhang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012). A maioria dos trabalhos para a produção da L-AI utilizam micro-organismos recombinados, utilizando principalmente a *E. coli* como bactéria hospedeira (Oh *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Jørgensen *et al.*, 2004; Manjasetty *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Rhimi *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012).

Os parâmetros cinéticos da L-arabinose isomerase variam de acordo com a origem da enzima. Há muitos relatos na literatura que afirmam uma maior especificidade para o substrato L-arabinose do que D-galactose (Xu *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Rhimi e Bejar, 2006; Takata *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Rhimi *et al.*, 2011; Salonen *et al.*, 2012).

2.3. D-tagatose: propriedades, aplicações e processos biotecnológicos

A D-tagatose não contribuiu para o ganho de peso e testes clínicos em humanos mostraram que indivíduos perderam peso de forma gradual e consistente (Levin, 2002). Este fato torna a D-tagatose um açúcar que pode auxiliar no controle de peso, uma preocupação crescente no Brasil, uma vez que a obesidade cresce em ritmo alarmante.

A D-tagatose é uma substância edulcorante, não carcinogênica e de baixo valor calórico, indicada para diabéticos. Constitui de um isômero da D-galactose, possui uma forma cíclica constituída por α -D-tagato-2,6-piranosose (79%), β -D-tagato-2,6-piranosose (14%), α -D-tagato-2,5-furanose (2%) e β -D-tagato-2,6-furanose (5%) (Freimund e Köpper, 2004). Com poder de doçura, 92%, próximo ao da sacarose, a D-Tagatose apresenta como vantagem seu baixo valor calórico, 1,5 Kcal.g⁻¹ aproximadamente, fato pelo qual seu uso iniciou-se, indicado para redução de peso (Levin *et al.*, 1995; Levin, 2002; Lu *et al.*, 2008).

Os primeiros relatos para produção da tagatose foram investigados por Izumori *et al.*, (1984). Os autores relataram que a tagatose foi produzida a partir de vários micro-organismos por oxidação de galactitol (única fonte de carbono) (Rollini e Manzoni 2005). Esses micro-organismos foram *Arthrobacter*, *Mycobacterium* e *Enterobacter*, que possuem atividade a galactitol desidrogenase. A produção máxima por este método foi relatado de 18,4 g.L⁻¹ de tagatose a partir de 20 g.L⁻¹ de galactitol (92% de rendimento). Porém, o custo para D-sorbose ou galactitol como substrato é relativamente elevado (US \$500–800/kg), este processo não é considerado para grandes quantidades da produção de tagatose (Kim, 2004; Oh, 2007).

A produção de D-tagatose pode ser produzida também, a partir de D-galactose por meio de um método químico utilizando um catalisador de cálcio (Beadle *et al.*, 1991), mas o processo químico apresenta algumas desvantagens, como etapas de purificação complexas, formação de resíduos químicos e formação de subprodutos. Assim, vem se buscando métodos biológicos para produção de D-tagatose através da isomerização de D-galactose por meio da L-arabinose isomerase, também conhecida como D-galactose isomerase (Rhimi *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011; Roh *et al.*, 2000b; Hong *et al.*, 2007; Jorgensen *et al.*, 2004). Em virtude de sua seletividade, as enzimas reduzem a necessidade da etapa de purificação do produto final, diminuindo, assim, a demanda de energia e o impacto ambiental (Aragon, 2013).

Tabela 2.2. Aplicações e Benefícios à saúde da D-tagatose. Fonte: Oh, 2007.

Benefícios à saúde	Aplicações/produtos alimentícios
Baixo valor calórico	Refrigerantes, cereais, barras energéticas, dietas com baixo teor de carboidratos
Nenhum efeito glicêmico	Alimentos dietéticos (diabetes tipo 2)
Anti-halitose	Suplementos alimentares
Prebiótico	Chocolates, balas e chicletes
Anti-Biofilme, anti-placa	Pasta de dentes, anti-sépticos bucais
Realçador de sabor	Iogurtes, pães, bebidas lácteas, confeitaria

2.4. Purificação por cromatografia de afinidade

O uso de enzimas em nível industrial é simplificado se as enzimas estiverem de forma purificada, por diversas razões: a velocidade de reação catalítica aumenta, quando se consegue imobilizar uma maior quantidade da proteína de interesse por unidade de volume do catalisador; reduzem-se os riscos de liberação de proteínas ou subunidades das mesmas, que podem ser prejudiciais a saúde do consumidor no produto final; evita-se também, a presença de proteínas inespecíficas no produto final. No entanto, os protocolos de purificação convencionais envolvem, tipicamente, muitos estágios e etapas, e oferecem relativamente baixos rendimentos, poucas enzimas puras têm um custo final adequado para o uso industrial. Neste contexto, as técnicas de cromatografia de afinidade são de interesse particular, pois a princípio, permitem a purificação da enzima de interesse, em um único passo (Pessela, 2002).

Os fundamentos iniciais de estudo da afinidade de biomoléculas por íons metálicos foram demonstrados por Everson e Parker (1974), que relataram que os principais responsáveis pela adsorção das proteínas em resinas contendo quelantes imobilizados são os íons metálicos, separando desta forma este tipo de proteína. Enquanto Porath *et al.* (1975) popularizou o tema, com um trabalho publicado sobre cromatografia de afinidade a quelato metálicos, quando introduziram o termo cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography – IMAC). Uma estratégia empregada para a purificação das proteínas recombinantes, contendo em um dos extremos resíduos de 6-histidinas, é a utilização da cromatografia de afinidade em suportes com metais imobilizados. Os íons metálicos são imobilizados pelo uso de um agente quelante capaz de disponibilizar o metal para ligação às 6-His da proteína de interesse. As histidinas apresentam uma alta especificidade de ligação pelo metal no suporte, portanto para este tipo de proteínas, estas podem ser seletivamente eluídas do suporte carregado com íons metálicos e, conseqüentemente, isoladas por este método (Caruso, 2007).

Segundo Bresolin *et al.* (2009) proteínas ou outros solutos são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados, havendo também a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, sendo que nem sempre é possível determinar suas contribuições relativas. As biomoléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, o imidazol). Posteriormente, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de agentes competidores fortes, como o EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), sem que haja perda da capacidade da matriz do suporte, ou seja, ela pode ser carregada novamente (com o mesmo íon metálico ou outro). Portanto, o ligante deve formar um complexo reversível com a enzima a ser purificada, de tal forma que este complexo seja resistente, porém facilmente desfeito, sem precisar de condições desnaturantes. Uma das matrizes mais utilizadas é a agarose (Armisen, 1997).

Desta maneira, proteínas que tenham em sua superfície resíduos de His (poliHis) com diferentes densidades e distribuição, irá interagir em diferentes intensidades com a resina acoplada com o metal. Portanto, ocorre a adsorção seletiva da proteína, como a dessorção controlada com concentrações crescentes de um agente competitivo, como o imidazol, separando as proteínas retidas com diferentes graus de afinidade ao suporte IMAC

(Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography) (Porath *et al.* 1975; Pessela, 2002; Bresolin *et al.* 2009).

2.5. Imobilização e estabilização de enzimas

A imobilização possibilita o reuso de enzimas de alto valor, facilita o processo de separação, como também, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada (Villeneuve *et al.*, 2000). Portanto, muitas técnicas de imobilização foram desenvolvidas, como: imobilização covalente, adsorção, ligação iônica, aprisionamento, encapsulação, dentre outras técnicas (Bullock, 1989; Royer, 1980).

Segundo Pessela (2002), apesar da grande evolução de métodos de imobilização, ainda não há metodologias gerais para imobilização em qualquer sólido e para qualquer enzima, que utilize de uma forma rápida, simples e qualitativa, ou seja, apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. As propriedades de uma enzima imobilizada podem variar no que diz respeito à sua correspondente solúvel, principalmente em parâmetros cinéticos, tais como K_m e $V_{máx}$, e a causa destas alterações pode ser devido a diversos fatores, que podem afetar diretamente na atividade biocatalítica, tais como:

- Efeitos de conformação - a ação das enzimas depende da estrutura molecular da mesma, o fato da imobilização pode conduzir a alterações conformacionais, que refletem na atividade enzimática.
- Efeitos estéricos - a ligação da enzima ao suporte ou aprisionamento dos mesmos pode impedir o acesso do substrato ao sítio ativo na enzima, como consequência da orientação que a enzima adquire após a imobilização, ou seja, uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível.
- Efeitos do micro-ambiente - a presença do suporte pode alterar o microambiente da enzima com respeito à enzima solúvel, ocorre quando a enzima é imobilizada em suporte com carga positiva ou negativa, o campo elétrico gerado pelo suporte ao redor da enzima irá tender a dividir o ambiente, este fato pode refletir no comportamento cinético da enzima imobilizada a um suporte carregado, diferindo daquele apresentado pela enzima solúvel.
- Efeitos difusionais ou de transferência de massa - o acesso à enzima imobilizada apresenta duas barreiras de difusão: uma externa, causada pela interface entre o

suporte e o fluido, e uma barreira interna no interior da matriz, a que está ligada a enzima, ocorre mais com enzimas imobilizadas por encapsulamento ou aprisionamento. Têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação.

Todos esses fatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada, que podem adquirir novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamento diferente, em relação à temperatura (Markoglou *et al.*, 2003).

Neste contexto, nesta tese, duas estratégias de imobilização serão discutidas: a imobilização covalente e a imobilização reversível da enzima (L-AI) sobre suportes pré-existentes.

2.5.1. Imobilização de proteínas em suportes epóxidos multifuncionais

Em geral, os suportes epóxidos multifuncionais devem conter dois tipos de grupos funcionais, primeiro, os grupos que promovem a adsorção física das proteínas aos quelato metálicos previamente imobilizados, segundo, outros grupos (grupos epóxido) que realizam a imobilização covalente da enzima. Desta forma, as enzimas se adsorvem primeiro fisicamente sobre o suporte e posteriormente se obterá a formação de ligações covalentes entre os grupos nucleofílicos da proteína ($-NH_2$, $-SH$, $-OH$) e os grupos epóxido da superfície do suporte (Mateo *et al.*, 2000b), ou seja, o mecanismo de imobilização de proteínas sobre suportes epóxidos segue por dois passos. Como os grupos epóxidos são pouco reativos para imobilização de enzimas solúveis, primeiramente realiza-se a adsorção física das proteínas ao suporte e posteriormente, com a proximidade dos grupos reativos da proteína ao suporte, realiza-se a imobilização covalente (Mateo *et al.*, 2000 e Mateo *et al.*, 2007), Figura 2.2.

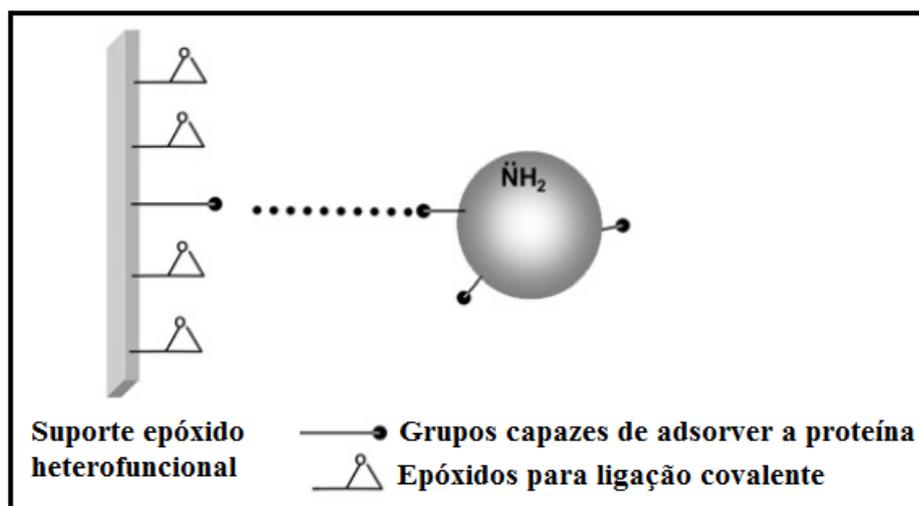


Figura 2.2. Imobilização de enzima em suportes heterofuncional. Fonte: Mateo *et al.*, 2007.

A preparação de diferentes suportes epóxidos modificados parcialmente também foi estudada para este trabalho. A enzima foi imobilizada nos diferentes suportes epóxidos (suporte epóxido-iminodiacético-quelato de Cobre ou Níquel). Portanto, a enzima de interesse adsorve-se aos suportes por diferentes meios, por uma zona de maiores cargas positivas ou negativas, por zonas com maior densidade de Histidinas, etc, permitindo a orientação da enzima sobre o suporte, antes da imobilização covalente. Obtendo-se derivados com diferentes propriedades.

2.5.2. Imobilização reversível de enzimas por adsorção iônica

Segundo Pessela (2002), a imobilização iônica de enzimas a suportes ativados com grupos iônicos tem sido um dos primeiros métodos de imobilização de enzimas aplicados em nível industrial (Figura 2.3). Mateo *et al.* (1999) concluíram que a otimização deste suporte e a força de união das proteínas sobre o suporte, foi muito superior a que se consegue com suportes convencionais (Agarose-epóxido). Este método de imobilização possui vantagens frente os métodos covalentes, a principal vantagem é a possibilidade de recuperação do suporte quando na inativação da proteína, baixo custo, simplicidade do método, rápida imobilização, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, por sua flexibilidade, de forma que o suporte se adapta a estrutura da enzima, em vez de forçar a enzima a adaptar-se ao suporte, originando uma adsorção muito forte que conduz à obtenção de derivados imobilizados e

estabilizados com significativas atividades enzimáticas. Como desvantagem, neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio (Weetall, 1975).

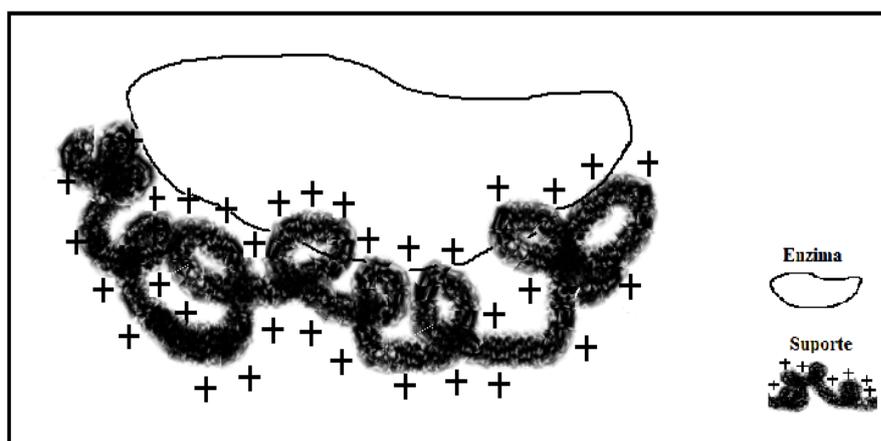


Figura 2.3. Immobilização reversível de enzimas sobre suportes ativados com etilenodiamina (MANAE).

2.5.3. Estabilização da estrutura quaternária das enzimas multiméricas

A utilização de enzimas na forma solúvel tem como principal desvantagem a baixa estabilidade do catalisador industrial. A inativação enzimática segue um caminho reacional que inclui dissociação de subunidades de enzimas multiméricas, desnaturação de estruturas secundárias ou terciárias, agregação e coagulação. Geralmente, enzimas multiméricas são naturalmente mais estáveis comparadas com as monoméricas, devido sua maior rigidez, proveniente da associação de suas subunidades, com boas propriedades (Almeida, 2011). No entanto, as proteínas multiméricas são enzimas muito complexas (Almeida, 2011; Pessela *et al.*, 2007; Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Vieira, 2009; Cardoso *et al.*, 2009) cujo centro ativo pode ser determinado pela exata união das suas subunidades. Desta forma, seria interessante imobilizar estas enzimas utilizando diferentes protocolos, envolvendo diferentes regiões da proteína, a imobilização pode produzir pequenas distorções sobre a associação das subunidades, alterando a forma do centro ativo e produzindo enzimas imobilizadas com propriedades distintas (Pessela *et al.*, 2007).

A inativação deste tipo de enzima pode ser fortemente influenciadas a alguma dissociação de suas subunidades (Pessela *et al.*, 2008), já que o monómero associado

apresenta uma certa estabilização pela soma das interações multipontuais que estabilizam a estrutura multimérica (Pessela, 2002).

Então, para estabilizar este tipo de enzima são necessários estudos que possibilitem a união de todas as subunidades de forma que não ocorra a dissociação das mesmas. Caso contrário, mudanças conformacionais promovidas, pelo calor, pH e agentes oxidantes sobre os monômeros podem ser rápidas e intensas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Pessela, 2002). Segundo Vieira (2009), em muitos casos, existem cátions presentes na associação da estrutura multimérica das enzimas, os quais podem nem ser essenciais para a atividade desta enzima, mas podem ser muito importantes para a sua estabilidade. Portanto, dependendo da dissociação do complexo enzima-íon, a diluição das enzimas pode ocasionar uma redução na estabilidade das mesmas, mesmo que todas as subunidades estejam ligadas covalentemente ao suporte, pois pode ocorrer a diluição do cátion.

Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas imobilizadas. A imobilização multipontual também pode favorecer a estabilização de enzimas multiméricas, promovendo o aumento da rigidez da molécula da enzima tornando-a mais resistente a mudanças conformacionais, o processo quando bem controlado poderá prevenir a inativação da enzima, não ocorrendo a dissociação de suas subunidades (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Kaddour *et al.*, 2008; Pessela *et al.*, 2008). No entanto, existem casos em que a união simultânea de todas as subunidades da enzima ao suporte possa ser muito difícil devido problemas geométricos. Fernández-Lafuente *et al.* (1999), propuseram que após uma intensa imobilização covalente multipontual, os derivados fossem reticulados com polímeros polifuncionais, como apresentado no esquema a seguir, Figura 2.4.

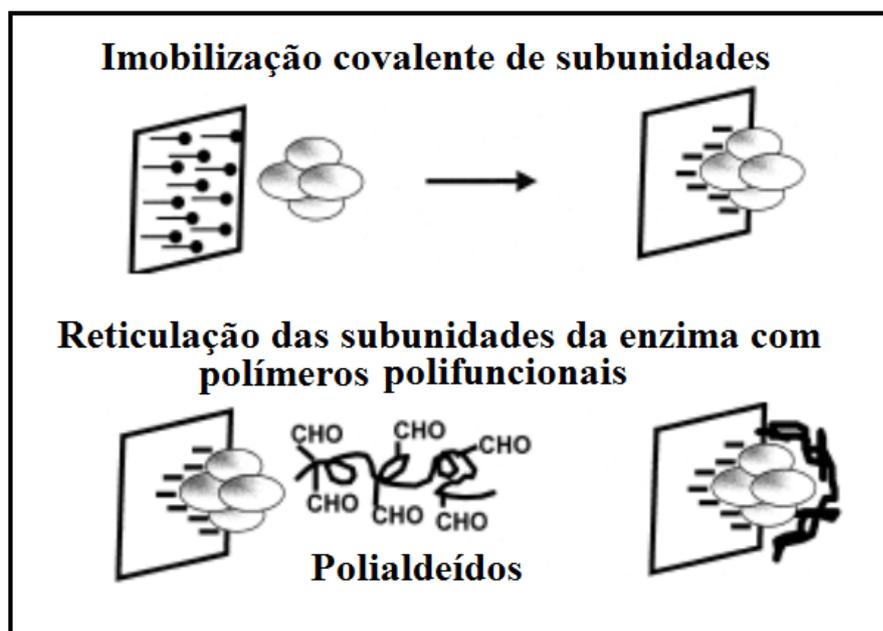


Figura 2.4. Estabilização de enzimas multiméricas por entrecruzamento das multisubunidades. Fonte: Pessela, 2002.

2.6. Produção de D-tagatose utilizando biocatalisador (L-AI) imobilizado

A imobilização da L-AI ou células contendo a enzima é de considerável importância para uma possível produção comercial da D-tagatose (Oh, 2007).

Muitos trabalhos utilizam alginato como suporte para imobilização da L-AI (Oh *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Rhimi *et al.*, 2007). Rhimi *et al.* (2007) imobilizaram em alginato de sódio e fizeram um estudo comparativo entre enzima livre e imobilizada, bem como a otimização das condições de produção de D-tagatose. As células recombinantes imobilizadas da L-AI apresentaram resultados semelhantes à enzima livre, obtendo atividades máximas a 80 °C, em pH 7,5. Jung *et al.* (2005) que também imobilizaram em alginato de sódio a enzima L-AI de *Geobacillus stearothermophilus*, e obtiveram uma temperatura ótima resultante da produção máxima de tagatose a 65 °C para enzima livre, em pH 7,5 e a 70 °C para enzima imobilizada, em pH 7,0. Enquanto Kim *et al.* (2003) obtiveram máximo da atividade em temperaturas a 60 °C, em pH 7,5 e a 65 °C, em pH 8,0 para enzima livre e imobilizada, respectivamente. Hong *et al.* (2007) obtiveram resultados de temperatura ótima de 90 °C para enzima imobilizada em alginato de cálcio, ligeiramente superior a da enzima livre (85 °C), ambos em pH ótimo (7,0), provavelmente tenha ocorrido uma proteção do suporte de alginato de cálcio à enzima, contra

a desnaturação pelo calor e também devido a L-AI ser proveniente de um micro-organismo resistente (*Thermotoga neapolitana*) a altas temperaturas. Liang *et al.* (2012), que também estudaram o suporte de alginato de cálcio, obtiveram resultados para o imobilizado, a uma temperatura ótima de 75 °C, em pH ótimo 7,5, enquanto que, para a enzima livre a reação catalisada foi mais eficiente a uma temperatura ótima de 60 °C, em pH ótimo 8,0.

Entretanto, Zhang *et al.* 2009 estudaram diferentes suportes e estratégias de imobilização da L-AI (L-AI), tais como: ligação covalente (Eupergit C, carboximetilcelulose (CMC) e agarose) e por encapsulamento (quitosana 3% e alginato de sódio), para a produção de L-ribulose a partir de L-arabinose. A ligação da enzima L-AI em CMC ativada apresentou menor atividade recuperada (34,1%) e menor rendimento de imobilização (28,7%). O derivado de agarose apresentou um baixo rendimento de imobilização (35,6%), embora a atividade recuperada tenha sido de 75,6%. Derivados de alginato de sódio apresentaram uma atividade recuperada e rendimento de imobilização de 67,7%, superiores a do derivado de quitosana (35,4%). De todos os suportes avaliados, Eupergite C apresentou o maior rendimento de imobilização (83,7%) e atividade recuperada (93,3%), provavelmente por ter mais grupos reativos e ser um suporte microporoso química e mecanicamente estável.

Oh *et al.* (2001) também verificaram a produção de tagatose usando biocatalisadores obtidos a partir de vários métodos de imobilização, com o objetivo de selecionar o método mais estável e econômico para a produção comercial. Estes incluíram adsorção em sílica-gel, aprisionamento em alginato de sódio, microencapsulação em ágar com gelatina e ligação covalente em agarose, sílica-gel, carboximetilcelulose (CMC) e alginato de sódio reticulados com glutaraldeído. Os métodos de imobilização utilizando agarose e alginato de sódio, reticulados por ligação covalente com glutaraldeído, resultaram em biocatalisadores mais estáveis para a produção de tagatose. Os autores indicaram alginato de sódio reticulado com glutaraldeído para a produção do biocatalisador, devido o seu baixo custo.

As estabilidades térmica e frente ao pH também foram investigadas. Rhimi *et al.* (2007) observaram que à 80 °C os tempos de meia-vida, $t_{1/2}$, foram 0,5 e 9 h para enzima livre e imobilizada, respectivamente. Os $t_{1/2}$ na estabilidade frente ao pH da enzima imobilizada foi mais elevado que da enzima livre sob condições de pH 7,0-8,0. A enzima imobilizada foi mais estável em pH 7,0, e os $t_{1/2}$ reduziram drasticamente sob condições alcalinas (Kim *et al.* 2003; Jung *et al.* 2005). Segundo Kim *et al.* (2003) o tempo de meia-vida da enzima imobilizada a 60 °C foi cerca de 50 vezes mais elevada do que o da enzima livre, e a

termoestabilidade da enzima imobilizada acima de 60 °C reduziu drasticamente. Para a enzima imobilizada, a atividade foi estável em condições neutras (pH 7-8). O tempo de meia-vida da enzima imobilizada foi muito mais elevado do que a enzima livre em condições neutras.

Poucos são os resultados de imobilização da L-AI utilizando suportes a base de agarose e quitosana, os quais foram estudados neste trabalho.

2.7. Suportes para imobilização de enzimas

A necessidade de imobilizar enzimas é uma ferramenta que permite melhorar as propriedades do catalisador (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998 e 1999; Guisan, *et al.*, 1993; Mateo *et al.*, 2000a), ou seja a maior contribuição para o bom desempenho de uma enzima imobilizada pode ser dada pela escolha do suporte. Se por um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar a estabilidade da enzima imobilizada, por outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (Mendes *et al.*, 2011a).

Os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados conforme sua composição e morfologia (Adriano, 2008).

2.7.1. Suportes a base de quitosana e agarose para imobilização de enzimas

Para a seleção de um suporte para imobilização de enzimas, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. O processo de imobilização exige do suporte uma boa resistência mecânica, devido ao uso repetido e contínuo do derivado, que algumas vezes, requer o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação. Outra característica fundamental é a estabilidade térmica do suporte, pois podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura, provocando inativação do catalisador (Kennedy, 1987; Vieira, 2009; Mendes *et al.*, 2011a).

A natureza hidrofílica ou hidrofóbica do suporte também deve ser levada em consideração, pois são mais desejáveis suportes com características hidrofílicas de modo a se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Já os suportes de natureza hidrofóbica costumam diminuir a estabilidade e a atividade da enzima

imobilizada por um mecanismo semelhante à desnaturação das enzimas em solventes orgânicos, porém para algumas enzimas, como lipases, a hidrofobicidade da matriz é um parâmetro muito importante para que o acesso do substrato (óleo) aos interstícios da matriz seja favorecido (Vieira, 2009; Kennedy, 1987; Mendes *et al.*, 2011a).

Ambos os suportes escolhidos para este trabalho, quitosana e agarose, são classificados como polímeros naturais orgânicos. Os polissacarídeos (celulose, agarose, quitosana, dentre outros) são os polímeros mais utilizados como suporte para imobilizar enzimas (Tardioli, 2003; Adriano, 2008; Mendes *et al.*, 2011b).

A quitosana é um polissacarídeo de baixo custo, por ser um resíduo da indústria de pesca, não tóxico, renovável, biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino primários funcionais em potencial (NH₂) na estrutura da quitosana, uma importante característica como suporte para imobilização de enzimas (Silva *et al.*, 2012; Adriano *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2011b).

Para a quitosana, a modificação de sua estrutura química é necessária para promover o aumento da estabilidade química e física do suporte e seus derivados, também denominada de reticulação, empregando diferentes agentes de ativação, como glicidol, epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, reduzindo assim a sua capacidade de retenção de água (Silva *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011a).

Suportes sólidos insolúveis como agarose encontram-se disponíveis comercialmente (Cardoso *et al.*, 2009), a agarose possui uma estrutura altamente porosa, alta estabilidade mecânica, com uma área superficial muito maior que a enzima, que são características adequadas de um suporte, pois permitem interações proteína-superfície planas, ideais para estabelecer ligações em vários pontos com a enzima sem impedimento estérico, resistência à degradação microbiana; de fácil ativação, ausência de toxicidade e fácil dissolução aquosa. Possuem grupos ativos como, por exemplo, hidroxila (Guisán e Blanco, 1987), sendo possível obter a agarose altamente ativada, utilizando técnicas de ativação propostas por diversos autores (Guisán, 1988; Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2000; Tardioli, 2003; Mateo *et al.*, 2010; Bolívar *et al.*, 2010).

Capítulo 3

*Resultados: Caracterização e
Imobilização da Enzima Nativa de
Enterococcus faecium*

3. CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NATIVA DE *Enterococcus faecium*

Pretende-se neste capítulo discutir estudos preliminares com a enzima L-arabinose isomerase (L-AI), proveniente da bactéria *Enterococcus faecium* em sua forma nativa. Realizada a caracterização da enzima nativa no extrato bruto, evidenciaram-se baixas concentrações da enzima de interesse (L-AI), vistos pelos perfis de eletroforese e atividade enzimática (Capítulo 3). Desta forma, graças ao desenvolvimento de técnicas de engenharia genética, a enzima de interesse pôde ser expressa em organismos hospedeiros de fácil e rápido crescimento celular, proporcionando a obtenção de maiores quantidades da enzima L-arabinose isomerase com características favoráveis ao processo, que podem ser aplicados como catalisadores industriais (Capítulo 4).

3.1. OBJETIVOS

O objetivo fundamental deste capítulo foi caracterizar o extrato enzimático bruto contendo L-arabinose isomerase nativa de *Enterococcus faecium*, visando a imobilização da enzima em quitosana.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Enzima

O extrato enzimático bruto contendo L-arabinose isomerase nativa de *Enterococcus faecium* foi gentilmente doado e produzido pelo Instituto de Desenvolvimento Tecnológico a Indústria Química – INTEC (UNL-CONICET- Argentina) (Manzo *et al.*, 2010).

3.2.2. Quantificação de proteínas

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

3.2.3. Ensaio da atividade enzimática

A atividade da (L-AI) foi determinada utilizando como substrato uma solução de 0,4 M de D-galactose (Vetec-SP) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 suplementado com $MnCl_2$ 0,01 M. As amostras foram incubadas a 50 °C sob constante agitação, por 5h. A quantidade de D-tagatose foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método do resorcinol, Kulka (1956). A leitura foi realizada em espectrofotômetro segundo Manzo *et al.*, 2010. Uma unidade (1U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima (L-AI) que catalisa a formação de 1 μ mol de D-tagatose por minuto.

A atividade enzimática da enzima solúvel pode ser escrita como segue na Equação 1:

$$AE_{(U/mL)} = \frac{[TAG]_{(mM)} * Vr_{(\mu L)}}{Ve_{(\mu L)} * t_{(min)}} \quad (1)$$

Sendo [TAG]: a concentração de D-tagatose determinada por ensaio colorimétrico (mM); Vr: volume reacional (μ L); Ve: volume de enzima (μ L) e t: tempo total da reação enzimática (min).

A atividade da enzima imobilizada (A_d) foi calculada pela razão entre a concentração de D-tagatose (mM) e volume da reação enzimática (mL), pela massa do derivado (g) e tempo (min), escrita como segue na Equação 2:

$$Ad_{(U/g)} = \frac{[TAG]_{(mM)} * Vr_{(mL)}}{m_{(g)} * t_{(min)}} \quad (2)$$

3.2.4. Preparação do gel de quitosana

O suporte usado para imobilização foi preparado segundo Rodrigues *et al.* (2008) com algumas modificações, a quitosana foi dissolvida em uma solução de ácido acético 5% (v/v) (10 g de quitosana para 400 mL de solução de ácido acético 5%). Após completa dissolução, a solução resultante foi adicionada, lentamente e sob agitação constante, a uma solução de NaOH 100 mM (proporção quitosana/NaOH = 1:10). Em seguida, o sistema foi

deixado em repouso por 24h à temperatura ambiente. O gel obtido após este tempo foi lavado com água destilada até a neutralidade sendo, em seguida, seco por filtração a vácuo.

3.2.5. Ativação por glutaraldeído

A ativação do suporte foi segundo Rodrigues *et al.* (2008) e Manzo (2013) com modificações, parte do gel de quitosana foi ativado em solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 contendo glutaraldeído 2,0% v.v⁻¹(razão m/v de 1/5) por 4h a temperatura ambiente sob agitação. Após ativação, o suporte foi lavado com água destilada para remoção do excesso de glutaraldeído e em seguida foi seco por filtração a vácuo.

3.2.6. Ativação por epicloridrina

Parte do gel de quitosana (10g) foi posto em solução de NaOH 2 M. O suporte foi agitado e submetido a banho de gelo até alcançar uma temperatura aproximada de 4 °C. Em seguida, adicionaram-se 3 ml de uma solução de NaBH₄ 0,12 M. O pH da solução foi verificado, encontrando-se em torno de 13 e 14. Acrescentou-se epicloridrina (razão m/v de 1:2) e a suspensão foi mantida em banho de gelo por 2 h sob agitação magnética. Em seguida, a mesma foi retirada do banho de gelo e incubada sob agitação até completar 24 h de ativação. O suporte foi lavado com água destilada para remoção do excesso de epicloridrina e em seguida foi seco por filtração a vácuo. Finalizado esse período, o suporte ativado foi tratado com solução de NaIO₄ 0,1 M por 2h a temperatura ambiente sob agitação. O suporte foi lavado com água destilada e em seguida foi seco por filtração a vácuo (Rodrigues *et al.*, 2008, Manzo, 2013).

3.2.7. Ativação por glicidol

A ativação do suporte com glicidol foi realizada de acordo com Gonçalves *et al.*, 2002, Adriano, 2008, Rodrigues *et al.*, 2008, com modificações. O suporte de quitosana foi ressuspenso em água destilada (razão m/v de 1/10), adicionou-se NaOH 1,7 M (razão m/v de 1:0,33), dissolveu-se NaBH₄ 0,75M (razão m/m de suporte de 1/0,0136) a frio. Adicionou-se lentamente glicidol (razão m/v de 1/0,48) e, posteriormente, manteve-se o sistema sob agitação por 18h a temperatura ambiente. O suporte foi lavado com água destilada e em

seguida foi seco por filtração a vácuo. Pesou-se o suporte ativado e foi ressuspenso em água destilada (razão m/v de 1/10), acrescentou-se NaIO_4 (razão m/v de 1/0,064) e o sistema foi mantido sob agitação por 2h a temperatura ambiente. O suporte foi lavado com água destilada e em seguida foi seco por filtração a vácuo.

3.2.8. Imobilização enzimática

A L-arabinose isomerase foi imobilizada em quitosana ativada. A imobilização foi realizada colocando-se em contato o suporte previamente ativado com uma solução tampão bicarbonato de sódio pH 10,0 contendo a enzima (Razão m/v de 1/10) a 25 °C sob agitação, usando um agitador rotatório de frascos. O tempo de contato enzima-suporte variou dependendo do agente usado na ativação, sendo de 12 h, para ativação com glutaraldeído e 24 h para ativação com epícloridrina e glicidol. Avaliou-se a influência do tampão e do pH de imobilização e para tal fim, utilizaram-se: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 e tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0. Ofereceram-se 5 mg de proteína por g de suporte, que correspondeu a 2,5 mL do extrato enzimático ($2,06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), completado para um volume de 10 mL com o respectivo tampão em estudo (razão m/v de 1/10). Em paralelo aos ensaios, conduziu-se um experimento controle, para se avaliar a provável desativação da enzima nas mesmas condições de imobilização. As condições operacionais de temperatura e agitação foram mantidas constantes durante os experimentos.

3.2.9. Avaliação do enlace enzima-suporte

O tipo de enlace enzima suporte (adsorção ou ligação covalente) foi avaliado incubando-se os derivados sob suave agitação por 12 horas em solução de NaCl 1M em tampão bicarbonato de sódio 50 mM.

3.2.10. Ensaio de estabilidade térmica da L-AI solúvel e imobilizada

L-arabinose isomerase (L-AI) solúvel e imobilizada foi incubada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, a 60 °C, durante 24 h. Periodicamente, amostras foram retiradas, colocadas imediatamente em banho de gelo e em seguida as atividades eram mensuradas através da produção de D-tagatose, anteriormente descrita (item 3.2.3).

Um modelo de dois parâmetros proposto por Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica, utilizando o software Origin 8.1 (Adriano *et al.*, 2011).

3.2.11. Estabilidade operacional da L-AI imobilizada

A estabilidade operacional dos derivados foi avaliada em bateladas consecutivas, de isomerização de D-tagatose. A reação foi realizada num reator fechado, mantida a 50 °C por 5h de reação, sob constante agitação. O volume de reação foi de 2,5 mL e a massa do derivado foi 0,5 g. Antes de cada novo ciclo, o derivado foi lavado para remover os produtos e substrato que não reagiram, e conduzidos a uma nova pesagem.

3.2.12. Análise da massa molar da L-Arabinose Isomerase

Para estimar a massa da enzima (L-AI) foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), as análises foram realizadas em géis pré-montados com gradiente de 8 a 16% de poliacrilamida (ECL Gel, GE Lifesciences Piscataway, NJ, USA) previamente equilibrado em tampão de corrida (0,025M TRIS, 0,192M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) por 12 minutos a 160 V no equipamento ECL Gel Box (GE Lifesciences Piscataway, NJ, USA). As bandas de proteínas foram visualizadas por coloração, pelo método do Coomassie Brillhante Blue coloidal adaptando um protocolo descrito por Candiano *et al.* (2004).

3.2.13. Condições de bioconversão de D-galactose em D-tagatose

As reações foram conduzidas em reator batelada, contendo solução de 0,4 M de D-galactose, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,6), suplementado com MnCl₂ 0,01 M. Para a enzima livre e imobilizada, o volume de trabalho de meio reacional foi 2,5 mL. Antes da imobilização, a quantidade de proteína utilizada e a atividade da L-arabinose isomerase no extrato enzimático foram determinadas, 5 mg proteína/g de suporte e 0,089 U. mL⁻¹, respectivamente. Ressalta-se que a mesma quantidade de enzima foi oferecida para ambos os casos (0,151 U de enzima). A temperatura da reação foi mantida a 50 °C e as amostras (100 µL) foram retiradas em tempo pré-determinados.

3.2.14. Estabilidade de estocagem da enzima L-AI solúvel e imobilizada

A L-arabinose isomerase solúvel e imobilizada foi estocada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 a 4 °C na geladeira por 45 dias. A cada 15 dias, amostras foram retiradas e a atividade da enzima foi medida.

3.2.15. Parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$

Os ensaios para determinação das constantes cinéticas para enzima livre e imobilizada foram realizados com diluições do substrato D-galactose (Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 e cofator 1 mM $MnCl_2$, utilizou-se uma ampla faixa de concentrações do substrato de 0,00625 a 1 M. As reações enzimáticas foram realizadas pelo método do resorcinol, Kulka (1956), a 50 °C em banho termostaticado. Para calcular as constantes cinéticas (K_m e $V_{máx}$) utilizou-se o software Origin 8.1, função hipérbole.

3.2.16. Ensaios preliminares de purificação do extrato enzimático

Segundo Manzo *et al.* (2012) com modificações, o extrato obtido foi submetido à adição de sulfato de amônio a 80% de saturação, até total dissolução do sal em agitação constante e deixado em repouso por 24h a 4 °C. A suspensão resultante foi submetida à centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi novamente dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e foi submetido a um processo de filtração em gel PD10 em Sephadex G-25 (GE Healthcare), equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e usada como a amostra de partida para os ensaios subsequentes de purificação. Nos ensaios de cromatografia de troca iônica, utilizou-se a resina DEAE – Sepharose, em modo batelada e contínuo, na proporção (1g: 10 mL de solução enzimática). A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada com um gradiente escalonado com concentrações crescentes de NaCl entre 25 mM a 300 mM, incubando cada eluição por 20 minutos. A concentração de proteína e a atividade enzimática das frações foram determinadas como indicadas anteriormente.

3.2.17. Parâmetros de imobilização

O rendimento de imobilização (R_I) foi calculado através da atividade enzimática oferecida no início da imobilização diluída em tampão (At_0), em (U. mL⁻¹), e atividade no sobrenadante final da imobilização ou do decorrer do processo de imobilização (At_f), em (U. mL⁻¹), veja equação 3.

$$R_I(\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} * 100 \quad (3)$$

A atividade teórica ($At_{teórica}$) foi calculada a partir do rendimento de imobilização (R_I) e atividade oferecida no início da imobilização diluída em tampão (At_{of}), em (U. g⁻¹), veja equação 4.

$$At_{teórica} (U/g) = \frac{R_I}{100} * At_{of} \quad (4)$$

Sendo a atividade oferecida (At_{of}), em U. g⁻¹, calculada através da atividade enzimática oferecida no início da imobilização diluída em tampão (At_0), em U. mL⁻¹, o volume de imobilização (V_{imob}), em mL, pela massa do suporte (m), em g, veja equação 5.

$$At_{of} (U/g) = At_0 * \frac{V_{imob}}{m} \quad (5)$$

A atividade recuperada (A_R) foi então calculada através da razão entre atividade no derivado (At_d), em U. g⁻¹, obtida da imobilização no gel de quitosana, pela atividade teórica (At_t), em U. g⁻¹, veja equação 6.

$$At_R(\%) = \frac{At_d}{At_t} * 100 \quad (6)$$

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Influência do pH e do tampão na atividade enzimática da enzima solúvel

Dentre as propriedades das enzimas o pH é de suma importância para determinar as condições ideais para a atividade catalítica, potencializando assim os resultados alcançados.

A escolha do sistema tamponante a ser utilizado neste trabalho foi determinada através da comparação da atividade da enzima solúvel, em três diferentes sistemas tamponantes: acetato de sódio 50 mM pH 5,6; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e bicarbonato de sódio 50 mM pH 10. A enzima foi incubada a 50 °C por 5 h de reação. De acordo com a Figura 3.1, nota-se que a maior atividade foi obtida utilizando o tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,6) obtendo-se $0,0902 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$, seguido por uma segunda maior atividade enzimática utilizando o tampão fosfato de sódio 50mM (pH 7,0), obtendo-se $0,0713 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}$.

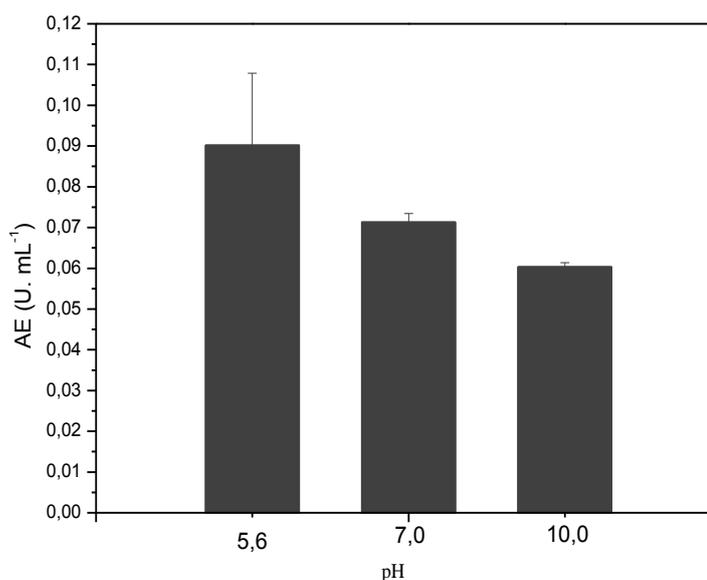


Figura 3.1. Influência do pH e do agente tamponante na atividade (AE) da L-arabinose isomerase.

O tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,6) revelou-se neste trabalho como a melhor solução tamponante para a obtenção da maior atividade da enzima solúvel L-arabinose isomerase, e foi selecionado para as medidas de atividade enzimática.

Alguns autores também observaram a atividade máxima da L-AI em faixas ácidas, pH inferior a 7,0, como *Lactobacillus latis* (Chinelate, 2013), *Lactobacillus fermentum* (Xu et

al., 2012), *Lactobacillus Gayonii* (Nakamatu e Yamanaka, 1969), *Shewanella sp.* (Rhim *et al.*, 2011), *Bifidobacterium longum* (Salonen *et al.*, 2012) e *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Lee *et al.*, 2005b).

3.3.2. Avaliação dos parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em quitosana

Três estratégias para a ativação do suporte de quitosana foram estudadas, utilizando como agentes ativadores, glutaraldeído, epícloridrina e glicidol, com o objetivo de obter um derivado com elevada atividade e estabilidade (estabilidade operacional e térmica a 60 °C). A Tabela 3.1 apresenta os resultados dos parâmetros de imobilização da L-AI nos diferentes suportes estudados.

Tabela 3.1. Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em quitosana 2,5%, ativada com diferentes agentes: Glutaraldeído, Epícloridrina, Glicidol. Carga enzimática oferecida de 5 mg de proteína. g^{-1} de gel ($0,327 U.g^{-1}$ de gel), sendo rendimento de imobilização (R_I), atividade teórica (At_t), atividade do derivado (At_d), atividade recuperada (At_R).

Amostras	$At_d (U.g^{-1})$	$R_I (%)$	$At_t (U.g^{-1})$	$At_R (%)$
Quitosana-glutaraldeído	0,029	45	0,149	20
Quitosana-epícloridrina	0,026	54	0,177	15
Quitosana-glicidol	0,020	48	0,157	13

A atividade recuperada na imobilização da L-AI utilizando quitosana ativada em glicidol apresentou resultado inferior, de atividade recuperada e atividade do derivado, comparado aos demais ensaios realizados, 13%. Analisando os dados apresentados na Tabela 3.1, pode-se observar que, apesar do rendimento de imobilização ter sido de 48% em glicidol-quitosana, a atividade do derivado foi de apenas $0,020 U.g^{-1}$.

Observou-se na ativação utilizando epícloridrina como agente ativante, valores de atividade recuperada (15%), atividade do derivado ($0,026 U.g^{-1}$) e rendimento de imobilização (54%), com melhores resultados que a ativação quitosana-glicidol. Resultados similares, quanto a ativação, foram encontrados por Rodrigues *et al.* (2008), Adriano (2008) e Bezerra (2012), quando definiram o conceito que a epícloridrina apresentou-se mais reativa que o glicidol, devido a consequência do maior número de grupos reativos no suporte ativado por

epicloridrina, quando comparado ao glicidol, permitindo a formação de mais ligações suporte-enzima.

A respeito da imobilização da enzima em quitosana ativada por glutaraldeído, obtiveram-se melhores resultados, apresentando uma atividade recuperada superior (20%) e uma maior atividade do derivado ($0,029 \text{ U.g}^{-1}$) apesar de ter apresentado o menor rendimento de imobilização (45%), possivelmente a enzima que foi imobilizada encontrou-se ativa.

Outro parâmetro que pode ter influenciado no presente estudo foi o tempo de incubação de 24 h para as ativações com epicloridrina e glicidol, diferente para a ativação com glutaraldeído (12 h). Este tempo pode ter sido superior ao necessário para as imobilizações em quitosana-epicloridrina e quitosana-glicidol, podendo ter acarretado possíveis distorções da estrutura da enzima.

A quitosana também foi avaliada por Lim *et al.* (2008) como suporte para a imobilização de L-arabinose isomerase de *Thermotoga neapolitana*, em comparação ao suporte alginato, visando a produção de D-tagatose a partir de D-galactose. Os autores obtiveram melhores resultados com suportes de quitosana, pois a enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade frente a altas temperaturas ($75 \text{ }^\circ\text{C}$) quando comparado a enzima imobilizada em alginato, para produção de tagatose, sugerindo que suportes de alginato não são adequados para a imobilização de enzimas em temperaturas superiores $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zhang *et al.* 2009 estudaram diferentes suportes e estratégias de imobilização da L-AI, dentre eles, a imobilização por encapsulamento em quitosana 3% e alginato de sódio e ligação covalente em Eupergit C, carboximetilcelulose (CMC) e agarose, para a produção de L-ribulose a partir de L-arabinose. De todos os suportes avaliados, Eupergite C apresentou o maior rendimento de imobilização (83,7%) e atividade recuperada (93,3%), provavelmente por ter mais grupos reativos e ser um suporte microporoso química e mecanicamente estável. Observou-se a menor atividade recuperada (34,1%) e menor rendimento de imobilização (28,7%) para a imobilização covalente da LA-I em carboximetilcelulose (CMC), seguido da imobilização em quitosana com 35,4% de atividade recuperada e rendimento de imobilização. Oh *et al.* (2001) também verificaram a produção de tagatose usando biocatalisadores obtidos a partir de vários métodos de imobilização, com o objetivo de selecionar o método mais estável e econômico para a produção comercial. Os autores utilizaram glutaraldeído como agente reticulante em suportes de agarose-CNBr e alginato de sódio, para uma imobilização covalente da LA-I, e obtiveram biocatalisadores mais estáveis para a produção de tagatose.

3.3.3. Avaliação dos parâmetros de imobilização da L-Arabinose isomerase em quitosana ativada com glutaraldeído

Estudou-se o efeito do pH nas propriedades da enzima imobilizada em quitosana. Utilizaram-se soluções tampões a pH 5,6; 7,0 e 10 (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, acetato de sódio 50 mM pH 5,6 e bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0), incubados por 12 horas de imobilização. A carga de proteína oferecida foi de 5 mg de proteína por grama de suporte. Determinaram-se os parâmetros de imobilização, que estão relacionados na Tabela 3.2.

Observou-se que a enzima manteve 100% de sua atividade inicial para o ensaio utilizando o tampão fosfato de sódio pH 7,0 e para os ensaios utilizando os tampões acetato de sódio pH 5,6 e bicarbonato de sódio pH 10,0, houve uma perda da atividade inicial de 32% e 11%, respectivamente.

Tabela 3.2. Influência do pH nos parâmetros de imobilização de L-arabinose isomerase em quitosana ativada com 2% (m/v) de Glutaraldeído. Carga enzimática oferecida de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel (0,474 U.g⁻¹ de gel) sendo rendimento de imobilização (R_I), atividade teórica (At_t), atividade do derivado (At_d), atividade recuperada (At_R).

Amostras	At _d (U. g ⁻¹)	R _I (%)	At _t (U. g ⁻¹)	At _R (%)
Acetato de sódio 50 mM, pH 5,6	0,018	100	0,474	3,7
Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0	0,033	62	0,295	11
Bicarbonato de sódio 50 mM, pH 10,0	0,079	35	0,168	47

Analisando os dados apresentados na Tabela 3.2, pode-se observar que, apesar do alto rendimento de imobilização (100%), quando se utilizou o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, obteve-se uma atividade recuperada de apenas 4%. Com relação à imobilização em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, obteve-se um rendimento de 62% e uma maior atividade recuperada (11%), que o ensaio anterior. Para o ensaio em tampão carbonato de sódio pH 10,0, apesar de apresentar menor rendimento de imobilização (35%), o biocatalisador obtido pela imobilização de L-AI em quitosana ativada com glutaraldeído apresentou maior atividade recuperada (47%) e uma maior atividade do derivado (0,079 U.g⁻¹), comparada com os outros ensaios.

Diante disto, percebe-se um comportamento inversamente proporcional entre rendimento de imobilização e atividade recuperada. Assim, para o derivado obtido a partir da

utilização do tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, pode ser justificado pelo conceito overcrowd, o qual representa a sobrecarga de enzima na superfície do suporte, reduzindo desta forma a acessibilidade do substrato ao sítio ativo, causando impedimento estérico, limitando a atividade enzimática (Pezzella *et al.*, 2014).

Para o derivado obtido a partir da utilização do tampão bicarbonato de sódio 50 mM, pH 10,0, pode-se observar que os 35% de enzima imobilizada, possivelmente apresentaram atividade enzimática, apresentando 47% de atividade recuperada.

Outro parâmetro que possa ter influenciado no presente resultado seria o tempo de incubação de 12h. Para imobilização utilizando qualquer um dos tampões de estudo, este tempo pode ter sido superior ao necessário, gerando prováveis distorções da estrutura proteica da enzima, uma vez que a imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse agente ativante, além de gerar ligações estáveis entre grupos amina do suporte e resíduos de amina de proteínas (Alonso, 2005; Elkaoutit *et al.*, 2011).

Ainda de acordo com a Tabela 3.2, pode-se verificar que a atividade do derivado tende a aumentar com o aumento do pH de imobilização, um dos mais importantes parâmetros de atividade enzimática, assim como a atividade recuperada. Estes resultados para os catalisadores imobilizados em pH 10 reticulados com glutaraldeído, confirmam a importância do pH durante a imobilização: a pH 10,05, a multipontualidade é favorecida quando comparado ao pH 7,0 e um maior número de grupos amino de lisinas devem estar desprotonados e prontos para reagir com os aldeídos do suporte (Adriano *et al.*, 2011).

Ao fim do processo de imobilização, foi realizada uma análise qualitativa da amostra por eletroforese. Testes de dessorção com NaCl 1M, a temperatura ambiente, também foram realizados visando a avaliação da ligação covalente. Estes resultados são apresentados a seguir.

3.3.4. Análise da massa molar da *L*-arabinose isomerase por eletroforese

Determinou-se a concentração de proteína no extrato enzimático através do método de Bradford (1976), que foi de 4,3 mg.mL⁻¹ para amostra enzimática concentrada em Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA); 1,8 mg.mL⁻¹ para o extrato enzimático bruto; 1,4 mg.mL⁻¹ para o branco inicial a imobilização e 0,3 mg.mL⁻¹ para o sobrenadante após a imobilização. Para a determinação da massa molar da enzima, utilizou-se

uma concentração de 20 µg de proteína para análise de eletroforese. Os perfis eletroforéticos da amostra do extrato enzimático evidenciaram a presença de diversas espécies protéicas, de baixa massa molar e alta massa molar, no extrato enzimático, e apresentou pouca evidência de proteína no sobrenadante após 12h, para os catalisadores imobilizados em pH 10 reticulados com glutaraldeído (Figura 3.2).

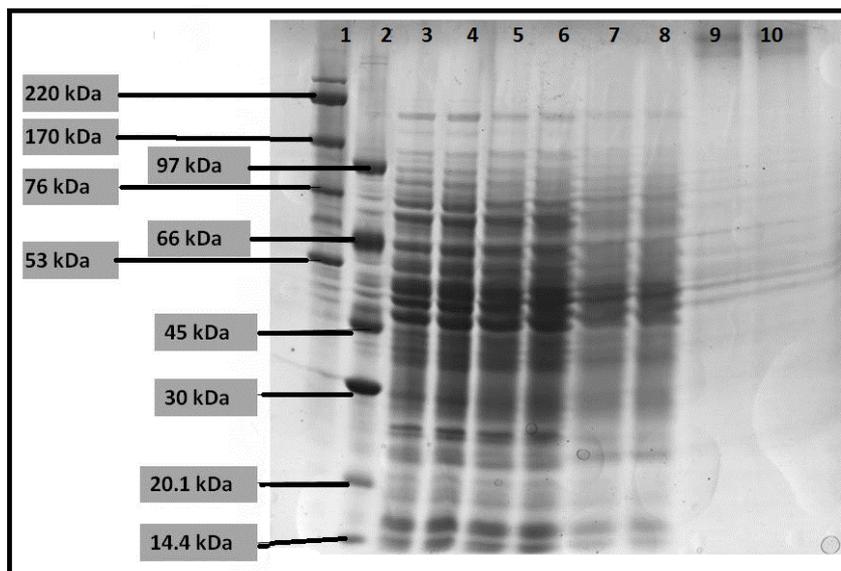


Figura 3.2. Eletroforese. 1- Marcador de alto peso molecular; 2 – Marcador de baixo peso molecular; 3 e 4 – Duplicata do Extrato enzimático da (L-AI) concentrado; 5 e 6 – Duplicata do Extrato enzimático bruto; 7 e 8 – Duplicata do Branco inicial da imobilização em pH 10; 9 e 10 – Duplicata do Sobrenadante depois da imobilização em pH 10.

De acordo com resultados de Manzo *et al.* (2010), a enzima L-arabinose isomerase nativa de *Enterococcus faecium*, a mesma utilizada no presente estudo, possui quatro bandas principais, sendo uma de maior peso molecular próximo a 50 KDa, visto através da Figura 3.2. As massas moleculares das (L-AI) produzidas por outras bactérias foram de 57 kDa para L-AI de *T. maritima* (Lee *et al.*, 2004), 57 kDa para L-AI de *T. neapolitana* (Kim *et al.*, 2002), 56 kDa para L-AI de *E. coli* (Patrick e Lee, 1968), 55 kDa para L-AI de *M. smegmatis* (Izumori *et al.*, 1978), 55 kDa e 54 kDa para L-AI de *T. mathranii* (Jorgensen *et al.*, 2004 e Liang *et al.*, 2012), 53 kDa para L-AI de *Lactobacillus fermentum* (Xu *et al.*, 2012).

3.3.5. Avaliação do enlace enzima-suporte ativado por glutaraldeído

Estudou-se o tipo de enlace estabelecido entre a enzima e o suporte ativado por glutaraldeído. Observou-se que a enzima permaneceu imobilizada, não houve dessorção da L-AI, mesmo após incubação em um meio fortemente iônico na presença de NaCl, a atividade relativa inicial se manteve ao final da análise em aproximadamente 88%. Isto comprova que se formaram ligações de natureza covalente entre a enzima e o suporte (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Dessorção da L-AI imobilizada via incubação em NaCl 1M por 12 horas.

Atividade inicial (U.g ⁻¹)	Atividade final após 12 horas de incubação em NaCl 1M (U.g ⁻¹)
0,068 ± 0,008	0,060 ± 0,002

A análise de proteína da solução de alta força iônica (NaCl 1M) também foi acompanhada em tempos pré-determinados, e obtiveram-se resultados negativos, comprovando a não existência de proteína no sobrenadante demonstrando a natureza covalente das interações enzima e suporte.

3.3.6. A estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada em quitosana

Segundo Zhang *et al.* (2009), a estabilidade térmica da enzima pode ser refletida na eficiência do método de imobilização. Portanto, avaliou-se a estabilidade térmica dos derivados de quitosana ativada por glutaraldeído, produzidos a partir diferentes condições de imobilizações (acetato de sódio 50 mM pH 5,6; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0), a 60 °C.

A Figura 3.3 mostra a estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada. O modelo de Sadana-Henley de desativação foi ajustado aos pontos experimentais (atividades relativas da L-AI para diferentes tempos de incubação a 60 °C).

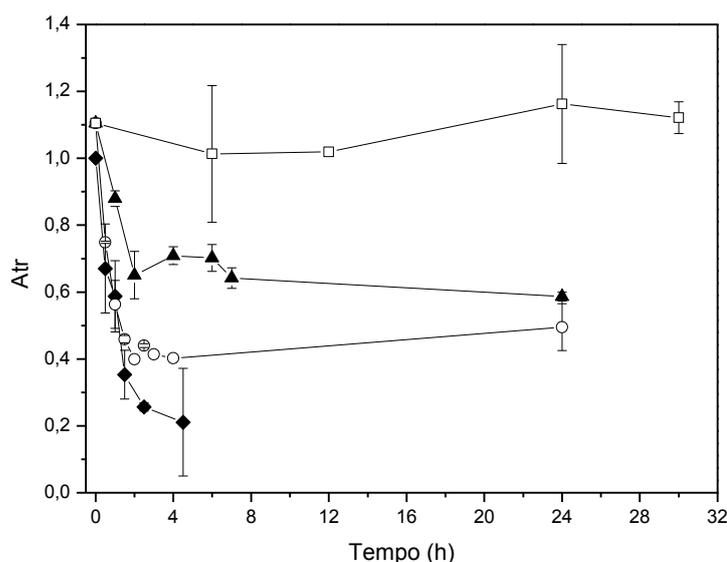


Figura 3.3. Estabilidade térmica a 60 °C da (◆) L-arabinose isomerase solúvel e dos derivados ativados com glutaraldeído, com imobilização a (▲) pH 5,6; (○) pH 7,0; (□) pH 10,0, com carga oferecida de 5mg proteína.g⁻¹ gel.

Os tempos de meia-vida calculados a partir do modelo de inativação térmica ajustado aos dados experimentais (Figura 3.4) para os biocatalisadores preparados são listados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Valores estimados para as constantes de desativação térmica K_d , tempo de meia vida e fator de estabilização em função do tipo de imobilização, aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987).

Condições de imobilização	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)	Fator de estabilização
Enzima solúvel	0,93	0,90	0,94	-
Imobilização em pH 5,6	0,88	0,89	1,84	1,95
Imobilização em pH 7,0	1,72	0,95	0,45	0,47

LAI solúvel e imobilizada foram inativados a 60 °C, pH 5,6 e 7,0 (tampões acetato de sódio 50 mM e fosfato de sódio 50 mM). Observou-se uma inativação térmica muito rápida nas imobilizações feitas em acetato de sódio 50 mM pH 5,6 e fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, obtendo-se valores $t_{1/2}$ 1,84 h e 0,45 h, respectivamente.

O modelo de inativação térmica da enzima solúvel seguiu Sadana-Henley (1987), com atividade catalítica rapidamente reduzida (em aproximadamente 0,94h).

A enzima imobilizada em quitosana-glutaraldeído, em condições tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10, mostrou uma atividade catalítica mais estável termicamente após 30 horas de incubação a 60 °C, que a enzima solúvel e os derivados obtidos a pH 5,6 e 7,0 (Figura 3.3).

Estes resultados confirmam a importância do pH durante a imobilização: a pH 10, a multipontualidade é favorecida quando comparado ao pH 5,6 e 7,0, pois se formam várias ligações químicas fortes entre a enzima e o suporte, tornando a estrutura da enzima mais resistente aos desdobramentos. Assim, a enzima quimicamente e fortemente ligada ao suporte, comparada à enzima solúvel, será mais resistente à inativação térmica (Tardioli, 2003).

Segundo Gomes *et al.* (2007), a maior estabilidade ao calor apresentada pela enzima L-arabinose isomerase de termófilo, comparada com sua equivalente mesofílica, tem sido atribuída à interação com íons metais divalentes, como Mn^{2+} , os quais são responsáveis pela estabilização da estrutura da proteína, e neste trabalho o cofator Mn^{2+} é utilizado em solução tampão durante a análise da estabilidade térmica até a atividade enzimática.

Outros resultados foram obtidos por Kim *et al.* (2003), que utilizaram a enzima L-arabinose isomerase de *Geobacillus stearothermophilus* (Gali152), imobilizada em alginato e observaram a pH 8,0 que a atividade da enzima livre diminuiu com o aumento do tempo de reação. A atividade foi reduzida para 86,3%, a 60 °C, após 60 min, e a atividade diminuiu drasticamente em temperaturas acima de 70 °C. O $t_{1/2}$ (h) da enzima imobilizada a 60 °C foi cerca de 50 vezes mais elevado do que o da enzima livre, e a termoestabilidade da enzima imobilizada acima de 60 °C reduziu drasticamente. Jung *et al.* (2005), trabalharam com enzimas (Gali 152) imobilizadas em alginato de sódio, obtiveram a pH 8,0 uma redução da atividade enzimática tanto para as enzimas livres quanto para imobilizadas, quando submetidas ao aumento do tempo e temperatura. Para as reações a temperaturas acima de 60 °C obtiveram um $t_{1/2}$ (h) de 2,8 e 144h, para enzimas livres e imobilizadas, respectivamente.

3.3.7. A estabilidade operacional do derivado de quitosana

A fim de investigar a estabilidade operacional, com vista a aplicações práticas, da enzima L-AI durante a produção de D-tagatose, verificou-se a estabilidade do melhor derivado obtido, enzima imobilizada em quitosana-glutaraldeído em pH 10,00. A enzima

imobilizada foi reciclada e utilizada várias vezes, e, em seguida, as atividades da isomerase foi monitorizada (Figura 3.4).

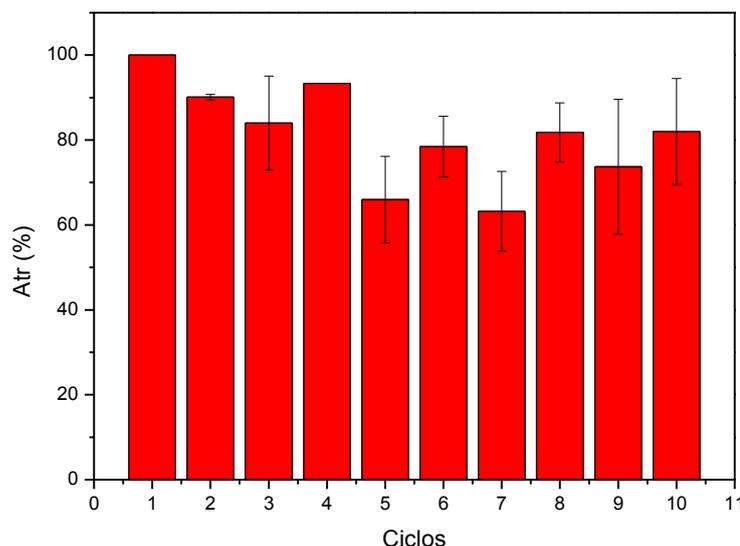


Figura 3.4. Estabilidade operacional da L-arabinose isomerase imobilizada em quitosana reticulada com glutaraldeído. Atividade inicial foi definida como 100%.

Neste estudo observou-se que ao longo dos 10 ciclos, a L-AI imobilizada em quitosana reticulada em glutaraldeído, manteve sua atividade relativa aproximadamente em mais de 80 %.

Rhimi *et al.* (2007) utilizando a L-AI imobilizada em partículas de alginato de sódio ao longo de 8 ciclos, obtiveram mais de 70% da sua atividade inicial ao final do último ciclo. Xu *et al.* (2012), estudaram a imobilização de células de L-arabinose isomerase em partículas de alginato, obtiveram uma taxa de 56% de conversão em 8 ciclos. Resultados superiores foram encontrados neste estudo com a imobilização da L-AI nativa sobre suporte de quitosana-glutaraldeído, que ao longo de 10 ciclos manteve sua atividade inicial aproximadamente de 80%.

3.3.8. Estabilidade à estocagem em geladeira

Amostras de L-arabinose isomerase solúvel e imobilizada foram armazenadas na geladeira (4 °C) durante 45 dias, visando avaliar sua estabilidade à estocagem. Verificou-se que a enzima solúvel e imobilizada, manteve 100% da sua atividade quando estocada a 4 °C por 15 dias, em solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6. Após esse período a

atividade da enzima solúvel permaneceu constante por 30 dias, apresentando um decréscimo em 45 dias de estocagem. Observou-se que após 45 dias a enzima solúvel tinha 30% da sua atividade enzimática, enquanto que a enzima imobilizada manteve 53% após o mesmo período de tempo de armazenamento, confirmando o comportamento esperado para o derivado sobre quitosana-glutaraldeído (Figura 3.5).

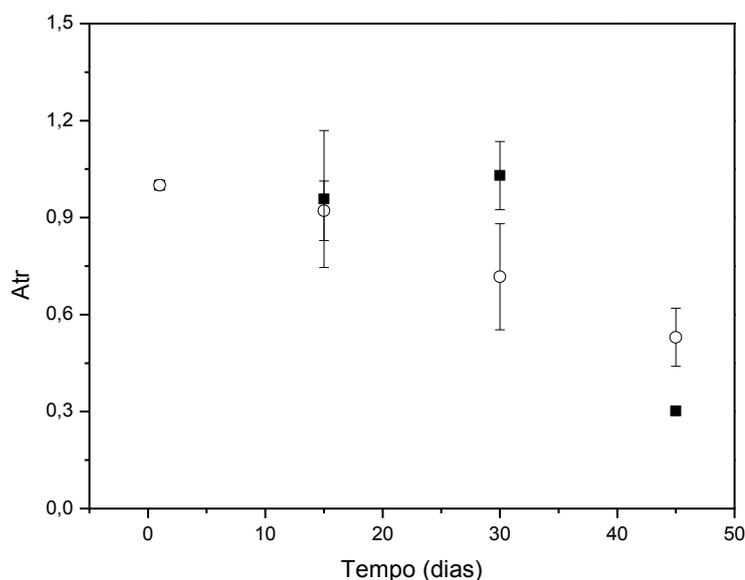


Figura 3.5. Estabilidade a estocagem a 4 °C da (■) enzima solúvel (extrato bruto) e (○) enzima imobilizada.

3.3.9. Conversões em tagatose utilizando enzima livre e imobilizada em reator batelada

Avaliou-se o desempenho da enzima solúvel do extrato bruto sem purificação, e da enzima imobilizada (0,151 U para ambos os casos) na isomerização da D-galactose em D-tagatose em reator batelada. O meio reacional continha 0,4 M de D-galactose, o que equivale a 72 g.L⁻¹ de solução de D-galactose, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 suplementado com MnCl₂ 0,01 M. A Figura 3.6 mostra os resultados do ensaio em batelada para os catalisadores livre e imobilizado, a 50 °C avaliados durante 7h de reação. Observa-se um aumento da concentração de D-tagatose no tempo de 4h de reação para a enzima solúvel. Após esse tempo o rendimento de conversão em tagatose é praticamente constante para enzima solúvel. Observou-se um crescente aumento de tagatose após 3 h de reação para a enzima imobilizada.

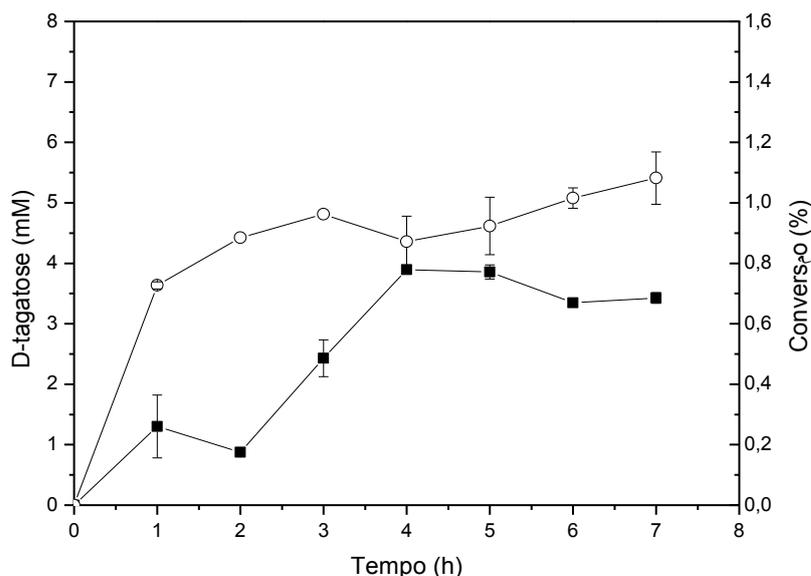


Figura 3.6. Isomerização da D-galactose em D-tagatose em reator batelada a 50 °C por 7h catalisada pela enzima L-AI (■) solúvel e (○) imobilizada.

De acordo com trabalhos na literatura, observou-se que serão necessários estudos futuros com relação ao aumento do tempo de reação e a utilização de uma maior concentração de enzima no extrato enzimático, para auxiliar no melhoramento do processo e talvez uma maior conversão em tagatose. Contudo, segundo Hong *et al.* (2007), quanto maior a concentração de galactose no reator, maior o tempo para atingir o ponto de equilíbrio de conversão em tagatose, portanto aumentar a concentração inicial de D-galactose também seria um passo a ser avaliado para melhor obtenção de D-tagatose na conversão. Pode-se observar em alguns trabalhos discutidos a seguir, que obtiveram bons resultados na conversão de D-galactose em D-tagatose, porém é importante salientar que foram utilizadas condições diferentes, quanto, concentrações de substrato maiores, tempo de reação mais longo, e maiores temperaturas.

Liang *et al.* (2012) revelaram que a reação de conversão atingiu o seu equilíbrio dentro de 20 h, utilizando a enzima livre em meio Tris-HCl pH 8,0 a 60 °C, e obtiveram em condições de equilíbrio, 198 mM (35,6 g.L⁻¹) de D-tagatose, o que corresponde a um rendimento de 39,5%, a partir de 500 mM de solução de D-galactose (90 g.L⁻¹).

Kim *et al.* (2003), avaliaram a conversão de 100 g.L⁻¹ galactose em tagatose a 60 °C, para enzima livre e imobilizada, utilizaram a quantidade de proteínas e a atividade da L-arabinose isomerase, 10 mg e 4,64 U, respectivamente. A enzima livre converteu a galactose em tagatose a uma taxa de 30,6% a 60 °C durante 16 h. No entanto, a enzima imobilizada

produziu 58,2% a 60 °C durante 90 h. Jorgensen *et al.* (2004), utilizaram 300 g.L⁻¹ de solução de galactose (1,67 M) a 65 °C, e obtiveram uma concentração de tagatose de 700 mM em 48 horas, correspondendo a 42% de conversão.

Hong *et al.* (2007) operaram um reator com células de L-arabinose isomerase de *Thermotoga neapolitana* imobilizadas (2.5 U em 12 ml), e obtiveram resultados com 0,5 M D-galactose a 70 °C, convertidos em mais que 50% de conversão após 20 horas de operação do reator.

Lim *et al.* (2008), estudaram a produção de tagatose em bioreactor contendo 4,0 U.ml⁻¹ da enzima imobilizada em esferas de quitosana e 100 g.L⁻¹ de galactose, a 70 °C, e concluíram que quando o pH do meio foi mantido constante, o rendimento de conversão da tagatose das enzimas livre e imobilizadas foi cerca de 50 e 52% em 20h, respectivamente. No entanto, após 20h, a enzima livre estabilizou, enquanto que a enzima imobilizada continuou a produzir tagatose durante 96 h.

Com exceção, tem-se Manzo (2012), que estudou o grau de conversão do substrato ao produto e obteve resultados satisfatórios em pouco tempo de reação enzimática, utilizando a enzima nativa purificada e concentrada, L-AI de *E. faecium*, a mesma utilizada neste trabalho, empregou uma concentração inicial de 500 mM de galactose em condições de 50 °C e pH 7,0, e obteve um rendimento de conversão de 38% em 3 h de reação enzimática. Este autor também estudou a conversão a 42 °C, pH 7,0 e 250 mM de galactose, e alcançou aproximadamente 25% de conversão em 80 minutos de reação, em diferentes tempos de reação de 30 em 30 minutos.

3.3.10. Estimativa das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$

Estudou-se o efeito da concentração de D-galactose (0,00625 a 1 M) na velocidade inicial de reação catalisada por L-arabinose isomerase nativa, para produção de D-tagatose, 50 °C. Os dados experimentais da enzima nativa na forma solúvel e imobilizada, foram determinadas através das constantes de Michaelis-Menten (K_m e $V_{máx}$), e estão representadas na Figura 3.7.

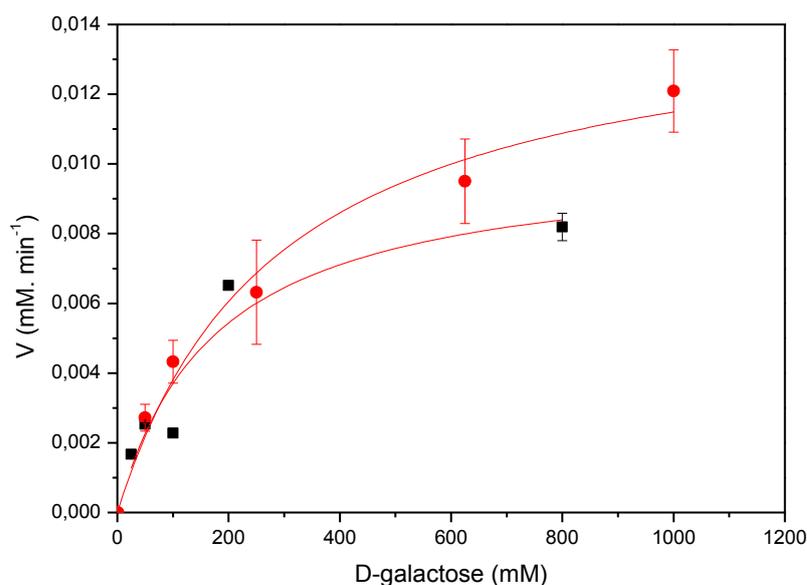


Figura 3.7. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis e Menten à velocidade de isomerização catalisada por L-arabinose isomerase nativa, determinados a tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 e cofator 1 mM MnCl₂, a 50 °C. L-arabinose isomerase solúvel (■) e imobilizada (●). Modelo de uma cinética hiperbólica através do software Origin 8.1.

Os valores dos parâmetros obtidos pela regressão não-linear da equação de Michaelis-Menten para a conversão de D-galactose foram $V_{\text{máx}} = 0,010 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ e $K_m = 177 \text{ mM}$, para enzima nativa na forma solúvel e $V_{\text{máx}} = 0,015 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ e $K_m = 289 \text{ mM}$, para enzima nativa imobilizada. Observa-se um bom ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais da enzima livre e imobilizada, com R^2 de 0,92 e 0,98, respectivamente.

Observou-se maior afinidade ao substrato pela enzima solúvel quando comparada com a enzima imobilizada, apresentando-se menor valor de K_m , possivelmente tenha ocorrido alguma modificação com a imobilização da enzima, refletindo na redução da afinidade pelo substrato.

De acordo com resultados de Torres *et al* (2014), a enzima nativa L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*, a mesma utilizada no presente estudo, apresentou valores das constantes (K_m) de 101, 71 e 35 mM para D-galactose, determinados a 30, 40 e 50 °C, respectivamente.

3.3.11. Estudo de purificação preliminar do extrato enzimático bruto da *L-arabinose isomerase*

Estudos preliminares de purificação foram realizados utilizando como fase estacionária a resina DEAE-Sepharose, para cromatografia de troca iônica, utilizada na proporção (1g: 10 mL de solução enzimática). A eluição foi realizada com um gradiente escalonado com concentrações crescentes de NaCl entre 25 mM a 300 mM. Foram feitos estudos em modo batelada e contínuo e os resultados encontram-se expostos na Figura 3.8.

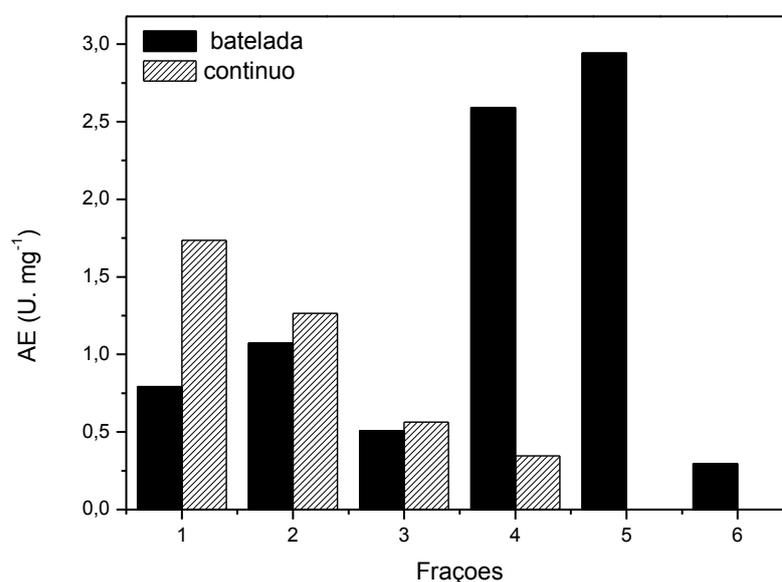


Figura 3.8. Gráfico de eluição de proteínas em atividade específica durante a cromatografia em DEAE-Sepharose em modo batelada e contínuo. Eluição realizada com 1- 25 mM, 2- 50 mM, 3- 100 mM, 4- 150 mM, 5- 200 mM e 6- 300 mM, de NaCl em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0.

Observou-se melhores resultados no ensaio de purificação em modo batelada, partiu-se de uma concentração de proteína de 2,48 mg.mL⁻¹ e atividade enzimática de 0,156 U. mL⁻¹. Ocorreu uma dessorção lenta e gradual da enzima, verificada através da atividade enzimática, utilizando forças iônicas reduzidas (frações 1, 2 e 3), porém houve uma baixa dessorção de proteína. Verificou-se que somente a partir da fração 4 (NaCl 150 mM) apresentou uma maior atividade enzimática, dentre as demais frações utilizadas, obtendo-se atividade enzimática de 0,157 U. mL⁻¹, indicando uma maior recuperação da enzima de interesse (L-AI), Figura 3.8. Em seguida, analisou-se também, uma significativa atividade

enzimática de 0,138 e 0,136 U. mL⁻¹, nas frações 5 e 6, eluídas com NaCl de 200 e 300 mM, respectivamente, no ensaio de purificação em modo batelada, Figura 3.8.

Na purificação em modo contínuo, obtiveram-se resultados insatisfatórios na recuperação da enzima, pois baixas concentrações de proteína foram recuperadas e observou-se uma menor recuperação da enzima de interesse, quando comparada ao tratamento anterior. Como resultado, tanto na recuperação da atividade enzimática e da purificação, considerou-se que esta técnica não foi adequada para uma purificação preliminar desta enzima.

3.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

O extrato enzimático contendo L-Arabinose isomerase foi submetido à eletroforese em gel, o que permitiu a visualização de várias bandas protéicas e revelou a presença de uma proteína mais expressiva com massa molar entre 45 KDa a 53 kDa. O tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,6) revelou-se como a melhor solução tamponante para a determinação da atividade da enzima solúvel L-arabinose isomerase, e foi utilizado para as demais análises com esta enzima. Em relação às condições de imobilização, a melhor atividade recuperada foi obtida utilizando-se a pH 10,0, tampão bicarbonato de sódio 50 mM. A atividade do derivado tendeu a aumentar com o aumento do pH de imobilização, um dos mais importantes parâmetros de atividade enzimática. O glutaraldeído foi o melhor agente ativante sobre o suporte de quitosana, devido à alta reatividade desse agente ativante, além de gerar ligações estáveis entre grupos amina do suporte e resíduos de amina de proteínas. A imobilização possibilitou o reuso da enzima, através da estabilidade operacional do derivado, foi mais estável termicamente que a enzima solúvel, apresentou maior tempo de estocagem e maior atividade catalítica.

Capítulo 4

*Resultados: Clonagem, Fermentação
e Extração da Proteína
Recombinante L-arabinose
isomerase de Enterococcus faecium*

4. CLONAGEM, FERMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L-ARABINOSE ISOMERASE DE *Enterococcus faecium*

Há alguns relatos de produção da enzima L-arabinose isomerase a partir de diferentes espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Chakravorty, 1963; Cheetham e Wootton, 1993; Zhang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2014), no entanto, a maioria dos trabalhos para a produção da L-AI utilizam micro-organismos recombinados, utilizando principalmente a *E. coli* como bactéria hospedeira (Oh *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Jørgensen *et al.*, 2004; Manjasetty *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Rhimi *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012), devido as taxas de reação de isomerização em D-tagatose serem muito lentas em processos industriais, quando utilizada a enzima nativa (Kim, 2001; Oh *et al.*, 2006). Portanto, este Capítulo 4 trata da produção da enzima de interesse, L-arabinose isomerase recombinante, com propriedades satisfatórias para sua posterior purificação por cromatografia de afinidade. Efetuou-se a inserção de um domínio de 6 histidinas em um dos extremos da sequência da enzima (C-terminal e N-terminal). Estudou-se a atividade e estabilidade da enzima produzida, para avaliar se a transformação efetuada teve efeitos positivos ou negativos sobre a sua aplicabilidade industrial. Portanto, deste capítulo em diante trabalhou-se com a enzima recombinante.

4.1. OBJETIVOS

Cumpriram-se os seguintes objetivos:

1. Seleção e construção dos plasmídeos pBAD His-A-A-236 e PET 29a (+) P 209 ARA, com função de produzir a proteína L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*;
2. Expressão dos plasmídeos selecionados nas respectivas cepas hospedeiras selecionadas de *Escherichia coli* DH10B e BL21 (DE3);
3. Fermentação, extração e obtenção de extratos enriquecidos em L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*;
4. Ensaios enzimáticos e de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a fim de determinar a atividade enzimática e a presença da proteína em estudo;
5. Caracterização cinética da proteína produzida:
 - 5.1. Efeito do pH

- 5.2. Efeito da temperatura
- 5.3. Estabilidade frente ao pH
- 5.4. Estabilizada frente à temperatura
- 5.5. Cinética enzimática
- 5.6. Rendimento de Bioconversão de D-galactose em D-tagatose

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Plasmídeo

Os plasmídeos e vetores de expressão (pBAD His-A-A-236 e PET 29a (+) 209) utilizados neste trabalho foram construídos pelos Dr. José Luis García, professor de investigação do Centro de Investigações Biológicas e Dr. Benevides Costa Pessela, científico titular, ambos do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), em Madrid-Espanha. O DNA genômico isolado de *Enterococcus faecium* (gen *ara*) foi gentilmente cedido pelo Dr. Enrique José Mammarella, do Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), em Santa Fé - Argentina.

4.2.2. Enzima

Extratos enriquecidos em L-arabinose isomerase (L-AI) foram produzidos usando cepas de *E. coli*, DH10B com o plasmídeo no vetor de expressão pBAD His-A-A-236 e BL21 (DE3) com o plasmídeo no vetor PET 29a (+)P 209 ARA, e foram nomeadas neste trabalho, respectivamente, de LAI-DH10B e LAI-BL21.

As duas cepas recombinantes foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos adequados para a seleção das bactérias transformadas (ampicilina 25% ou kanamicina 50%), induzidas com 1mM IPTG (Isopropil-1-thio-β-D-galactopiranosídeo) e 0,5% L-arabinose, respectivamente, a 37 °C e 200 rpm, *overnight* (12h).

Tabela 4.1. Composição do meio LB, pH final do meio 7,0/ 25 °C.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5

4.2.3. Preparação das cepas *DH10B* e *BL21 (DE3)* competentes

As bactérias competentes foram preparadas de acordo com protocolo proposto por Ausubel *et al.*, 2003. As cepas competentes utilizadas neste trabalho (*Escherichia coli DH10B* e *BL21 (DE3)*) foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Biologia Molecular do Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC em Madrid.

4.2.4. Transformação de *Escherichia coli DH10B* e *BL21 (DE3)* competentes com os plasmídeos correspondentes

A transformação das cepas competentes de *E. coli* foi realizada através de choque térmico, protocolo de Sambrook *et al.*, 1989. As cepas competentes foram retiradas de -80 °C e deixadas em repouso em banho de gelo por 15 minutos para descongelar. Um volume (50 µL) de tampão TE (Tris-HCl e EDTA pH 8,0) foi adicionado a um eppendorf contendo o plasmídeo. A mistura foi incubada a 55 °C, por 10-15 minutos e seguida de banho de gelo. Adicionaram-se 2 µL do plasmídeo no eppendorf contendo a cepa competente, colocando-se por 10 min em gelo, seguida de choque térmico a 37 °C por 3 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas novamente em gelo por 5 minutos e adicionadas de 1 mL de meio LB (Luria-Bertani). A suspensão foi incubada sob agitação a 350 rpm por 1h a 37 °C. Posteriormente, estas células foram repicadas em meio LB sólido, mediante adição de 2% de ágar bacteriológico (Difco), contendo os antibióticos adequados para a seleção das bactérias transformadas (ampicilina 25% ou Kanamicina 50%), a diferentes diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Após a semeadura, incubaram-se as placas a 37 °C por 12h (*overnight*). As colônias isoladas foram novamente repicadas em placas de LB sólido, divididas em 8 partes, submetidas a 37 °C, por 12h e posteriormente cultivadas em 10 mL de caldo LB com o correspondente antibiótico, a 37 °C por 12h. Após esse período, os cultivos foram utilizados para analisar a presença do plasmídeo contendo o inserto de interesse, e outra parte preparou-se estoques em

glicerol estéril a 10% e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tomaram-se pequenos volumes de cada uma das colônias cultivadas para sua análise por eletroforese. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

4.2.5. Análise e isolamento dos plasmídeos pBAD His-A-A-236 e PET 29a(+)P 209 ARA

Para analisar a presença dos plasmídeos contendo o inserto de interesse, utilizou-se o High Pure Plasmid Isolation Kit, de acordo com instruções do fabricante. A partir dos cultivos em meio LB contendo os antibióticos adequados para a seleção das bactérias transformadas, tal como o esquema mostrado na Figura 4.1.

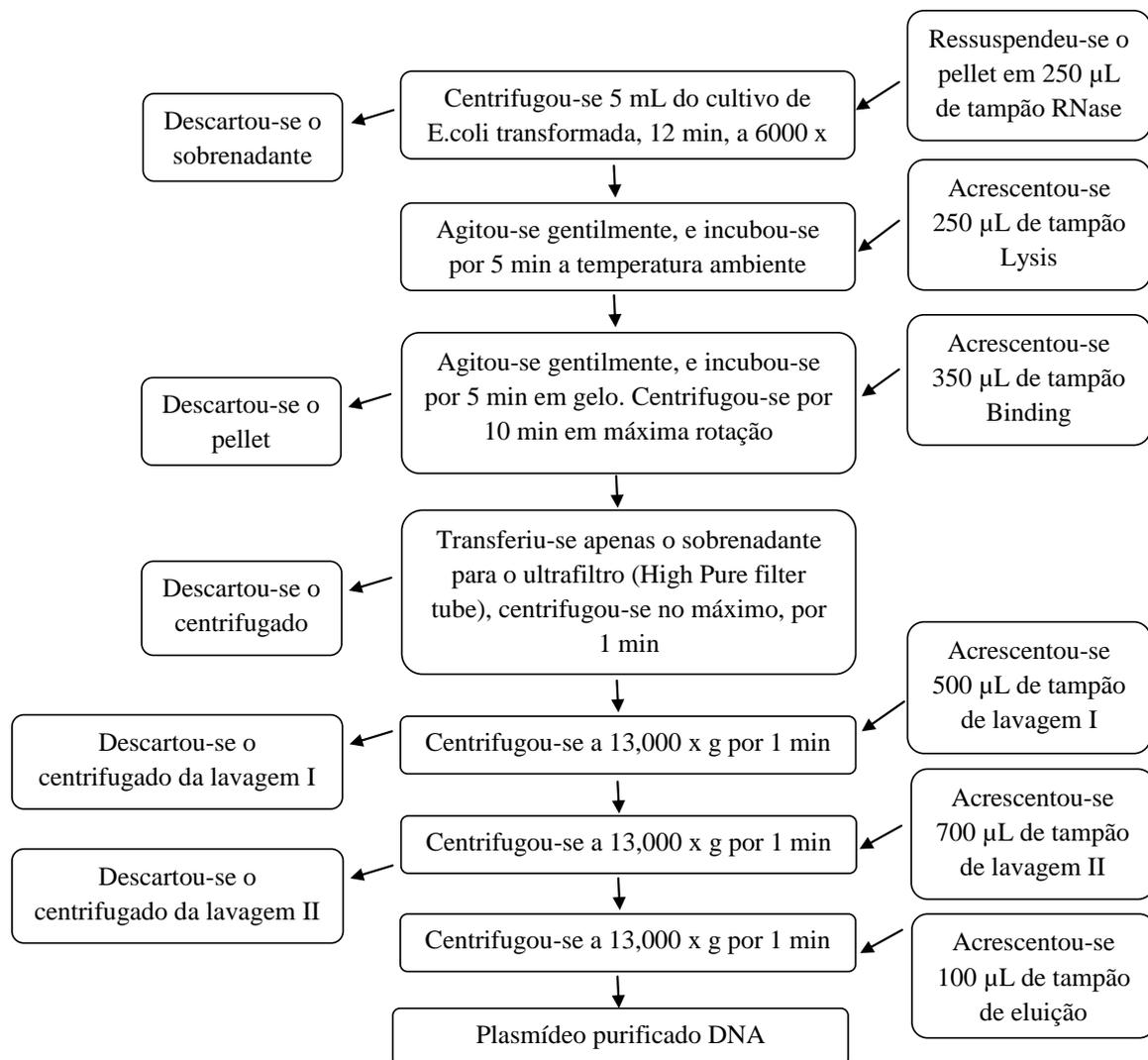


Figura 4.1. Fluxograma demonstrando o isolamento dos plasmídeos.

4.2.6. Expressão

Para a expressão dos plasmídeos mencionados nas respectivas cepas *E. coli* DH10B e *E. coli* BL21 (DE3) selecionadas, testes de expressão foram realizados em experimentos de crescimento sem e com indutores (1mM IPTG e/ou 0,5% L-arabinose). Utilizou-se o meio de cultivo Luria-Bertani (LB), (Sambrook *et al.*, 1989), líquido ou sólido mediante adição de ágar bacteriológico (Difco) em uma concentração de 2% (Pessela, 2002), suplementados com ampicilina (25%) para as cepas *E. coli* DH10B e com kanamicina (50%) para as cepas *E. coli* BL21 (DE3). Os experimentos foram realizados utilizando um pré-inóculo de 3 %, incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,2-0,5. Posteriormente, o pré-inóculo (3%) foi transferido ao meio de cultivo LB (1 Litro) contendo o antibiótico apropriado, incubados, inicialmente, a 37 °C até alcançar uma DO₆₀₀ entre 0,5-1, aproximadamente 3h de cultivo. Os experimentos de indução foram realizados, utilizando 0,5% L-arabinose em *E. coli* DH10B e 1mM IPTG em *E. coli* BL21 (DE3), incubados a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, e a L-AI foi induzida e expressada, *overnight*. Todas as etapas de expressão da enzima foram realizadas em ambiente estéril.

Posteriormente os cultivos foram centrifugados a 6.000 x g, por 20 min a 4 °C. O precipitado (*pellet*) foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Para a ruptura das células, utilizou-se uma prensa de alta pressão (French Press, a 1100 psi) (Pessela, 2002). Após a ruptura, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g, por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por eletroforese SDS-PAGE 12% para verificar o rendimento da proteína de interesse.

4.2.7. Ensaio de expressão para aumentar a biomassa e a concentração de enzima de interesse

Os ensaios de expressão para aumentar a concentração da enzima L-arabinose isomerase (L-AI) foram realizados da mesma forma descrita no item 4.2.6, utilizando um pré-inóculo a 10% e um meio de cultivo mais rico em nutrientes TB-Terrific Broth (Tabela 4.2), para alcançar uma DO₆₀₀ de aproximadamente 2, e posteriormente adicionar os indutores.

Tabela 4.2. Composição do meio TB (Moldes, 2014), pH final do meio 7,5/ 25 °C.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Triptona	12
Extrato de levedura	24
Fosfato de potássio monobásico	2,2
Fosfato de potássio dibásico	9,4
Glicerol	0,4%

4.2.8. Ensaio de atividade enzimática

Seguiu-se, a partir deste capítulo, com a determinação da atividade enzimática da L-AI segundo Hung *et al.* (2014). Utilizou-se como substrato uma solução de 0,4 M de D-galactose (Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6 suplementado com 1 mM MnCl₂. As amostras foram incubadas a 50 °C, por 1h. A quantidade de D-tagatose foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método ácido sulfúrico cysteína-carbazol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm (Dische and Borenfreund, 1951). Uma unidade (U) de atividade da L-AI foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de D-tagatose em 1 min nas condições de ensaio.

A atividade enzimática da enzima pode ser escrita como segue na Equação 7:

$$AE_{(U/mL)} = \frac{[TAG]_{(mM)} * V_r_{(\mu L)}}{V_e_{(\mu L)} * t_{(min)}} \quad (7)$$

AE é a atividade enzimática (U. mL⁻¹) para a enzima livre, TAG é a concentração de D-tagatose (mM), obtida através da curva padrão de D-tagatose (Sigma), V_r é o volume de reação (μL), V_e é volume de enzima (μL) e t é o tempo de reação (min).

4.2.9. Quantificação de proteínas

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

4.2.10. Análise da massa molar da L-Arabinose Isomerase

As eletroforeses se realizaram de acordo com Armisen (1997), em géis de acrilamida em condições de desnaturação na presença de SDS de acordo com o método de Laemmli (1976), com algumas modificações descritas a seguir. A percentagem (p/v) de poli-acrilamida utilizada foi de 12%. As proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brillante Blue. As amostras foram preparadas por desnaturação com 1% de SDS, 2,5% de mercaptoetanol, a 100 °C durante 5 min. Para as amostras de derivado, depois da desnaturação, centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante contendo a proteína adsorvida ao suporte. As amostras foram analisadas a temperatura ambiente, 150V, por aproximadamente 60 min em uma unidade de eletroforese SE 250-MIGHTY SMALL II (Hoefer), empregando uma fonte de alimentação da Pharmacia Biotech. (Electrophoresis Power Supply - EPS 600).

4.2.11. Caracterização cinética da proteína produzida

4.2.11.1. Influência do pH e da temperatura na atividade enzimática

A influência do pH sobre a atividade enzimática da L-arabinose isomerase (L-AI) foi determinada utilizando os tampões acetato de sódio 50 mM pH 5,6, fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e bicarbonato de sódio 50 mM pH 10.

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática da L-arabinose isomerase (L-AI) foi realizada com ensaios de atividade enzimática em pH 7,0, nas temperaturas de 25, 50, 75 e 90 °C.

Para a determinação da atividade enzimática, seguiram-se as condições de ensaio definidas anteriormente no item 4.2.8.

4.2.11.2. Estabilidade frente ao pH e temperatura para a L-AI

L-arabinose isomerase (L-AI) foi incubada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, a 60 °C durante 60 min. Periodicamente, alíquotas foram retiradas, colocadas imediatamente em banho de gelo e em seguida as atividades eram medidas através da produção de D-tagatose, como descrito anteriormente.

Para estudar a estabilidade ao pH da L-AI, a enzima foi incubada a temperatura ambiente (25 °C) em diferentes sistemas tampões, tais como acetato de sódio 50 mM pH 5,6, fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, 7,0, 8,0 e bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0, em todos os casos adicionou-se 1mM MnCl₂ como cofator e a reação ocorreu durante 2h.

4.2.12. Estimativa das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$

Os ensaios para determinação das constantes cinéticas foram realizados com diluições do substrato D-galactose (Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, MnCl₂ como cofator. Utilizou-se concentrações 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 0,6, 0,8 e 1 M. As reações ocorreram a 50 °C em banho termostaticado. Para calcular as constantes cinéticas (K_m e $V_{máx}$) realizou-se um ajuste não linear do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais utilizando-se o software Origin 8.1.

4.2.13. Rendimento de bioconversão de D-galactose em D-tagatose

Para a determinação da porcentagem da bioconversão de D-galactose em D-tagatose através da enzima L-arabinose isomerase, incubou-se a enzima a 0,4 M de D-galactose em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, MnCl₂ como cofator. Diferentes tempos de incubação foram avaliados, por 96 h de ensaio, e determinou-se a quantidade total de D-tagatose produzida, expressada em porcentagem em função da quantidade inicial de D-galactose por função do tempo.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Construção do plasmídeo para produzir a proteína L-arabinose isomerase

A clonagem do gene *ara*, para a produção da L-arabinose isomerase, foi realizada com sucesso nos vetores de expressão: pET29a e pBAD/HisA. Estes plasmídeos contêm vários elementos importantes que compõem o vetor. A Figura 4.2 apresenta o mapa do vetor pET29a induzível com Kanamicina.

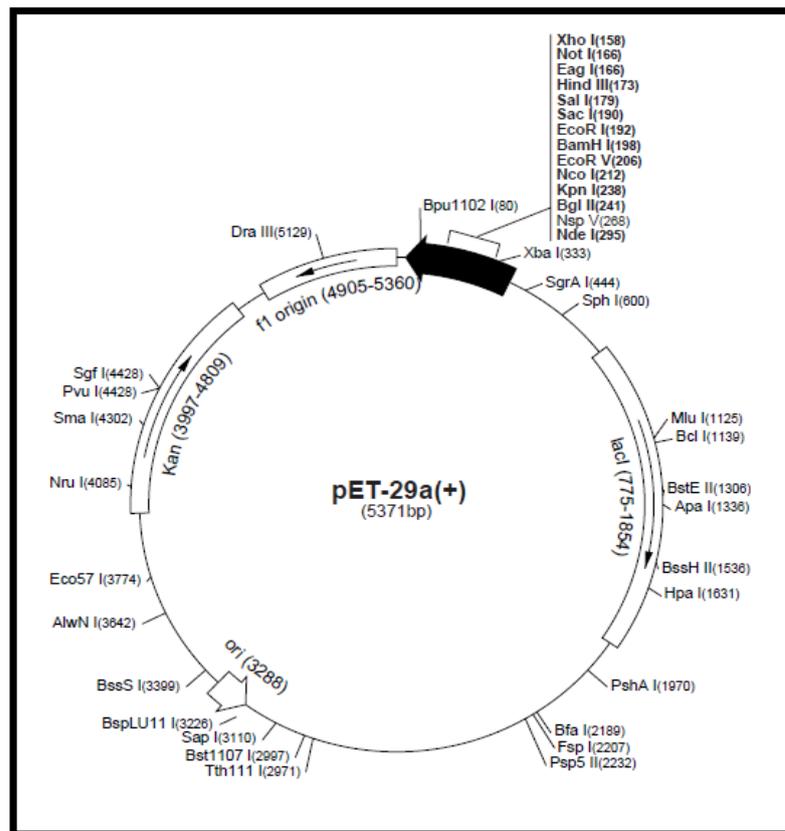


Figura 4.2. Mapa do Vetor pET29a. Este plasmídeo contém uma região para resistência a Kanamicina (*Kan*), o gene *lacI*, uma origem *f1* de replicação.

Os genes foram introduzidos nas zonas de restrições em XbaI-XhoI para pET29a e NcoI-EcoRI para pBAD/HisA, ambos alinhados e otimizados para *E. coli*. Para o vetor pET29a fusionou-se uma cauda de seis histidinas no extremo C-terminal, enquanto que no vetor pBAD/HisA foi introduzida sequência de seis histidinas na região do N-terminal, ambos para facilitar sua purificação por afinidade a suportes imobilizados com quelatos metálicos. O vetor pET29a contém uma pequena sequência que confere resistência ao antibiótico Kanamicina (*Kan*), e um promotor que promove indução por IPTG. Enquanto que o vetor pBAD/HisA conferiu uma região de resistência ao antibiótico ampicilina (*Amp*), com uma região de indução por L-arabinose. A Figura 4.3 apresenta o mapa do vetor pBAD/HisA aberto, a título de informação.

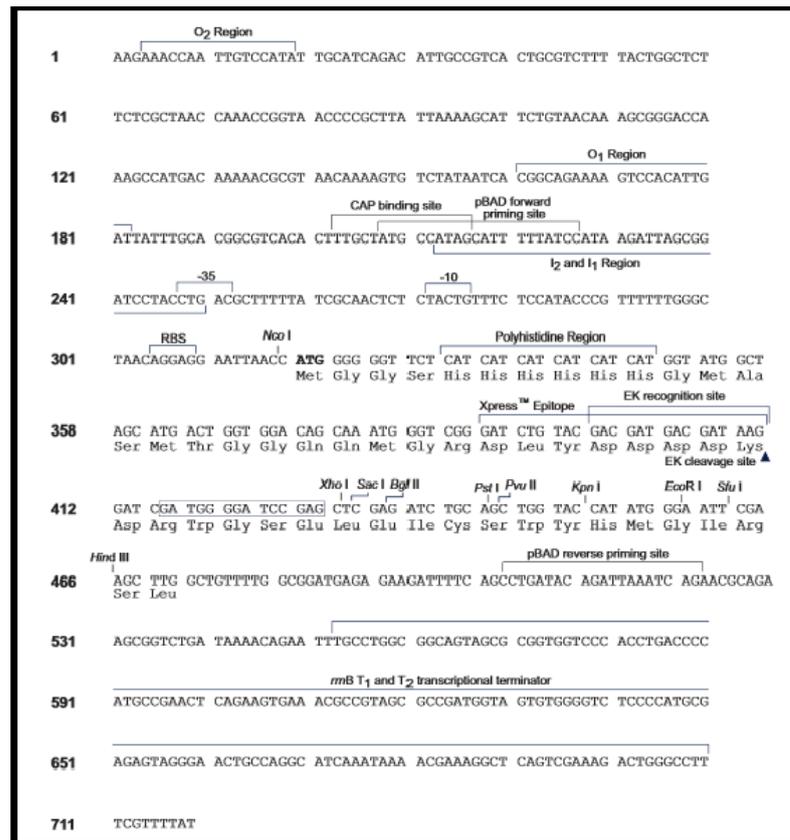


Figura 4.3. Mapa do Vetor pBAD/HisA aberto (INVITROGEN), onde aparecem todas modificações e o resíduo de histidinas introduzidos.

A fim de confirmar a presença do inserto nos clones selecionados, purificaram-se os plasmídeos e em seguida, realizou-se uma eletroforese de DNA em géis de agarose a 0,7%. A Figura 4.4 apresenta o perfil dos plasmídeos que foram utilizados para a clonagem posterior em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3).

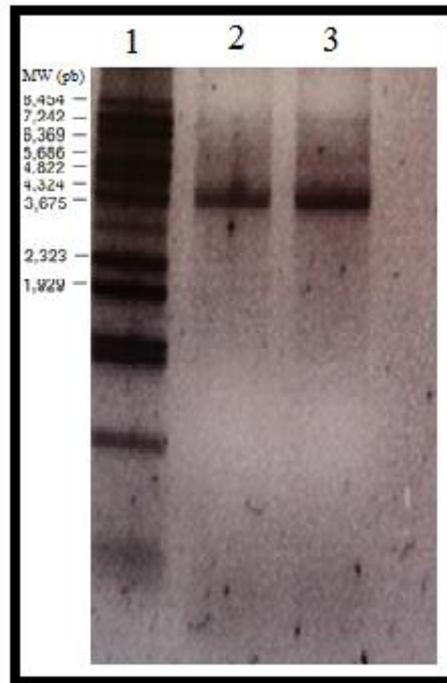


Figura 4.4. Eletroforese em Agarose (0,7%) da purificação dos plasmídeos utilizados para todas as modificações presentes nesta tese. **1** é o padrão de massa molecular Lambda *BstE II*. **2** e **3** são os plasmídeos puros utilizados na etapa de expressão para produzir a enzima de interesse (L-AI). Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.

Para realizar os processos de clonagem e expressão foram utilizadas células competentes *E. coli* DH10B e BL21 (DE3), capazes de amplificar a informação genética em múltiplas cópias, para produção de grandes quantidades da proteína recombinante. O crescimento dos cultivos foi monitorado e medido a densidade ótica (DO) a 600 nm empregando um espectrofotômetro Shimadzu UV-260. Posteriormente analisou-se a tipologia e a morfologia celular das bactérias estudadas na fase exponencial de crescimento, através de um microscópio de contraste da Nikon OPTIPHOT-2 (Figura 4.5).

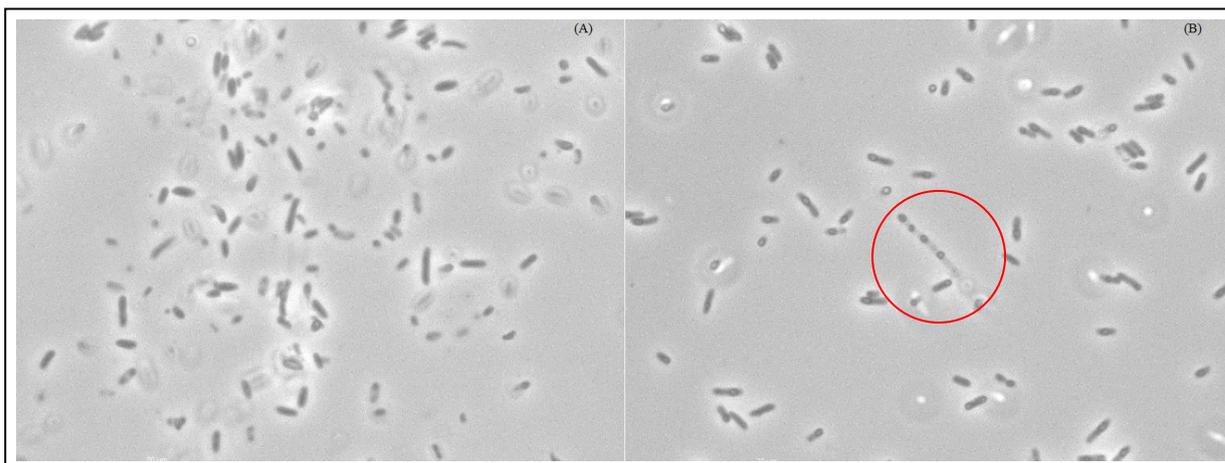


Figura 4.5. Imagens ao microscópio óptico de cultivos na fase exponencial das cepas de *E. coli* DH10B (A) e BL21 (DE3) (B) induzidas com L-arabinose e IPTG, respectivamente. As células cresceram a 37 °C em meio de cultivo LB.

Observou-se a presença de uma reduzida quantidade de corpos de inclusão (fração insolúvel), pouco menos de 5% no meio, visto através da Figura 4.5B, verificando que maior parte da proteína produzida era solúvel, uma característica importante na produção de enzimas intracelulares, conferindo assim, sucesso nos ensaios de produção da enzima de interesse. Segundo Balduino (2009) muitas das expressões de proteínas recombinantes em *E. coli* produzem uma grande quantidade de corpos de inclusão, que são proteínas agregadas e insolúveis. Segundo Caruso (2007), a formação de corpos de inclusão nem sempre é um problema, também pode ser uma vantagem, pois podem proteger a proteína de interesse, que está pura, contra a degradação bacteriana e também facilitar a purificação, por serem corpúsculos densos, precipitados em baixa velocidade de centrifugação, enquanto a maior parte das proteínas indesejáveis permanece no sobrenadante.

4.3.2. Fermentação e extração da proteína de interesse (L-AI)

Para estudar os rendimentos de obtenção da enzima, inicialmente produziu-se a enzima sem a presença dos indutores de expressão (L-arabinose ou IPTG, respectivamente para as cepas DH10B e BL21 (DE3)). As células de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani), a 37 °C, e 200 rpm, *overnight*. Depois deste passo, as células foram centrifugadas e rompidas por prensa de alta pressão a 1100 psi. Para visualizar os níveis de expressão e produção das cepas, as amostras foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE.

Para aumentar estes níveis de produção, uma segunda etapa durante a fermentação foi realizada. A produção da enzima, em LB a 30 °C sob agitação de 200 rpm, com os respectivos antibióticos (ampicilina e kanamicina), foi induzida com 0,5% de L-arabinose para *E. coli* DH10B e 1 mM IPTG para *E. coli* BL21 (DE3). A Figura 4.6 apresenta o resultado da eletroforese dos extratos celulares, contendo a proteína de interesse (L-AI), obtidos com e sem indução. Pode-se notar que a expressão da proteína L-AI apresenta maiores rendimentos quando da adição dos indutores. Desta forma, o gene que codifica a enzima L-AI foi clonado com sucesso nos vetores avaliados (plasmídeo pBAD His-A-A-236 e plasmídeo PET 29a(+) P209 ARA) com os indutores L-arabinose e IPTG, respectivamente, em meio LB. A presença da banda diferenciada nos extratos celulares induzidos, observando o tamanho esperado para a proteína L-AI, de aproximadamente 66 KDa, revelou sucesso na metodologia adotada. As massas moleculares da L-AI de outras bactérias estão entre 53 a 57 KDa (Jorgensen *et al.*, 2004; Izumori *et al.*, 1978; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Rhimi *et al.*, 2011).

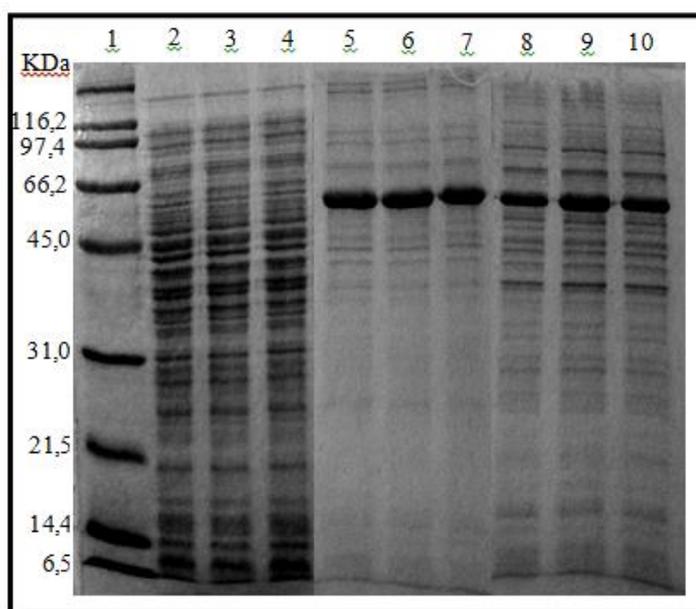


Figura 4.6. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaio de expressão dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em *E. coli*. **1-** Padrões de peso molecular; **2, 3 e 4-** Extrato transformado por pBAD/HisA em DH10B sem a presença do indutor; **5, 6 e 7-** Extrato produzido por pBAD/HisA em DH10B induzidas com 0,5% de L-arabinose; **8, 9, 10-** Extrato transformado pela cepa *E.coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo PET 29a(+) P 209 induzidas por IPTG. As análises foram injetadas em triplicata.

Os extratos protéicos também foram avaliados quanto ao ensaio enzimático de produção de D-tagatose e concentração de proteínas totais (Tabela 4.3). Observou-se que a enzima L-AI produzida pela cepa DH10B (LAI-DH10B) apresentou o dobro de atividade enzimática que a LAI-BL21, mas apresentou também uma maior concentração proteica. A atividade específica do extrato enzimático bruto para a LAI-DH10B ($0,154 \text{ U.mg}^{-1}$) também foi superior a LAI-BL21 ($0,097 \text{ U.mg}^{-1}$), o que indica que a primeira produziu uma maior quantidade da proteína de interesse.

Tabela 4.3. Atividade dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3), em meio LB.

Extratos	Atividade (U.mL^{-1})	Proteína (mg.mL^{-1})	Atv. Específica (U.mg^{-1})
LAI-DH10B	6,21	40,4	0,154
LAI-BL21	3,01	30,9	0,097

4.3.3. Ensaio de expressão da proteína recombinante utilizando um meio mais rico em nutrientes a fim de aumentar a concentração da enzima de interesse

Com intenção de aumentar os rendimentos de expressão da enzima L-arabinose isomerase (L-AI) realizaram-se experimentos com outro meio de cultivo, TB (*Terrific Broth*), mais rico em nutrientes. Segundo Moldes (2014) para alguns cultivos de hiperprodução de proteínas o meio rico empregado é *Terrific Broth* (TB).

Visando o aumento da biomassa e assim proporcionando maiores concentrações da atividade específica, a densidade óptica (DO_{600}) do cultivo foi monitorada. Inicialmente o cultivo partiu de uma DO_{600} de 0,5, após 3 horas de crescimento celular em meio TB atingiu-se uma DO_{600} de aproximadamente 2,5, para ambas as cepas estudadas (DH10B e BL21 (DE3)). Depois de atingida esta densidade, os cultivos das duas cepas foram induzidos por IPTG (1 mM.mL^{-1}) e L-arabinose (0,5%) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Finalizou-se o cultivo após 12 h de indução a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, alcançando uma DO_{600} de aproximadamente 10 para cepa DH10B e de aproximadamente 6 para a cepa BL21 (DE3). Uma vez finalizado o tempo de cultivo, depois da indução, os cultivos foram centrifugados para o processamento das enzimas, como descrito por Pessela, 2002. Os extratos protéicos foram avaliados quanto ao

ensaio enzimático de produção de D-tagatose e concentração de proteínas totais e estão resumidos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Atividade dos extratos celulares enriquecidos de L-arabinose isomerase produzida em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3), em meio TB.

Extratos	Atividade (U.mL⁻¹)	Proteína (mg.mL⁻¹)	Atv. Específica (U.mg⁻¹)
LAI-DH10B	10,09	298	0,034
LAI-BL21	5,29	145	0,036

Analisando os valores de atividade enzimática, observou-se que a proteína LAI-DH10B registrou uma atividade no extrato superior a correspondente LAI-BL21. Enquanto que, a atividade específica de ambas as enzimas foi semelhante, devido resultados da concentração de proteínas totais terem sido menor no extrato enzimático da LAI-BL21.

4.3.4. Caracterização e propriedades bioquímicas da enzima L-AI

4.3.4.1. Estudo da atividade da L-arabinose isomerase frente ao pH

Realizou-se um estudo da atividade da L-arabinose isomerase em faixas de pH (5,6; 7,0 e 10,0), para encontrar o pH ótimo da reação de isomerização (D-galactose em D-tagatose), na presença do cofator Mn²⁺ 1mM, a 50 °C, por 1 h de reação enzimática. Utilizou-se D-galactose 0,4 M como substrato. Na Figura 4.7, observa-se uma maior atividade da L-AI solúvel em pH 5,6, para as duas enzimas estudadas, provenientes dos cultivos com as duas cepas de *E. coli* transformadas, DH10B e BL21 (DE3). Característica similar também foi observada para a enzima nativa com maiores atividades em pH 5,6 (visto no capítulo anterior).

A L-AI produzida em DH10B, também apresentou significativa atividade enzimática tanto a pH 5,6 como a pH 7,0, enquanto que a enzima produzida em BL21 (DE3), sua atividade decresce a medida que aumenta-se o pH desde 5,6, 7,0 a 10,0. Este comportamento pode ser explicado pelo efeito da posição dos resíduos de His e seu acoplamento no respectivo organismo hospedeiro, o que podem ter provocado alguma

distorção no centro catalítico das enzimas e modificando algo no ponto isoelétrico das enzimas.

Segundo dados reportados na literatura, o pH ótimo para L-arabinose isomerase pode variar desde a faixa alcalina até a faixa ácida, revelando mais uma vez que a origem da enzima pode influenciar diretamente nesta propriedade. Podemos destacar algumas fontes de L-AI acidófilas, pH inferior a 7,0, como *Lactobacillus Gayonii* (Nakamatu e Yamanaka, 1969), *Shewanella* sp. ANA-3 (Rhimi *et al.*, 2011), *Bifidobacterium longum* NRRL B-41409 (Salonen *et al.*, 2012) e *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Lee *et al.*, 2005b).

Observou-se uma queda na atividade enzimática a pH 10,0 para ambas as enzimas, que apresentaram baixos desempenhos na atividade catalítica, obtendo-se valores de 19% para LAI-DH10B e 41% para LAI-BL21 (Figura 4.7).

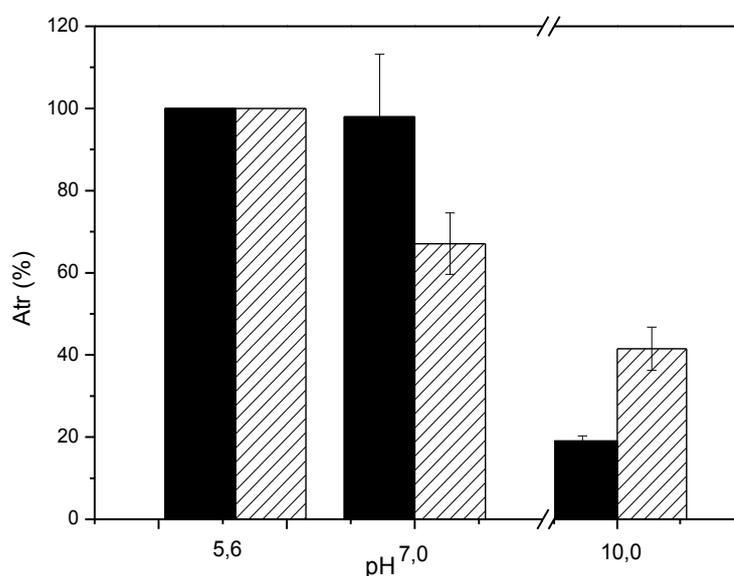


Figura 4.7. Efeito do pH na atividade da L-arabinose isomerase em (■) DH10B e (▨) BL21 (DE3). Atividades máximas das LAI-DH10B e LAI-BL21 no pH 5,6, são de $2,77 \pm 0,16$ U.mL⁻¹ e $1,86 \pm 0,09$ U.mL⁻¹, respectivamente.

Segundo alguns autores, as condições ácidas são mais favoráveis e vantajosas para a produção de D-tagatose, devido a menor geração de subprodutos no processo, sendo uma fonte potencialmente atrativa para a aplicação industrial e mais adequada para o uso biotecnológico (Rhimi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005b; Bucke, 1983). Outros autores ainda afirmam que durante as reações de isomerização a temperaturas muito elevadas e pH neutros podem ocorrer reações de Maillard, provocando escurecimento dos carboidratos formados e outros efeitos indesejáveis nos produtos finais destas reações (Kim, 2004; Liu *et al.*, 1996).

4.3.4.2. Estudo da atividade da L-arabinose isomerase frente à temperatura

O estudo do efeito da temperatura sobre as atividades das isomerases demonstrou que as duas enzimas são ativas de forma ótima a 50 °C, apresentando um decréscimo da atividade a 75 e 90 °C, para ambas as enzimas LAI-DH10B e LAI-BL21.

A Figura 4.8 apresenta os perfis de temperatura/atividade para L-AI livre. As atividades foram medidas a pH 5,6 com D-galactose 0,4 M como substrato, na presença do Mn^{2+} 1mM, como cofator.

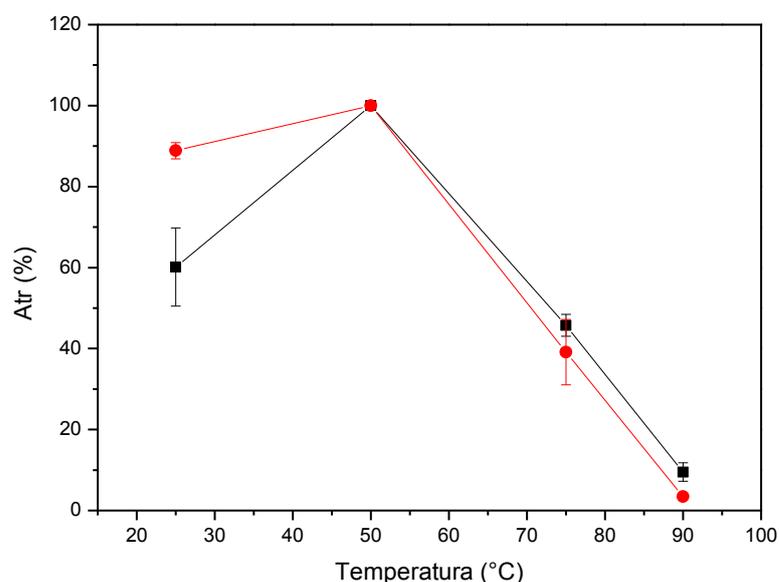


Figura 4.8. Efeito da temperatura na atividade da L-arabinose isomerase. (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As reações ocorreram em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6. Atividades máximas das LAI-DH10B e LAI-BL21, de $2,76 \pm 0,06 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,34 \pm 0,06 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente.

Observou-se que a enzima LAI-BL21 apresentou uma larga faixa de temperatura ótima na análise da atividade, entre 25 e 50 °C, podendo sua atividade ser analisada também a temperatura ambiente.

4.3.4.3. Estabilidade térmica e pH da enzima solúvel

Os ensaios de termoestabilidade foram conduzidos a 60 °C, durante 1 h de reação. Soluções enzimáticas foram incubadas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e

periodicamente alíquotas foram retiradas para medir a atividade residual em cada caso. Os resultados estão apresentados na Figura 4.9.

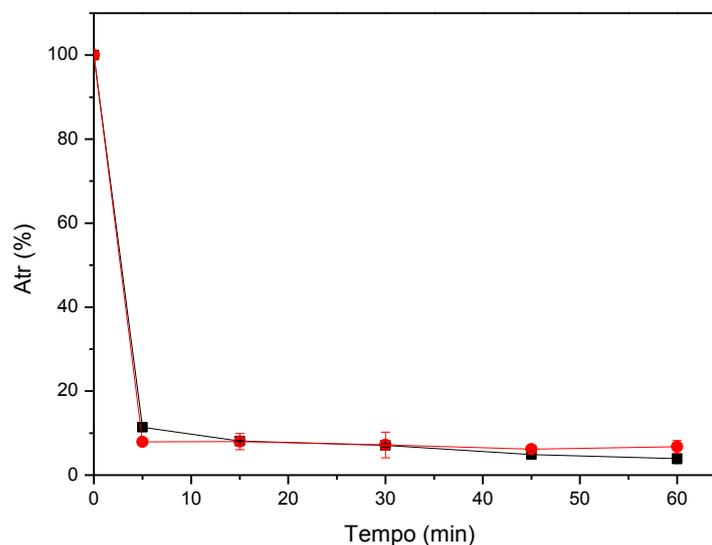


Figura 4.9. Estabilidade da L-AI, a 60 °C. (■) DH10B e (●) BL21. As reações ocorreram em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6.

Observou-se uma inativação térmica quase imediata a 60 °C das enzimas L-AI solúveis, em 5 min de análise, houve um decaimento de aproximadamente 90% da atividade das proteínas analisadas, não apresentando resistência a esta temperatura.

O efeito do pH sobre a estabilidade da L-AI recombinante de *Enterococcus faecium* foi investigado durante 2 horas de incubação à temperatura ambiente, em agitação constante. Utilizaram-se diferentes sistemas tampões (acetato de sódio, fosfato de sódio e bicarbonato de sódio) a 50 mM em pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0), na presença do cofator $MnCl_2$ 1mM. A L-AI apresentou boa atividade em todas as faixas de pH testadas (5,6 - 10,0). Para as amostras de enzimas do extrato enzimático a partir de DH10B, a atividade enzimática foi mais estável em condições de pH 5,6; 6,0; 7,0 e 8,0, mantendo-se 100% da atividade oferecida inicial, enquanto a estabilidade da enzima reduziu aproximadamente 37% a pH 10,0. Para o extrato enzimático da LAI-BL21, ocorreu uma redução mínima, de aproximadamente 3% na faixa de pH 10,0 e sendo também muito mais estável nos demais pH estudados (Figura 4.10).

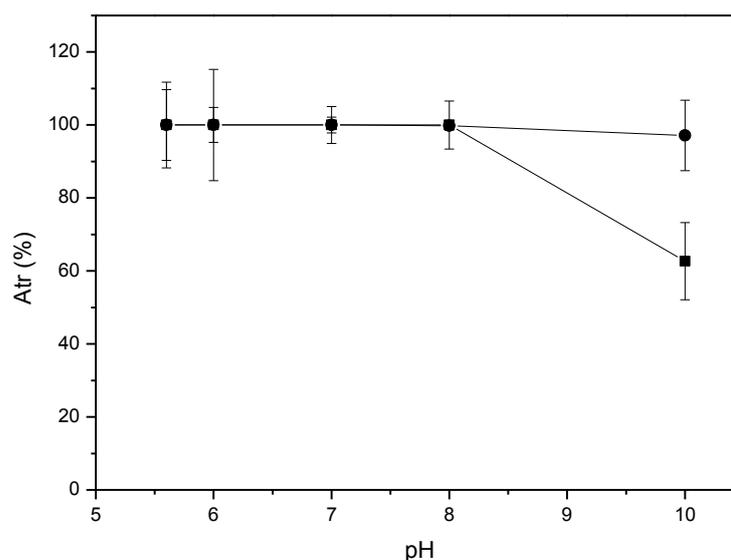


Figura 4.10. Efeito do pH na estabilidade da L-arabinose isomerase recombinante (■) DH10B e (●) BL21 (DE3). As amostras de enzima foram incubadas em sistemas tampões de pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) a 50 mM.

Staudigl *et al* (2014) estudaram a estabilidade da L-arabinose isomerase de *Lactobacillus reuteri* a diferentes pH (de 4 a 10). Obtiveram um ótimo a pH mais ácidos, considerando este fato alguma vantagem para fins industriais, pois evita a formação de subprodutos. Hung *et al* (2014) demonstraram que a estabilidade frente ao pH da L-AI de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* também manteve-se estável em uma gama de pH 5,5 a 10,5.

4.3.4.4. *Rendimento de bioconversão de D-galactose em D-tagatose utilizando L-arabinose isomerase*

O extrato bruto (rompido e centrifugado) livre de células de *E. coli* DH10B e BL21, contendo L-arabinose isomerase, foi utilizado para a bioconversão de 0,4 M D-galactose em D-tagatose a 50 °C. A concentração máxima de conversão em D-tagatose obtida após a incubação da enzima livre de DH10B e BL21 foi de 105 mM e 46 mM, respectivamente. O que correspondeu a 26% em 24 h e 11% de conversão em 48 h, para LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Enquanto os resultados da L-AI nativa nas mesmas condições reacionais, obteve menos de 1% de conversão em D-tagatose, durante 7h de reação (item 3.3.9).

A Figura 4.11 apresenta os resultados de produção de D-tagatose e conversão de D-galactose em função do tempo. Pode-se observar que a LAI-DH10B apresentou maiores conversões do que a LAI-BL21. No entanto, é importante salientar que o extrato enzimático da LAI-DH10B apresenta uma maior concentração de proteína e atividade enzimática, ver Tabela 4.4, o que leva a um aumento na velocidade da reação enzimática.

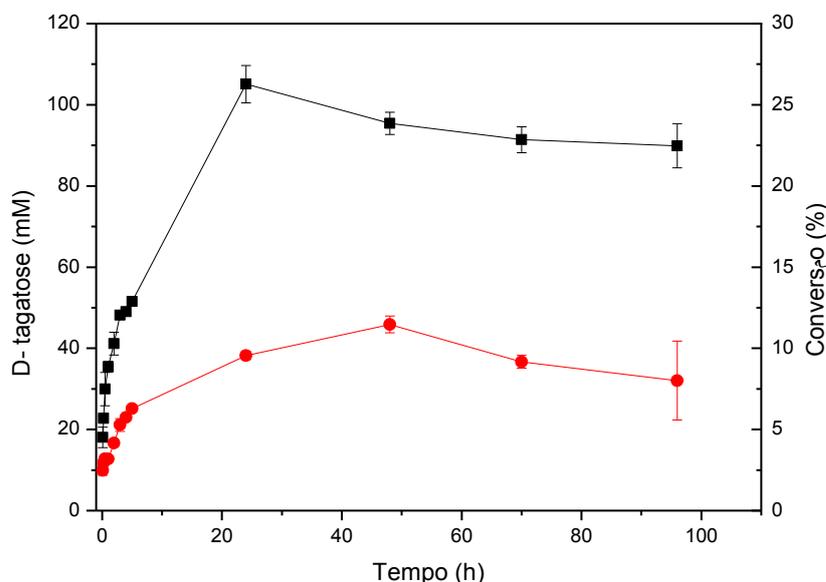


Figura 4.11. Síntese enzimática de D-Tagatose catalisada por L-arabinose isomerase de *E. coli* (■) DH10B e (●) BL21 em tampão acetato de sódio pH 5,6, 1 mM de cofator Mn^{+2} : concentração de produto e conversão de substrato (D-galactose, $S_0 = 400$ mM) em função do tempo de reação.

Rhimi *et al.* (2010) concluíram que enzimas provenientes de micro-organismos mesófilos apresentaram reduzidas taxas de conversão em D-tagatose, quando comparada às enzimas de fontes termófilas. Kim *et al.* (2002) demonstraram que o aumento da temperatura de reação (80 °C) promoveu o aumento da conversão até 68% de D-galactose em D-tagatose, utilizando L-AI de *Thermotoga neapolitana* para isomerização. Este resultado provavelmente foi favorecido pelo fato da enzima ser de origem hipertermofílica o que não pode ser visto em L-AIs de origem mesofílica (Roh *et al.*, 2000a; Oh *et al.*, 2001).

Embora existam diversos estudos buscando a otimização da atividade da enzima, a bioconversão de D-galactose em D-tagatose, em sua maioria, encontra-se na faixa de 28 a 50%, quando catalisadas pelas L-AIs de *Escherichia coli* (Hung *et al.*, 2014; Staudigl *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2000a; Oh *et al.*, 2001), *Geobacillus stearothermophilus* (Lee *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2006), *Geobacillus thermodenitrificans* (Kim e Oh, 2005),

Geobacillus thermodenitrificans (Kim *et al.*, 2006), *Bacillus stearothermophilus* US100 (Rhim e Bejar, 2006), *Thermotoga neapolitana* (Hong *et al.*, 2007), *Lactobacillus plantarum* SK-2 (Zhang *et al.*, 2007), *Arthrobacter sp.* 22c (Wanarska e Kur, 2012). Resultados de conversão acima de 50% são menos relatados, geralmente obtidos com enzimas proveniente dos micro-organismos *Thermus sp.* IM650 (Kim *et al.*, 2003), *Thermotoga marítima* (Lee *et al.*, 2004), *Geobacillus thermodenitrificans* (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

4.3.4.5. Influência da concentração de substrato (D-galactose) na velocidade inicial de reação de isomerização catalisada pela L-arabinose isomerase

Estudou-se a especificidade da enzima frente ao substrato D-galactose a 50 °C através da velocidade inicial da reação enzimática. Inicialmente, avaliou-se a validade do modelo de Michaelis-Menten utilizando o software Origin 8.1 e se observou um comportamento cinético michaeliano para a enzima LAI-DH10B e um comportamento que não obedece à cinética de Michaelis-Menten para a enzima LAI-BL21 (Figura 4.12 A e B). Aos dados de velocidade inicial obtidos para a LAI-DH10B pode-se ajustar um modelo cinético do tipo hiperbólico (Michaelis-Menten). Já o perfil de velocidades obtido usando a LAI-BL21 apresentou uma curva de saturação sigmoidal. Este comportamento sigmoidal é mais comum nas enzimas multiméricas, que apresentam diversas zonas de interação com o substrato (Ricard *et al.*, 1987), resultado este corroborado pela análise de ultracentrifugação analítica, confirmando que a enzima é hexamérica (dados expostos no próximo capítulo desta tese). Segundo Lehninger & Cox (1995), o comportamento cinético sigmoide geralmente reflete interações cooperativas entre as diferentes subunidades protéicas, podendo provocar uma alteração conformacional na estrutura da enzima.

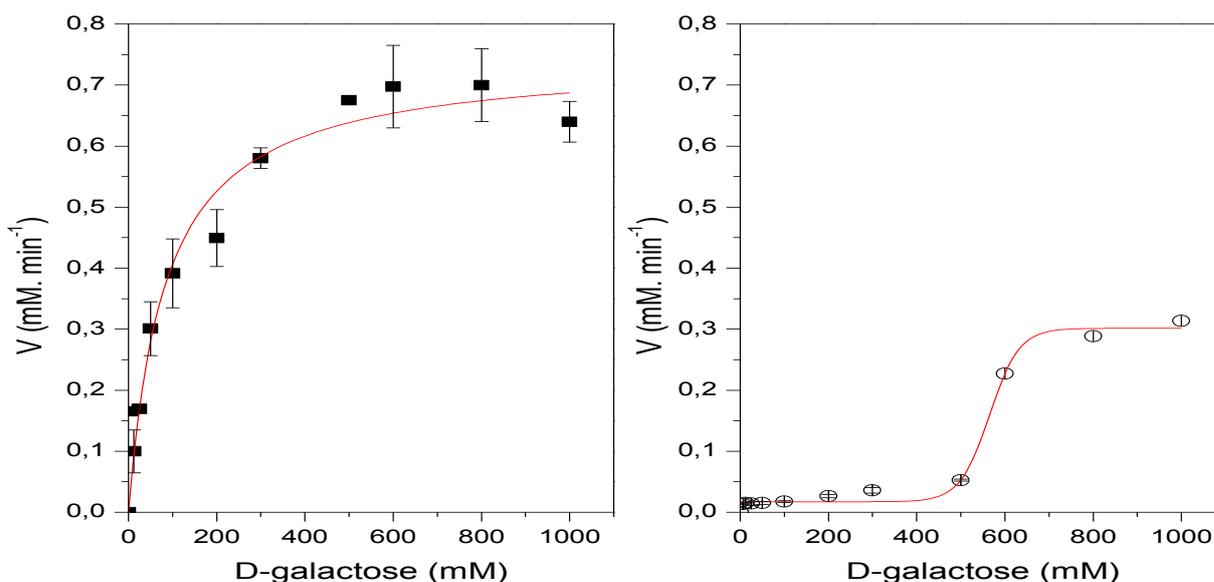


Figura 4.12. Influência da concentração de substrato (D-galactose) na velocidade inicial de reação de isomerização catalisada pela L-arabinose isomerase de *E. coli* (■) DH10B e (○) BL21 (DE3). As linhas representam o ajuste de um modelo hiperbólico (A) e de um modelo sigmoidal (B) usando o software Origin 8.1.

A diferença observada no comportamento cinético das duas enzimas se deve, provavelmente, aos fenômenos de expressão e interação da enzima nos hospedeiros em que foram clonados, assim como, a posterior recombinação com as His em cada um dos extremos.

A partir do ajuste mostrado na Figura 4.12, foi possível calcular os parâmetros cinéticos para as enzimas recombinantes. A LAI-DH10B apresentou valores de $K_m = 83,1$ mM e $V_{MÁX} = 0,74$ mM.min⁻¹. A LAI-BL21 apresentou $K_{0,5} = 565,0$ mM e $V_{MÁX} = 0,30$ mM.min⁻¹.

4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

As etapas de clonagem e expressão heteróloga em *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) foram bem sucedidas, com elevada presença da expressão protéica, resultando em quantidades satisfatórias de L-arabinose isomerase na forma solúvel e facilmente purificável, com características bioquímicas (pH e temperatura) similares à da enzima nativa. A técnica de eletroforese em SDS-PAGE, demonstrou que as proteínas recombinantes apresentaram massas molares próximas à da enzima nativa. No entanto, os ensaios cinéticos e os rendimentos de bioconversão de D-galactose em D-tagatose, mostraram uma diferença na

atuação das duas enzimas recombinantes. A conversão máxima em D-tagatose correspondeu a 26% em 24 h e 11% em 48 h, para LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente.

Capítulo 5

*Resultados: Purificação da L-
Arabinose Isomerase recombinante
de Enterococcus faecium*

5. PURIFICAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE DE *Enterococcus faecium*

Este capítulo descreve resultados da purificação da proteína L-arabinose isomerase recombinante, através da cauda de seis histidinas em sua extremidade do C-terminal ou N-terminal, mediante cromatografia de afinidade. Para isto, os resíduos de histidinas terão uma alta afinidade a colunas cromatográficas de metal quelato, em princípio, com uma afinidade muito maior que as proteínas naturais também produzidas pela bactéria hospedeira. Assim, as proteínas são adsorvidas a matrizes de metais quelatos e posteriormente, são eluídas, com um gradiente de imidazol, primeiramente as proteínas naturais, seguido das proteínas recombinantes, com um elevado grau de pureza (Pessela, 2002).

5.1. OBJETIVOS

Tratou-se de avaliar suportes cromatográficos (quelato metálicos), a base de agarose, de fácil implementação industrial, para a completa purificação da enzima, levando em conta os parâmetros de notável relevância industrial: a adsorção e dessorção seletiva da enzima.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. *Materiais*

Agarose 4 BCL. Epiclorhidrina, ácido iminodiacético (IDA), periodato de sódio da SIGMA. Diferentes reagentes de grau analítico de distintas marcas comerciais.

5.2.2. *Preparação do extrato protéico*

L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*, fusionada no domínio de polihistidinas, o vetor pET29a conferiu à proteína de interesse a fusão de uma cauda de seis histidinas na extremidade do C-terminal, enquanto o vetor pBAD foi construído com uma

sequência de seis histidinas localizadas na região do N-terminal. Diluiu-se o 1 mL do extrato bruto das L-AI de *Enterococcus faecium*, em 9 mL tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.

5.2.3. Ativação do suporte para formação de agarose-epóxido

Utilizando epicloridrina, a metodologia consistiu na adição de uma solução contendo 32,8 g de NaOH e 2 g NaBH₄ em 440 mL de água destilada à 100 g de agarose 4BCL, previamente lavada com água destilada. Preparou-se uma solução de 110 mL de epicloridrina e 160 mL de acetona, a frio, que foi adicionada lentamente à solução anterior. Manteve-se sob suave agitação por 16 h a temperaturas em torno de 25 °C, Figura 5.1. Depois deste tempo, o suporte foi lavado com uns 2 L de água destilada e seco a vácuo. Para conseguir o grau de ativação desejado, é necessário ter um controle estrito dos tempos e da temperatura de reação na ativação do suporte (Bolivar *et al.*, 2010).

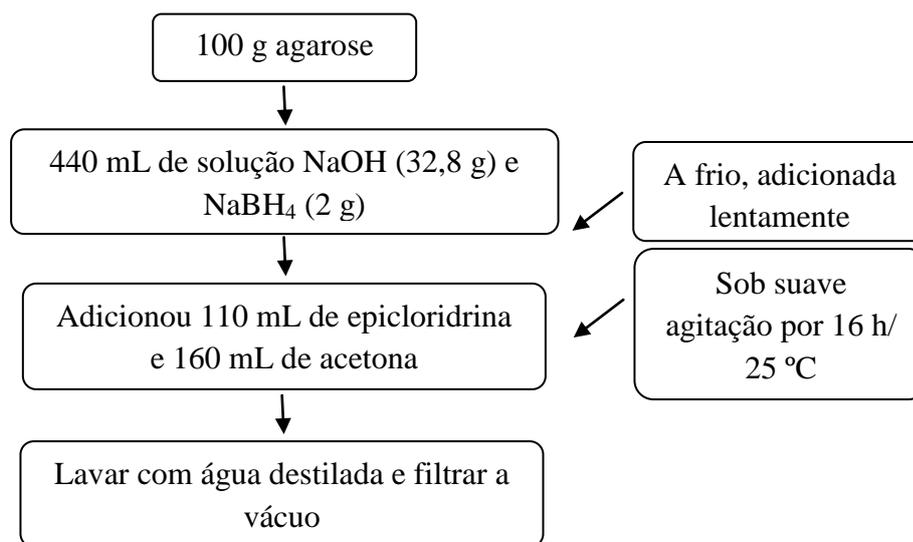


Figura 5.1. Fluxograma demonstrando a ativação via epicloridrina dos géis preparados.

5.2.4. Preparação dos suportes quelato-epóxido

Os suportes agarose-epóxido ativados com epicloridrina reagiram com um sal ácido iminodiacético (IDA) e posteriormente o produto resultante reagiu com sais de alguns metais de transição (Níquel e Cobre) para a formação do suporte agarose quelato metálico correspondente, de acordo com o descrito na literatura (Armisen *et al.*, 1999 e Pessela, 2002).

5.2.4.1. Suporte iminodiacético (IDA) epóxido (Agarose-IDA)

Realizou-se a preparação dos suportes de ácido iminodiacético (IDA) de acordo com Armisen *et al.*, 1999 e Pessela, 2002. Inicialmente, preparou-se uma solução de IDA 0,5 M em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 11 (13,31 g de IDA dissolvidos em 200 mL de tampão bicarbonato), ajustou-se para pH 11 com NaOH (20 g de gel agarose-epóxido: 200 mL de solução de IDA). A reação ocorreu durante 12 h em agitação constante, a 25 °C. Posteriormente, o suporte agarose-IDA foi filtrado e lavado com aproximadamente 1 L de água destilada e seco a vácuo. Desta forma obteve-se o suporte agarose previamente ativado, com ativação total com grupos IDA, para a preparação dos suportes IDA-quelato metal. Quando se necessitou de uma ativação parcial, a reação transcorreu por 2 h.

5.2.4.2. Suporte IDA-Cu-epóxido e IDA-Ni-epóxido

Para preparação do suporte IDA-Cu-epóxido, a partir do suporte anterior, agarose-IDA, incubou-se em 5 mg.mL⁻¹ de CuSO₄ dissolvidos em água destilada (10 g de gel agarose-IDA: 100 mL de solução de CuSO₄). Para preparação do suporte IDA-Ni-epóxido, incubou-se géis de agarose-IDA a 5 mg.mL⁻¹ de NiCl₂ dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 contendo 1 M de NaCl (10 g de gel agarose-IDA: 100 mL de solução de NiCl₂: 0,1g de NaCl). Agitou-se suavemente durante 2 h, a 25 °C. Finalmente, os suportes foram lavados com 1 L de água destilada e secos a vácuo, Figura 5.2.

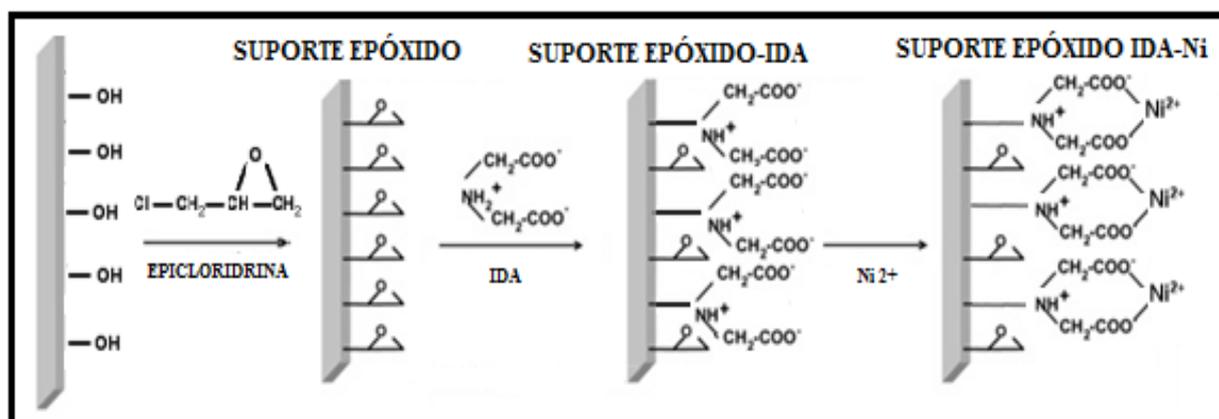


Figura 5.2. Esquema de ativação por epícloridrina, acoplamento do agente quelante (IDA) e imobilização de íon metálico (Ni^{2+}) em matrizes poliméricas. Fonte: Bresolin *et al.*, 2009.

5.2.5. Purificação da proteína por cromatografia de afinidade

Nestes ensaios, avaliou-se a concentração de imidazol para a eluição da proteína durante a etapa de cromatografia por afinidade por íons metálicos imobilizados (Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography–IMAC), em suportes Agarose-Ni e Agarose-Cu, através da interação de poli Histidinas em seus extremos N-terminal e C-terminal, facilitando sua purificação por este mecanismo. O desempenho da purificação foi monitorado por análise em gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. Todas as etapas de purificação foram realizadas a temperatura ambiente (Pessela, 2002).

5.2.5.1. Adsorção

A 1 g de cada suporte IDA-metal-quelato, adicionaram-se 10 mL de uma solução de extrato bruto contendo as LAI-DH10B e LAI-BL21, em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 com adição de NaCl 150 mM. A reação ocorreu à temperatura ambiente, com agitação constante. Conduziu-se um experimento controle, para se avaliar a provável desativação da enzima nas mesmas condições de imobilização.

A atividade enzimática do sobrenadante da imobilização foi periodicamente analisada, em intervalos curtos de tempo, a fim de avaliar a adsorção da enzima L-AI no suporte IDA-metal-quelato. Assumiu-se 100% de adsorção quando não se detectou atividade no sobrenadante da imobilização (medida em espectrofotômetro a 560 nm). Os resultados foram avaliados através da atividade relativa (Atr), que significa a porcentagem da atividade enzimática do ensaio em relação à maior atividade enzimática observada, e do rendimento de imobilização, que foi também acompanhado pelo desaparecimento da proteína no sobrenadante da imobilização no processo de adsorção (Pessela, 2002).

5.2.5.2. Dessorção

A eluição da enzima L-AI foi realizada aplicando-se um gradiente crescente de imidazol (25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 350 e 400 mM), em volume de 5 mL, a intervalos de 30 minutos para cada concentração e à temperatura ambiente. Avaliou-se a dessorção por medida de atividade enzimática e medida de proteína (Bradford, 1976), no sobrenadante. A

enzima dessorvida foi dialisada contra tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0, para eliminar o excesso de imidazol, quando necessário.

5.2.6. Determinações do tamanho e da forma da proteína L-AI por ensaios em ultracentrífuga analítica

Os ensaios para determinação do tamanho e forma hidrodinâmica aproximada, assim como para a caracterização qualitativa e quantitativa das associações das proteínas, foram conduzidos de acordo com Pessela *et al.* (2003b) e Pessela (2002). Os experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados no Laboratorio de Ultracentrifugación Analítica y Interacciones Macromoleculares, C.S.I.C, Madrid, em colaboração com o Dr. Benevides Costa C. Pessela João.

Os ensaios de velocidade de sedimentação foram realizados a 72.446 x g a 20 °C em ultracentrífuga analítica XLI (Beckman-Coulter, Inc.), equipado com um dispositivo de absorção óptica UV visível, longitude de onda 285 nm, utilizando o rotor An50Ti. Três concentrações da proteína purificada foram oferecidas (0,1; 0,22; 0,43 g. L⁻¹ para LAI-DH10B e 0,1; 0,15; 0,3 g. L⁻¹ para LAI-BL21), diluídas e equilibradas em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. A distribuição dos coeficientes de sedimentação(s) foi calculada por modelo de mínimos quadrados dos dados de velocidade de sedimentação, utilizando o programa computacional SEDFIT 14.6e (Pessela *et al.*, 2003b).

O fluxo da sedimentação da proteína submetida a um campo centrífugo é representado pela equação de Lamm.

$$J = s\omega^2rw - D \frac{\partial w}{\partial r} \quad (6)$$

Sendo J corresponde ao fluxo de sedimentação em unidades de massa/área/tempo; ω é a velocidade angular aplicada; r a posição radial e w a concentração do soluto em peso. Os coeficientes de sedimentação (s) e difusão (D), são dados pelas equações 7 e 8:

$$s = \frac{M(1 - v\rho)}{N_A f} \quad (7)$$

$$D = \frac{R \cdot T}{N_A f} \quad (8)$$

Sendo v o volume específico parcial, ρ a densidade do solvente, M a massa molecular; T a temperatura absoluta; R a constante dos gases ideais; f o coeficiente de fricção translacional e N_A o número de Avogadro.

A relação do parâmetro friccional (f/f_0), dado pelo programa de cálculo computacional SEDFIT 14.6e, revela uma ideia aproximada da forma hidrodinâmica da proteína. O valor mínimo de f/f_0 é 1,2 e corresponde a uma proteína esférica, quanto maior o valor de f/f_0 a partir de 1,2, mais alongada é a proteína estudada.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Purificação da L-AI de *Enterococcus faecium* através de cromatografia de afinidade sobre quelatos metálicos

5.3.1.1 Adsorção

Estudou-se a cinética de adsorção da enzima L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*, em suportes quelatos (Agarose-IDA-Ni e Agarose-IDA-Cu), ver Figura 5.3. Pode-se observar, em todos os ensaios realizados, uma redução gradativa da atividade no sobrenadante com o decorrer do tempo. Indicativo este, de que a enzima está adsorvida ao suporte.

Os resultados deste experimento demonstraram que os suportes estudados permitiram rendimentos de adsorção quantitativos, imobilizando-se ambas as enzimas (LAI-DH10B e LAI-BL21) em um curto intervalo de tempo, aproximadamente 30 min. Excetuando para o quelato ativado com níquel na imobilização da proteína LAI-BL21, que adsorveu-se lentamente, em torno de 60% do total da proteína oferecida depois de 30 minutos. Alcançando-se melhores resultados após 3 horas de adsorção, obtendo-se aproximadamente 90% de rendimento (Figura 5.3).

Em paralelo, a amostra controle da solução enzimática de LAI-DH10B apresentou uma leve redução da atividade enzimática durante o procedimento de imobilização, cerca de 20%. Enquanto, o controle com a enzima LAI-BL21 permaneceu estável durante todo procedimento de imobilização, por 180 min.

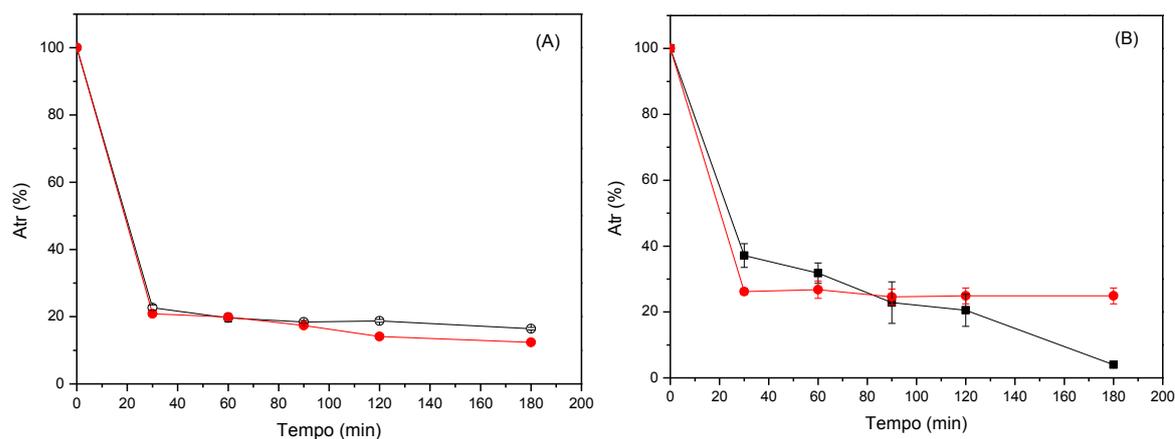


Figura 5.3. Processo de adsorção do extrato bruto da *L-AI* de *Enterococcus faecium*, (DH10B e BL21), representados respectivamente A e B, sobre suportes quelato ativado com cobre (●) e níquel (■) com o mesmo grau de ativação. O processo de adsorção realizou-se a pH 7,0 e a temperatura ambiente.

Observou-se que a velocidade de adsorção das proteínas estudadas foi muito alta utilizando os dois suportes quelatos tanto com cobre quanto com níquel, alcançando-se velocidades de adsorção muito similares (Figura 5.3 e Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Cinética de adsorção da L-arabinose isomerase procedentes de DH10B e BL21 sobre suportes quelatos com Níquel e/ou Cobre, com o mesmo grau de ativação.

Tempo (min)	Adsorção da proteína ao suporte (%)			
	LAI-DH10B		LAI-BL21	
	Ag-IDA-Ni	Ag-IDA-Cu	Ag-IDA-Ni	Ag-IDA-Cu
0	0	0	0	0
30	77,3	79,1	62,8	73,8
60	80,4	80,1	68,2	73,2
90	81,6	82,6	77,1	75,4
120	81,2	85,9	79,5	73,3
180	83,6	87,6	95,9	75,1

A adsorção da enzima LAI-DH10B, ao suporte Agarose-IDA-Ni e Agarose-IDA-Cu, ocorreu na primeira hora de adsorção, alcançando rendimentos de imobilização próximos

a 80%, em ambos os suportes estudados, e após 3 horas de adsorção os rendimentos foram de 84% e 88%, respectivamente.

Para a enzima LAI-BL21, a imobilização ocorreu mais lentamente. Em 1 hora de adsorção somente 68% da enzima se adsorveu ao suporte Agarose-IDA-Ni e 73% no suporte Agarose-IDA-Cu. Após 3 horas de imobilização os rendimentos aumentaram para 96% e 75%, em Agarose-IDA-Ni e Agarose-IDA-Cu, respectivamente.

5.3.1.2 Dessorção

Na Figura 5.4 estão apresentadas as curvas de dessorção de proteínas totais e atividade enzimática das L-AIs imobilizadas em suportes com quelatos de cobre e níquel, obtidas com concentrações crescentes de imidazol em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 (25 a 400 mM). Observou-se que com concentrações de imidazol muito baixas, entre 25 e 50 mM de imidazol, conseguiu-se obter eletroforeticamente as enzimas puras das duas cepas de *E. coli*, o que bioquimicamente é muito importante, já que evitou-se assim, um segundo passo que seria uma diálise, para eliminar uma grande concentração de imidazol na solução enzimática, pois esta etapa poderia desnaturar a enzima e também encarecer o produto final.

Os ensaios realizados com a L-arabinose isomerase procedente de DH10B sobre suportes quelatos com Níquel e Cobre, apresentaram comportamentos semelhantes na dessorção das proteínas totais e na enzima de interesse (Figura 5.4 A e B). Após 50 mM de imidazol ocorreu uma brusca redução tanto da concentração de proteínas quanto da atividade enzimática da L-AI, obtendo-se, no ponto máximo, atividades específicas de 0,083 U. mg⁻¹ e 0,036 U. mg⁻¹, para LAI-DH10B sobre suportes quelatos com Níquel e Cobre, respectivamente.

Para os experimentos realizados com a L-arabinose isomerase procedentes de BL21 sobre suporte quelato com Níquel e Cobre, observou-se um pico de dessorção da enzima L-AI utilizando 50 mM de imidazol, obtendo-se, neste ponto máximo, atividades específicas de 0,023 U. mg⁻¹ e 0,017 U. mg⁻¹, respectivamente. Observa-se ainda uma redução gradativa das concentrações de proteínas totais e enzimática após a concentração de 50 mM de imidazol. No entanto, os valores de atividade enzimática são expressivos, mesmo com reduzidas concentrações de proteína totais (Figura 5.4 C e D). Neste caso, a enzima foi lentamente se dessorvendo do suporte. Notou-se que em baixas concentrações de proteína, em torno de 3,9%, observou-se uma atividade relativa de aproximadamente 80%, que se deve,

possivelmente à presença da enzima purificada nestas frações eluídas, mesmo que em baixas concentrações de proteína (Figura 5.4 D).

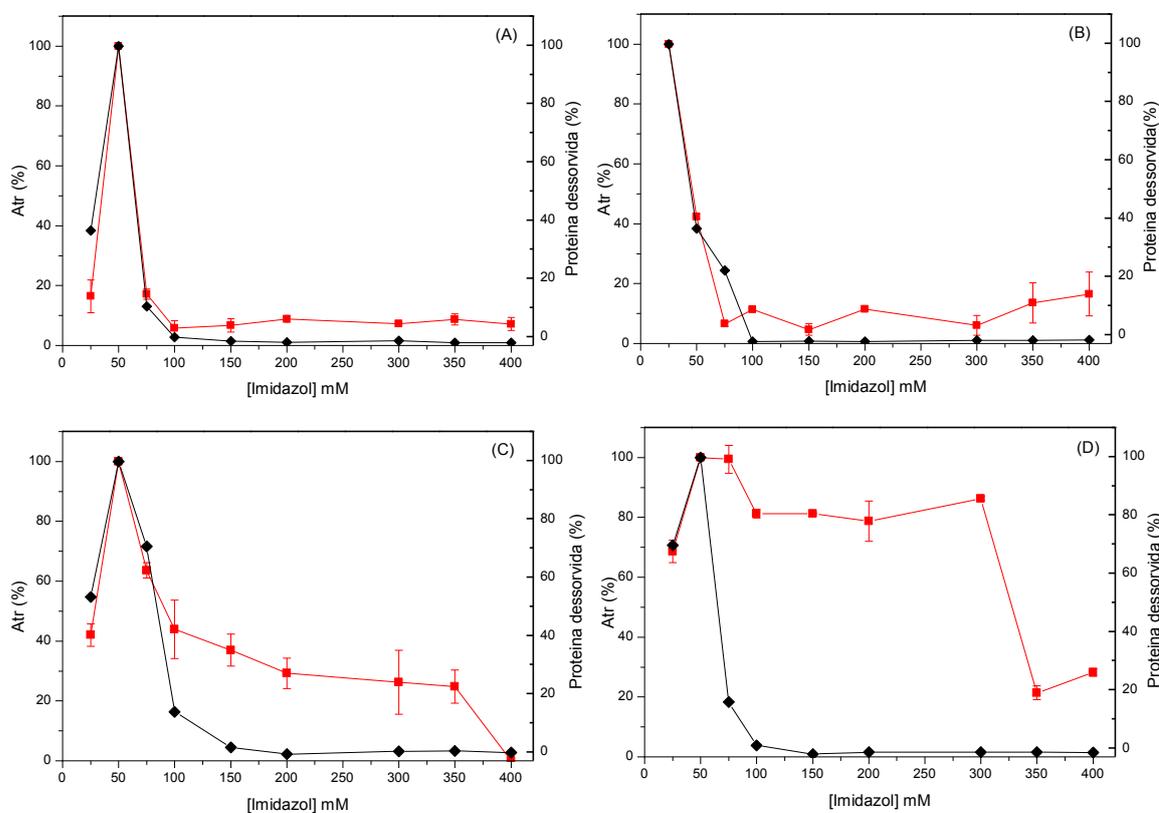


Figura 5.4. Dessorção da L-AI de *Enterococcus faecium*, adsorvida aos suportes quelato de níquel e cobre. As condições de reação estão descritas no item 5.3.5.1.2 de métodos. (■) Atividade relativa da L-AI. (◆) Proteínas totais desorvidas. (A) e (B) - L-arabinose isomerase procedentes de DH10B sobre suportes quelatos com Níquel e Cobre, respectivamente. (C) e (D) - L-arabinose isomerase procedentes de BL21 sobre suportes quelatos com Níquel e Cobre, respectivamente.

As frações eluídas durante a técnica cromatográfica foram analisadas por SDS-PAGE. A Figura 5.5 apresenta a separação eletroforética em gel de poliácridamida SDS-PAGE 12% das frações eluídas da cromatografia de afinidade. Através desta análise pode-se comprovar a análise anterior (Figura 5.4), no qual podemos acompanhar o processo de purificação e tornou-se evidente a eluição da enzima de interesse em reduzidas concentrações de imidazol.

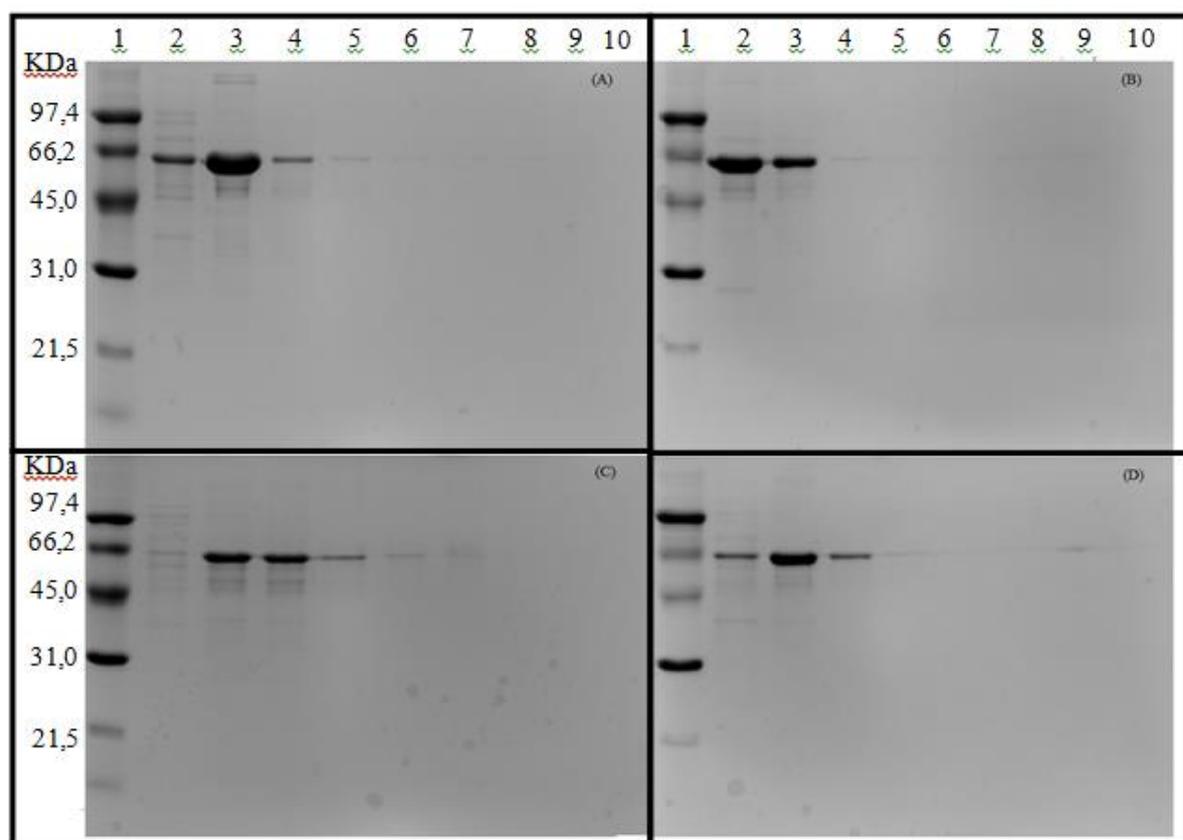


Figura 5.5. Análise por SDS-PAGE 12% do processo de purificação da L-AI de *Enterococcus faecium* sobre suportes quelato de Níquel e Cobre. A e B - L-arabinose isomerase procedentes de *E. coli* DH10B. C e D - L-arabinose isomerase procedentes de *E. coli* BL21 (DE3). 1- padrão de peso molecular; 2 a 10- proteínas eluídas com concentrações crescentes de imidazol em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 (25 a 400 mM).

Durante o processo de adsorção, observou-se que a interação da enzima foi mais forte quando utilizou-se o suporte IDA-Ni. Esta observação foi feita no final do processo de dessorção, já que a concentração de imidazol utilizada para dessorver a enzima foi maior no suporte IDA-Ni que no suporte IDA-Cu. Este fato é devido, seguramente, a posição e disposição da cauda de Histidinas nas extremidades da fita proteica, já que ao estar mais ou menos disposta pode interagir mais forte ou não com o grupo IDA-Metal do suporte.

5.3.2. Influência de uma pré-lavagem seletiva com 15 mM de imidazol na purificação da L-AI de *Enterococcus faecium*

Depois de estudar o processo de adsorção/dessorção de proteínas recombinantes com caudas de Histidinas sobre suportes ativadas com quelato metálicos é aconselhável realizar uma pré-lavagem do suporte após a adsorção (Pessela, 2002), para eliminar e reduzir os níveis de contaminação com outras proteínas do extrato e favorecer assim o processo de dessorção. Desta maneira, eliminam-se muitas proteínas inespecíficas, que por algum mecanismo tenham adsorvido ao suporte, favorecendo assim uma dessorção mais simples, com menor quantidade de dessorvente, neste caso, imidazol, mantendo também a economia do processo. Portanto, realizou-se uma pré-lavagem com 15 mM de imidazol, seguido de dessorção das enzimas com 50 mM de imidazol, para L-AI adsorvida em agarose-IDA-Ni, e L-AI adsorvida em agarose-IDA-Cu.

Observaram-se melhores resultados na purificação da enzima LAI-BL21, com maiores valores da atividade específica da purificação utilizando as resinas de Ni e Cu, respectivamente, de 0,092 e 0,079 U.g⁻¹. Também foi notado que a pré-lavagem dos suportes após a adsorção da enzima, favoreceu mais a LAI-BL21, visto através da atividade específica, sem o procedimento da pré-lavagem (dados mostrados no item anterior), enquanto que para a LAI-DH10B, esta pré-lavagem com imidazol, pouco influenciou na melhora da purificação.

A purificação da proteína recombinante foi alcançada em um único passo cromatográfico, utilizando os suportes bifuncionais agarose-quelato-metal. Esta técnica é empregada para purificação das proteínas recombinantes contendo uma cauda de polihistidinas que possuem afinidade ao metal imobilizado (Armisen *et al.*, 1999; Pessela, 2002; Tadeu *et al.*, 2009). Obteve-se uma menor presença de proteínas contaminantes após a purificação, o que demonstra que o processo de interação proteína-suporte é bastante seletivo visto pela redução da concentração de proteínas totais.

O fator de purificação neste processo faz com que a proteína total se reduza, removendo o máximo possível de proteínas inespecíficas, sendo que a perda desta proteína é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que diminua a atividade total (Lehninger, 1977).

Na Tabela 5.2, resumem-se os resultados gerais, assim como os rendimentos e fator de purificação obtido após a purificação das duas enzimas sobre quelato metálicos.

Tabela 5.2. Purificação da L-arabinose isomerase procedentes de DH10B e BL21 em suporte quelato de Níquel ou Cobre. Usando uma solução de imidazol (50 mM) durante a dessorção. Fator de purificação (FP) = Atividade Enzimática Específica Recuperada/ Atividade Enzimática Específica Inicial. Recuperação da atividade enzimática (RA) = Atividade Enzimática Recuperada/ Atividade Enzimática Inicial.

Etapas	Atividade (U. mL⁻¹)	Proteína (mg.mL⁻¹)	Atv. Específica (U.mg⁻¹)	FP	RA (%)
Extrato LAI-DH10B	2,10	72,28	0,029	1	100
Extrato LAI-BL21	0,99	28,13	0,035	1	100
Eluição da LAI-DH10B sobre Ag-IDA-Ni	0,67	47,42	0,014	0,48	31,9
Eluição da LAI-DH10B sobre Ag-IDA-Cu	0,80	21,66	0,037	1,28	38,0
Eluição da LAI-BL21 sobre Ag-IDA-Ni	0,95	10,32	0,092	2,63	95,9
Eluição da LAI-BL21 sobre Ag-IDA-Cu	0,79	9,99	0,079	2,25	79,8

Os resultados das purificações foram analisados através da eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e estão representados na Figura 5.6. Nesta eletroforese, o extrato bruto apresenta várias bandas em toda a extensão do gel, indicando que sua composição apresenta diversas proteínas. Já para a amostra purificada, nota-se que apenas uma banda está evidente mostrando que o processo de purificação em suporte-IDA-quelato foi satisfatório, apresentando significativa atividade enzimática para L-AI.

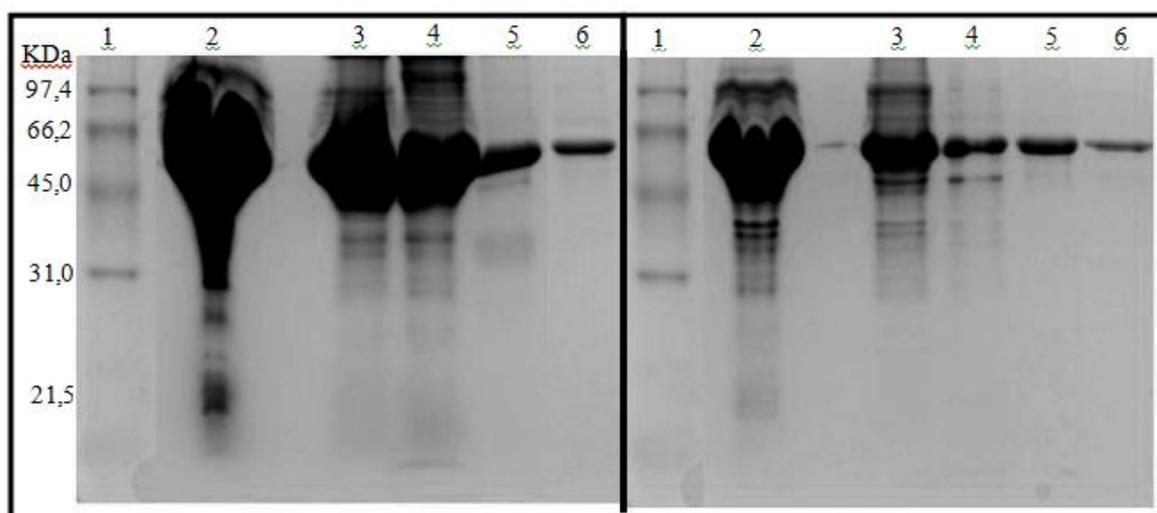


Figura 5.6. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação da L-arabinose isomerase procedentes DH10B e BL21. 1- Padrões de peso molecular; 2- Extrato bruto; 3- Etapa de Adsorção da enzima L-AI em suporte quelato IDA-Níquel; 4- Etapa de Adsorção da enzima L-AI em suporte quelato IDA-Cobre; 5- Etapa de Dessorção da enzima L-AI do suporte IDA-Níquel, com 50 mM de Imidazol; 6- Etapa de Dessorção da enzima L-AI do suporte IDA-Cobre, com 50 mM de Imidazol.

5.3.3. Estudos de interação da proteína com suportes glioxil para analisar possíveis presenças de multímeros da proteína

A fim de estudar a estrutura das proteínas (LAI-DH10B e LAI-BL21) produzidas neste trabalho, utilizou-se o suporte agarose-glioxil para a imobilização covalente e multipontual do extrato enzimático e posteriormente analisar por eletroforese em SDS-PAGE a possibilidade de estabilização da estrutura quaternária da enzima neste suporte (Mateo *et al.*, 2006; Fernández-Lafuente *et al.*, 1999, Pessela *et al.*, 2003). Escolheu-se este suporte, pois ele possui propriedades que favorecem uma forte ligação covalente multipontual das proteínas, como: alta reatividade dos grupos glioxil (aldeídos) com grupos amino não ionizáveis da enzima (Mateo *et al.*, 2006).

Neste estudo, duas hipóteses foram destacadas. Se a enzima for monomérica, irá estabilizar-se fortemente ao suporte por ligação covalente, de forma que, ao realizar a análise de eletroforese do derivado, a enzima não deverá desprender do suporte e conseqüentemente nenhuma banda da proteína estudada deverá aparecer na referida análise. Porém, quando a estrutura da enzima é multimérica, com várias subunidades, e que estas subunidades não

foram estabilizadas completamente ao suporte, é normal que apareça na análise de eletroforese alguma banda correspondente a qualquer subunidade da proteína estudada. Este experimento fornece uma idéia direta da possibilidade de que a proteína em estudo seja multimérica, devendo-se para tal, realizar estudos mais profundos para conhecer a real estrutura da enzima.

O resultado deste estudo está simplificado na Figura 5.7, demonstrada em gel de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Observou-se efetivamente, a presença da banda característica da proteína na eletroforese dos derivados sobre suportes glioxil, aproximadamente de 66 KDa, que foi provocado pela dessorção de alguma subunidade que não foi estabilizada no multímero, o que diretamente indicou que a L-AI seria uma proteína multimérica.

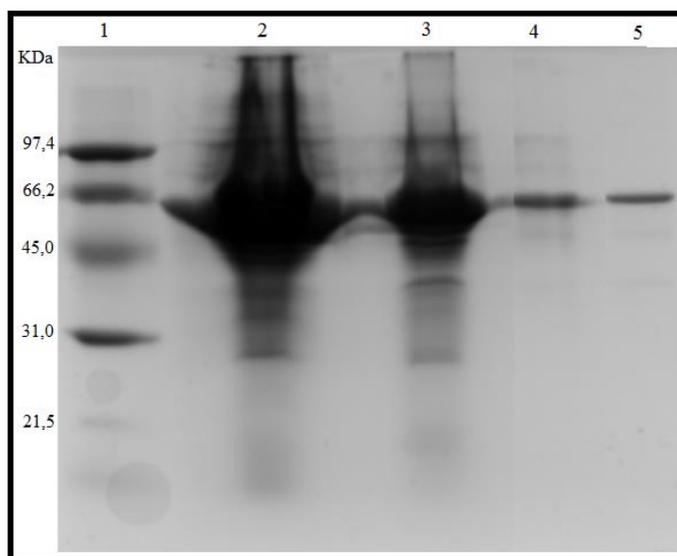


Figura 5.7. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS/PAGE), a 12%, dos derivados glioxil. **1-** Padrões de peso molecular; **2-** Derivado LAI-DH10B em glioxil-agarose; **3-** Derivado LAI-BL21 em glioxil-agarose; **4 e 5-** Subunidades das proteínas que não foram estabilizadas ao suporte glioxil, para LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente.

Fernández-Lafuente *et al* (1999), também estudaram a imobilização de enzimas multiméricas e afirmaram que a imobilização com a estabilização da estrutura quaternária de uma enzima multimérica de tetrâmeros ou mais, podem ser muito mais complexas que a estabilização de enzimas diméricas, por motivos geométricos. Os autores afirmaram que é impossível que todas as subunidades da enzima sejam covalentemente imobilizadas em uma superfície de suporte planar. Desta forma, propuseram uma estratégia dupla para estabilizar

proteínas complexas, imobilizando covalentemente as multi-subunidades e estabilizando os derivados com macromoléculas polifuncionais, evitando a dissociação das subunidades da enzima.

5.3.4. Análise da estrutura quaternária da L-AI por ultracentrifugação

Através da determinação da velocidade de sedimentação das moléculas, pode-se calcular o efeito da concentração das proteínas sobre o estado de associação, a massa molecular estimada, o estado de agregação das moléculas, a aproximação da forma hidrodinâmica (esférica ou alongada) da proteína. O anexo A mostra as velocidades de sedimentação e diagnóstico de associação da LAI-DH10B e LAI-BL21.

Diferentes estados oligoméricos da enzima foram encontrados durante o processo de ultracentrifugação. Os resultados dos ensaios demonstraram que as enzimas L-AI, apresentam comportamentos ligeiramente diferentes quanto às subunidades. As enzimas estudadas se apresentam na forma de monómeros, trímeros, tetrâmeros e hexâmeros em solução. À medida que o tempo e a velocidade foram aumentando, a possibilidade de surgirem formas mais complexas aumenta, já que a proteína pura vai formando agregados, que se tornam maiores com o passar do tempo, como demonstrado na Figura 5.8 (B), onde se vê uma banda típica de monômeros ($\cong 53,7$ kDa); trímeros ($\cong 129$ kDa), tetrâmeros (dados não mostrados) e finalmente multímeros maiores (a partir de 284 kDa) e assim sucessivamente até aparecerem novas estruturas se deixarmos mais tempo na ultracentrifugação.

O anexo B mostra um resultado do estudo da relação do parâmetro friccional (f/f_0) para aproximação da forma hidrodinâmica, e estimativa da massa molar da enzima. As estruturas predominantes na solução pura da LAI-DH10B foram de monómeros (55,2%), tetrâmeros (16,4%) e hexâmeros (24,2%) em condições de repouso e/ou a velocidade de ultracentrifugação moderadas. A relação friccional (f/f_0) para determinação da forma hidrodinâmica desta proteína analisada, foi mais propensa de encontrar formas alongadas com 1,2948, para os monómeros, 1,4210 para os tetrâmeros e 1,2999 para os hexâmeros. Na solução da LAI-BL21, predominaram monómeros (5,3%), trímeros (20,9%) e hexâmeros (45,2%). A relação friccional (f/f_0) para a estrutura hidrodinâmica desta proteína, apresentaram valores computacionais de 1,2138 com tendência a monómeros esféricos, 1,7023 para os tetrâmeros alongados e 1,3219 para os hexâmeros alongados.

Estes resultados sugerem fortemente que as enzimas puras LAI-DH10B e LAI-BL21, têm uma tendência para formação de estruturas com maior tamanho (oligômeros).

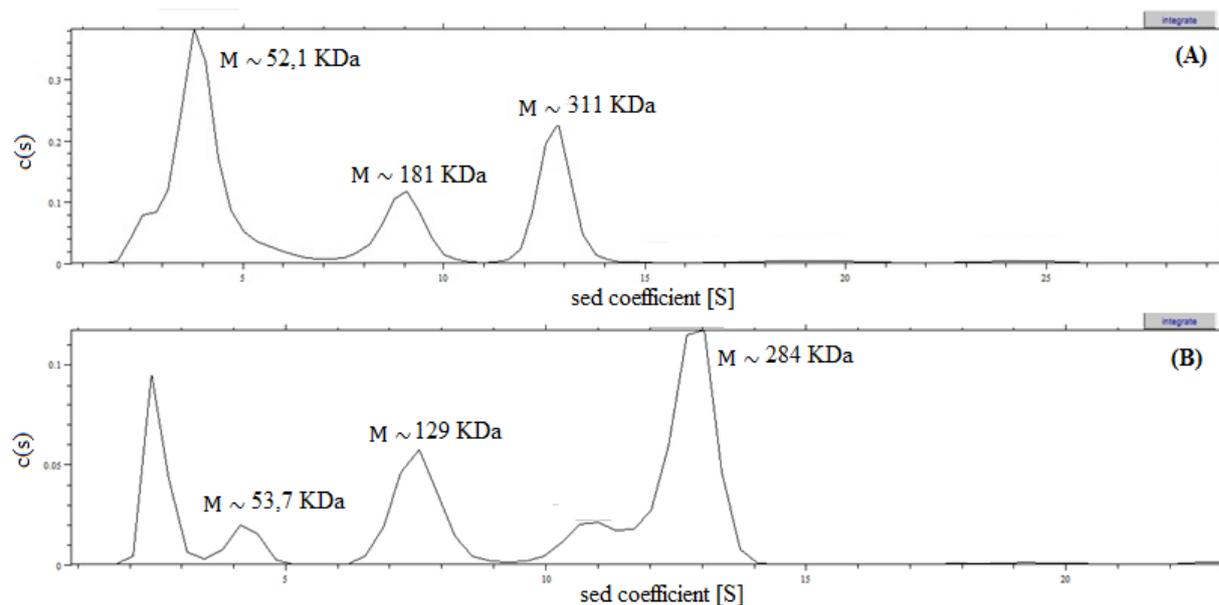


Figura 5.8. Distribuições dos coeficientes de sedimentação diferencial, $c(s)$, calculados por modelo de mínimos quadrados dos dados de velocidade de sedimentação, utilizando o programa SEDFIT, determinou-se o coeficiente de sedimentação, s , o qual é diretamente proporcional à massa das partículas. Análise da velocidade de sedimentação correspondeu a $0,43 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de proteína, respectivamente para enzimas puras LAI-DH10B (A) e LAI-BL21 (B).

Uma estimativa, aproximada das massas moleculares (M) das enzimas, também foi analisada (Figura 5.8). Na Figura 5.8 (A), para LAI-DH10B, o pico 3.9S foi compatível com massa teórica de monômero alongado, com coeficiente de sedimentação (s) de 3.8850×10^{-13} , o pico 8.9S foi compatível com massa teórica de tetrâmero alongado, apresentando um coeficiente de sedimentação (s) de 8.9200×10^{-13} , o pico 12.8S foi compatível com massa teórica de hexâmero alongado, apresentando um coeficiente de sedimentação (s) de 1.2777×10^{-12} . Na Figura 5.8 (B), para LAI-BL21, o pico 4.2S foi compatível com massa teórica de monômero esférico, com coeficiente de sedimentação (s) de 4.2020×10^{-13} , o pico 7.5S foi compatível com massa teórica de trímero alongado, com coeficiente de sedimentação (s) de 7.5530×10^{-13} , o pico 12.7S foi compatível com massa teórica de hexâmero alongado, com coeficiente de sedimentação (s) de 1.2740×10^{-12} . Observou-se que quanto maior o número de subunidades da molécula da enzima maior o coeficiente de sedimentação (s), que relaciona a medida da velocidade de sedimentação de uma substância através de um gradiente em

centrifugação, ou seja, quanto maior o coeficiente de sedimentação maior o valor da massa molar da partícula.

A técnica de ultracentrifugação analítica de sedimentação em equilíbrio também nos permitiu verificar a formação do diagnóstico de associação (ANEXO A). Foi estudado o estado de associação da enzima em solução por meio de velocidade de sedimentação. Os dados de sedimentação em equilíbrio para a L-AI confirmam seu estado oligomérico na forma de uma mistura de três espécies de massa moleculares diferentes em dissolução.

5.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

A cromatografia por afinidade foi desenhada de forma adequada, pois permitiu purificar a enzima L-AI em um só passo por adsorção seletiva sobre suportes ativados com grupos de Ni ou Cu. Baixas concentrações de imidazol foram suficientes para dessorver a enzima dos suportes, entre 25 e 50 mM de imidazol, apresentando-se como característica promissora para a aplicação em escala industrial.

Estudos na ultracentrífuga analítica indicaram que a enzima pura e concentrada tende a formar oligómeros, apresentando uma estrutura multimérica, que podem dificultar sua manipulação posterior. Esta análise permitiu-nos ainda estimar a massa molecular da enzima pura e a aproximação da forma hidrodinâmica (esférica ou alongada) da proteína.

Capítulo 6

*Resultados: Imobilização e
Estabilização da L-Arabinose
Isomerase de Enterococcus faecium*

6. IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE DE *Enterococcus faecium*

Procurou-se obter derivados ativos e estáveis para seu uso em processos tecnológicos complexos e capazes de suportar condições de reações drásticas, visando uma aplicação em processos industriais. Neste contexto, iremos discutir duas estratégias de imobilização: a imobilização covalente multipontual e adsorção iônica de enzimas em suportes preexistentes. Para a imobilização da L-AI em suportes epóxidos multifuncionais, utilizou-se um mecanismo de imobilização em duas etapas, adsorveu-se fisicamente a enzima através da região de maior densidade de histidinas, permitindo a orientação da enzima ao suporte, antes de sua imobilização covalente, conseguindo derivados com diferentes propriedades. Estudou-se também um dos primeiros protocolos de imobilização de enzimas aplicados a nível industrial, a adsorção iônica de enzimas a suportes ativados com grupos iônicos, com melhores propriedades quanto à estabilização dos derivados.

6.1. OBJETIVOS

O objetivo fundamental deste capítulo foi avaliar a imobilização da LAI-DH10B e LAI-BL21 utilizando protocolos de imobilização descritos na literatura como universais, ou seja, que não sirvam somente para uma determinada enzima, mas que sirvam para uma ampla gama de proteínas que possuam uma cauda de poli histidinas, através de uma imobilização dirigida. Desta forma, estudaram-se diferentes alternativas para a preparação de derivados imobilizados, tais como:

1. Protocolos combinados para purificação, imobilização e estabilização da enzima multimérica utilizando uma única técnica de imobilização sobre suportes heterofuncionais epóxido-metal quelato.
2. Protocolos de imobilização e estabilização por adsorção física das multisubunidades da enzima sobre suportes de carácter reversível.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Preparação de suportes multifuncionais a base de agarose

Neste trabalho avaliaram-se dois suportes a base de agarose, a saber: Ag-IDA-Ni-glioxil e MANAE-Agarose. O suporte epóxido multifuncional foi parcialmente modificado por diferentes grupos reativos, permitindo estabelecer interações proteína-suporte por diversos pontos da enzima (-OH, -NH₂, -SH) (Pessela, 2002).

6.2.1.1. Suportes IDA-Metal

A preparação do suporte IDA-Metal foi segundo (Armisen *et al.*, 1999, Mateo *et al.*, 2001, Pessela, 2002, Bolivar *et al.*, 2010, Mateo *et al.*, 2010), descrita anteriormente no Capítulo 5, desta tese.

6.2.1.2. Suportes MANAE-agarose

Primeiramente preparou-se o suporte epóxido-agarose, descrito no Capítulo 5. Posteriormente, o suporte foi oxidado com uma solução de periodato de sódio (NaIO₄) 100 mM dissolvidos em 1375 mL de água destilada. A suspensão foi gentilmente agitada por 90 min. Depois deste tempo, o suporte foi filtrado, lavado com 1 L de água destilada e seco a vácuo, dessa forma obteve-se o suporte epóxido-glioxil-agarose (Bolivar *et al.*, 2010). A preparação do suporte MANAE, seguiu-se segundo Fernandez-Lafuente *et al.* (1993), 10 g do suporte epóxido-glioxil-agarose foram suspensos em 100 mL de solução Etilenodiamina 2%, pH 8,5. A suspensão foi gentilmente agitada por 2 h. Posteriormente, 10 mg.mL⁻¹ de borohidreto de sódio (NaBH₄) foi adicionado e a suspensão foi reduzida, por mais 2 h. O gel reduzido foi filtrado e lavado com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 5,0, com 100 mL tampão bicarbonato de sódio 100 mM e NaCl 1 M, pH 10. Finalmente, lavou-se com 500 mL de água destilada.

6.2.2. Imobilização covalente multipontual

Imobilizou-se a L-AI ao suporte Agarose-IDA-Ni, por afinidade ao quelato. Preparou-se uma solução composta pela proteína de interesse em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0, a imobilização decorreu por aproximadamente 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se e secou-se o derivado. Posteriormente, o derivado foi adicionado a uma solução contendo tampão bicarbonato 100 mM a pH 10,0 (1:10 m/v). Para a formação de

ligações covalentes entre suporte e proteína de interesse, este tipo de ligação ocorre para suportes ativados a glioxil, esta reação foi conduzida por 6h. O suporte contendo a enzima previamente imobilizada covalentemente foi lavado com uma solução de ácido etilenodiamino (EDTA) 200 mM, para a retirada do metal, para evitar que ocorra uma provável oxidação no suporte com a próxima etapa de redução. Seguiu-se com a redução com boroidreto de sódio (NaBH_4) (1mg/mL) a frio por 15 minutos. Finalmente, lavou-se o derivado com água destilada.

6.2.3. Imobilização enzimática em suporte MANAE

Ressuspendeu-se 1 g de suporte em 10 mL de uma solução composta pela proteína de interesse em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. A imobilização foi conduzida a 25 °C por 12 h, sob agitação constante. Ofereceram-se 5 U.g^{-1} e 10 U.g^{-1} de solução de enzima aos suportes. Em paralelo aos ensaios, conduziu-se um experimento controle, para se avaliar a provável desativação da enzima nas mesmas condições de imobilização. As condições operacionais de temperatura e agitação foram mantidas constantes durante os experimentos.

6.2.4. Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram calculados como descrito anteriormente no item 3.2.17.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Imobilização em suportes quelato epóxido agarose

As enzimas L-AI que possuem uma sequência de poli His em seus extremos N-terminal (LAI-DH10B) e C-terminal (LAI-BL2), foram imobilizadas em suportes Agarose-IDA-Ni, adsorção por afinidade ao quelato metálico; Agarose-IDA-Ni-glioxil, por ligação covalente e em MANAE-Agarose, por adsorção iônica reversível. Foram oferecidas, igualmente, 15 U.g^{-1} de solução de enzima a cada um dos suportes. Os resultados da imobilização podem ser observados na Tabela 6.1. Observou-se que todos os derivados

apresentaram altos valores de rendimento de imobilização, acima de 75%, mas a atividade recuperada dependeu do sistema estudado. Maiores porcentagens na atividade recuperada foram obtidos com os derivados em suportes Ag-IDA-Ni, com 51,7% e 71,0% para as imobilizações das LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Essa diferença possivelmente está motivada essencialmente pelo fato da enzima expressar-se em cepas diferentes e possuir uma calda de histidinas em cada um dos extremos, podendo interagir com o suporte de forma diferente, mesmo sendo a mesma enzima e o mesmo gene de partida, originando resultados distintos.

Apesar dos derivados das L-AIs obtidos com os suportes MANAE-agarose, quando comparados com os derivados dos suportes Ag-IDA-Ni, apresentarem resultados ligeiramente inferiores quanto à atividade recuperada, com 46,0% e 49,0%, maiores rendimentos de imobilização foram alcançados, 87,3% e 88,6% para os derivados das LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. As enzimas imobilizadas covalentemente ao suporte heterofuncional, Ag-IDA-Ni-glioxil, apresentaram uma reduzida atividade recuperada, 1,47% e 14,1% para os dois derivados das LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Esta baixa atividade recuperada pode ter sido ocasionada pelo fato dos derivados terem sido lavados com EDTA, para a remoção do metal quelato, para evitar fenômenos de redução do mesmo metal, uma vez que se torna necessário a redução do derivado para estabilizar a interação da ligação amino-glioxil neste derivado.

Tabela 6.1. Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em suportes heterofuncionais (Ag-IDA-Ni-glioxil) e (MANAE). Carga enzimática oferecida de aproximadamente 15 U de enzima.g⁻¹ de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 145 mg de proteínas totais.g⁻¹ de suporte, sendo rendimento de imobilização (R_I), atividade recuperada (At_R). O derivado imobilizado covalentemente foi filtrado e lavado com uma solução de EDTA 200 mM, para a retirada do metal.

Amostras	Suportes	R _I (%)	At _R (%)
LAI-DH10B	IDA-Ni	80,9	51,7
	IDA-Ni-glioxil	80,9	1,47
	MANAE	87,3	46,0
LAI-BL21	IDA-Ni	75,1	71,0
	IDA-Ni- glioxil	75,1	14,1
	MANAE	88,6	49,0

Posteriormente repetiu-se o processo de imobilização evitando o processo de lavagem, os resultados resumem-se na Tabela 6.2. Verificou-se que o procedimento de lavagem com EDTA foi de fato prejudicial, uma vez que se observou um expressivo aumento na atividade recuperada. Alguns autores também concluíram que o EDTA é um forte inibidor da atividade enzimática da L-AI (Manzo, 2012; Cheng *et al.*, 2010; Rhimi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2005b).

Maiores cargas de enzima foram também oferecidas aos suportes, aproximadamente 24 U.g^{-1} , com o objetivo de visualizar a recuperação total conseguida da atividade do catalisador. Apesar do aumento na atividade recuperada, obteve-se um menor rendimento de imobilização em todos os suportes avaliados. Observou-se pela medida de atividade no sobrenadante da imobilização que, quando aumentamos a carga de proteína oferecida ao suporte, menos moléculas de enzima foram imobilizadas, possivelmente, leva-se a crer, que as enzimas imobilizaram-se rapidamente na superfície e na entrada dos poros do suporte, bloqueando assim a entrada de novas enzimas para o interior dos poros do suporte.

Nas condições avaliadas, os melhores resultados foram observados utilizando-se o suporte MANAE, com 100% e 50,3% de atividade recuperada na imobilização da LAI-BL21 e LAI-DH10B, respectivamente. No entanto, experimentos ainda são necessários para se concluir as melhores condições de imobilização. A imobilização reversível a suportes flexíveis com elevada densidade de porções de troca iônica tem sido o método mais adequado para a imobilização de proteínas, este fato deve estar relacionado à ausência de distorções na interação entre a enzima e o suporte, sendo que, deste modo, uma alta adsorção de proteínas sobre estes suportes de revestimento flexíveis promove uma distorção mínima da proteína, pois o polímero flexível adapta-se à enzima durante a intensa ligação multipontual (Pessela *et al.*, 2003a; Mateo *et al.*, 2000a). A partir deste ponto de vista, a imobilização "reversível" de enzimas em suportes flexíveis pode ser um protocolo muito conveniente para a imobilização de várias enzimas industriais, sendo capaz de promover a dessorção completa da enzima do suporte quando o derivado imobilizado tornar-se inativo, e assim continuar o processo de imobilização (Mateo *et al.*, 2000a).

Tabela 6.2. Parâmetros de imobilização da L-arabinose isomerase em suportes heterofuncionais (Ag-IDA-Ni-glioxil) e reversível (MANAE). Carga enzimática oferecida de aproximadamente 24 U de enzima.g⁻¹ de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 290 mg de proteínas totais.g⁻¹ de suporte, sendo rendimento de imobilização (R_I), atividade recuperada (A_{T_R}).

Amostras	Suportes	R _I (%)	A _{T_R} (%)
LAI-DH10B	IDA-Ni	55,5	37,3
	IDA-Ni-glioxil	55,5	43,3
	MANAE	60,4	50,3
LAI-BL21	IDA-Ni	56,5	81,7
	IDA-Ni- glioxil	56,5	55,9
	MANAE	42,0	100,0

Em relação aos parâmetros de rendimento e atividade recuperada (Tabela 6.2), observou-se também que, a imobilização por ligação covalente multipontual sobre o suporte Ag-IDA-Ni-glioxil pouco influenciou na melhora do catalisador, quando comparado com os demais derivados. No entanto, ainda se faz necessário avaliar se este protocolo permitiu a estabilização da enzima. Para trabalhar com enzimas multiméricas é importante estudar as técnicas de imobilização controladas e orientadas, não apenas para permitir a reutilização contínua da enzima, mas também para aumentar grandemente as propriedades da atividade das enzimas quanto à estabilidade, estudando a estabilização da estrutura quaternária dessas enzimas multiméricas. Portanto, o método que permite simultaneamente imobilizar e estabilizar todas as subunidades da enzima tem efeitos positivos sobre a estabilidade total do catalisador, utilizando técnicas de pós-imobilização (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999). Outro fator que possivelmente tenham ocorrido na imobilização covalente, seria uma redução da atividade enzimática a pH em torno de 10,0, este fato se deve a instabilidade da L-AI a pH 10,0 (dados analisados anteriormente). Além do efeito de impedimento estérico causado pela imobilização por ligações covalentes, mudanças conformacionais e distorções na estrutura tridimensional da molécula da enzima, especialmente no sítio ativo, provavelmente tornaram esse centro menos acessível, causando uma redução da atividade catalítica decorrente desta imobilização multipontual (Cardoso *et al.*, 2009). Estudos futuros, quanto à ativação do suporte, são importantes, pois segundo Blanco *et al* (1989), se a concentração de grupos glioxil for baixa, o rendimento de imobilização também será baixo.

Diante dos dados expostos de imobilizações, pode-se observar um melhor desempenho da LAI-BL21 (His no C-terminal) em todas as imobilizações testadas, apresentando-se valores superiores da atividade recuperada, em todos os suportes avaliados.

6.3.2. Estabilidade frente à temperatura da enzima L-AI imobilizada em diferentes suportes

A fim de se avaliar a estabilização da proteína após imobilização, estudou-se o efeito da temperatura e do tempo de incubação dos derivados em Ag-IDA-Ni, Ag-IDA-Ni-glioxil e MANAE-Agarose. Para estudar a estabilidade dos derivados obtidos, ofereceram-se 2 U de enzima. mL⁻¹ ao suporte, e incubou-se a 50, 60 e 70 °C, e alíquotas da suspensão foram analisadas durante o tempo, para se determinar a atividade enzimática. A Figura 6.1 mostram os resultados obtidos da incubação dos derivados a 50 °C por 300 min de reação. Pode-se observar que os derivados apresentaram comportamentos semelhantes de estabilidade térmica a 50 °C. Após 300 minutos de análise apresentaram uma atividade relativa de aproximadamente 60%.

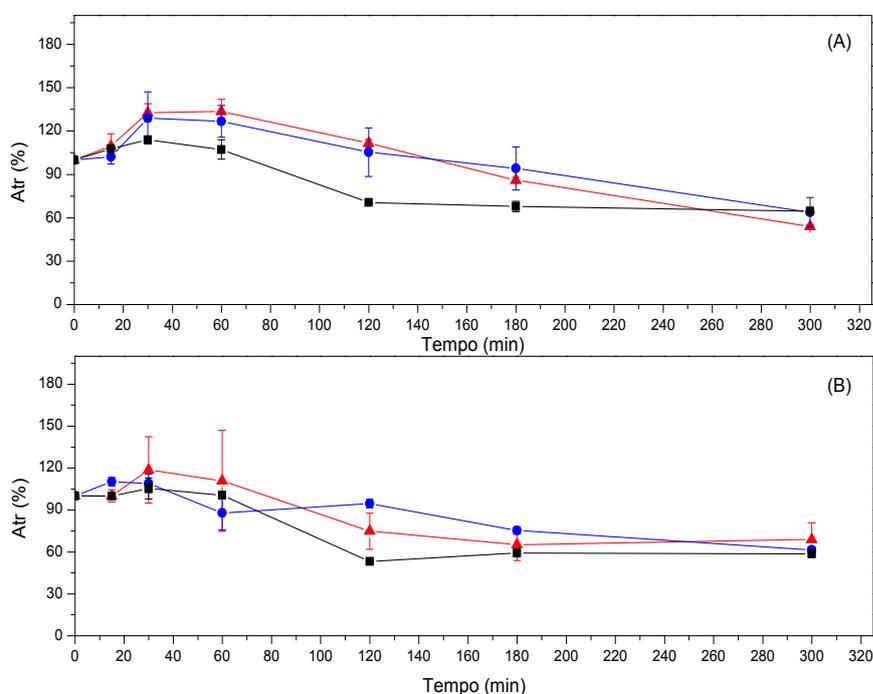


Figura 6.1. Influência da temperatura na estabilidade da LAI-DH10B (A) e LAI-BL21(B) imobilizadas a MANAE (■), em IDA-Ni (▲) e IDA-Ni-glioxil (●). Os derivados foram incubados a 50 °C em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.

Como as enzimas imobilizadas relativamente se mostraram estáveis a 50 °C, elevou-se a temperatura de análise para 60 °C e os resultados são apresentados na Figura 6.2 (A e B). Dentre todos os derivados avaliados, o preparado sobre o suporte MANAE, para as duas enzimas analisadas (LAI-DH10B e LAI-BL21), apresentou-se mais estável, mantendo aproximadamente 100% da atividade enzimática durante 60 minutos de incubação a 60 °C. Enquanto que, os derivados menos estáveis, foram os de Ag-IDA-Ni-glioxil, para ambas as enzimas testadas, com aproximadamente 70% da atividade enzimática durante 60 minutos avaliados. Sendo o derivado de Ag-IDA-Ni, um caso intermediário, obtendo-se uma estabilidade térmica a 60 °C de aproximadamente 80% para a enzima LAI-DH10B e 100 % para a enzima LAI-BL21, durante 60 min.

Pode-se ainda observar na Figura 6.2 (A e B) que a incubação da enzima imobilizada em MANAE a 60 °C levou a uma redução progressiva na atividade enzimática ao longo do tempo, caindo para 71% e 85% da atividade inicial após 180 minutos de incubação, para as LAI-DH10B e LAI-BL21, respectivamente. Nota-se ainda uma ligeira ativação térmica da enzima nos derivados em MANAE e Ag-IDA-Ni, mantendo-se sua atividade enzimática acima de 100%, nos primeiros minutos avaliados. Alguns autores também observaram esse efeito de hiperativação térmica, que foi relacionado com as propriedades intrínsecas de algumas enzimas durante o processo de estudo da estabilidade térmica (Pessela 2002; Pisan *et al.*, 1990; Coolbear *et al.*, 1992).

Em seguida, aumentou-se a temperatura de desativação para 70 °C e os resultados são mostrados na Figura 6.2 (C e D). Observou-se uma expressiva inativação térmica dos derivados que perderam 100% de suas atividades enzimáticas depois de 30 minutos de incubação.

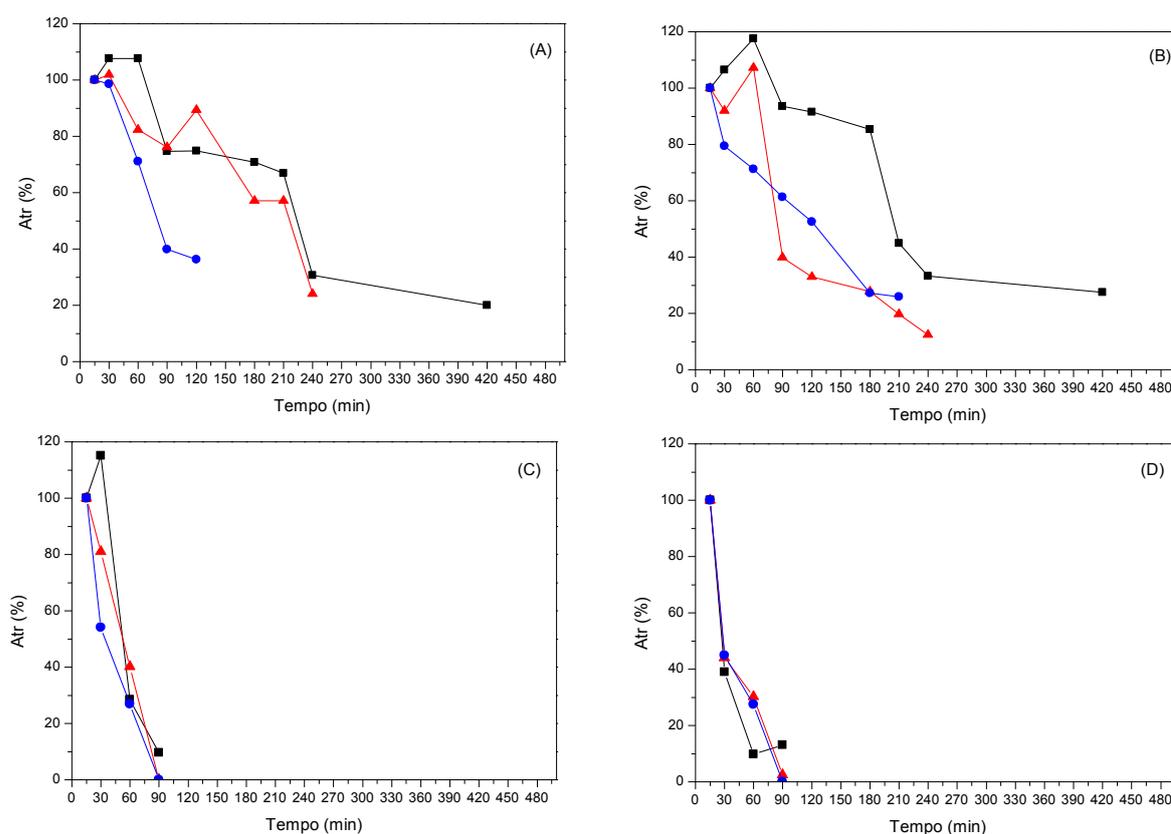


Figura 6.2. Influência da temperatura na estabilidade da LAI-DH10B (A) e (C); LAI-BL21 (B) e (D), imobilizadas a MANAE-agarose (■), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●). Os derivados foram incubados a 60 e 70 °C em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.

Diante dos dados, o derivado que apresentou melhores propriedades (mais estáveis e mais ativos) foi o imobilizado sobre o suporte MANAE-Agarose. Provavelmente, este comportamento superior na estabilização, deve ser devido à abundância de grandes áreas sobre a superfície da enzima com elevadas cargas negativas e, além disso, estas regiões da enzima são muito importantes para estabilizar a sua estrutura tridimensional. Este resultado leva ao entendimento de que esta imobilização ao suporte MANAE-Agarose, a enzima orientou-se em uma zona com uma densidade de cargas negativas muito grandes, comprovando-se que a força de união entre enzima e suporte foi superior à obtida com os outros suportes analisados, obtendo assim bons resultados nos respectivos derivados, refletindo na estabilidade térmica da enzima (Pessela, 2002). Silva *et al.* (2014) também obtiveram resultados semelhantes quanto a fatores significativos de estabilidade, apresentada pelos derivados sobre MANAE-Agarose em comparação com outros derivados, que

reforçaram o ponto de vista da utilização destes catalisadores imobilizados no processo biotecnológico.

A imobilização em Ag-IDA-Ni-glioxil apresentou uma reduzida estabilidade térmica, muitos são os fatores que explicam este comportamento, possivelmente a enzima não se encontrava fortemente ligada ao suporte, demonstrando que nem todas as suas subunidades estavam covalentemente unidas e estabilizadas (dados analisados anteriormente no Capítulo 5, através da imobilização em suportes glioxil).

Adriano (2008) estudou e concluiu que a estabilização de enzimas multiméricas parece ser muito mais complexa. Blanco *et al.* (1989) confirmou que, quanto menor o tempo de imobilização, a estabilidade do derivado possui um comportamento similar à enzima solúvel. Assim, a multiinteração requer um tempo de imobilização suficientemente grande para garantir maior nível de interação entre a enzima e o suporte, para evitar a inativação da enzima. Apesar da reduzida estabilidade térmica dos derivados testados, conferiu-se uma estabilidade muito maior que da enzima livre (dados exibidos no Capítulo 4), estes resultados fornecem evidências de que a imobilização melhora as propriedades da enzima.

6.3.3. Estabilidade frente ao pH da L-AI imobilizada sobre suportes de agarose

A estabilidade da L-AI de *Enterococcus faecium* quanto ao pH foi investigada durante 2 horas de incubação no pH desejado, à temperatura ambiente, em agitação constante. Utilizaram-se diferentes sistemas tampões de pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) a 50 mM, na presença do cofator $MnCl_2$ 1mM. A Figura 6.3 representa os resultados deste estudo.

A Figura 6.3 (A) representa os resultados referentes à imobilização da LAI-DH10B. A L-AI imobilizada sobre os suportes Ag-IDA-Ni e MANAE-agarose apresentaram comportamentos similares, mantendo-se 100% da atividade oferecida inicialmente, enquanto a estabilidade da enzima imobilizada reduziu aproximadamente para 58% e 62% após 2 horas de incubação a pH 10,0, respectivamente. Para o derivado em suporte Ag-IDA-Ni-glioxil ocorreu uma redução da atividade do catalisador a pH 8,0 e 10,0, apresentando uma atividade final de 69 e 71%, respectivamente.

A Figura 6.3 (B) representa os resultados referentes à imobilização da LAI-BL21. Observaram-se comportamentos semelhantes, quanto a estabilidade ao pH, para todos os derivados avaliados, com uma pequena redução da estabilidade a pH 8,0 e 10,0.

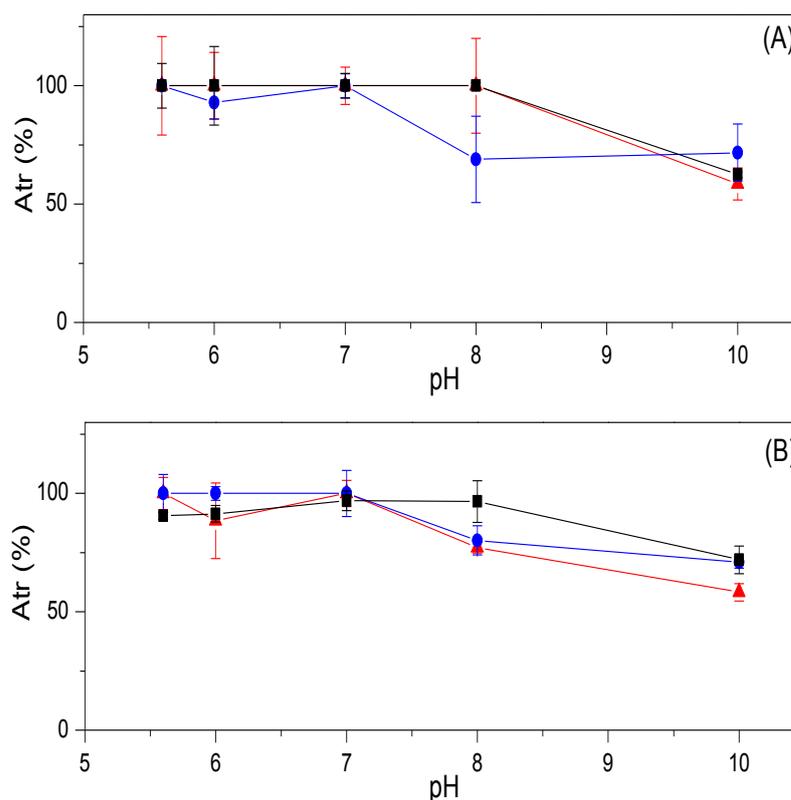


Figura 6.3. Efeito do pH na estabilidade da LAI-DH10B (A) e LAI-BL21(B), imobilizadas sobre MANAE-agarose (■), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●). As amostras de enzima foram incubadas em sistemas tampões de pH (5,6; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) a 50 mM.

6.3.4. Estudo dos parâmetros cinéticos da L-Arabinose Isomerase imobilizada

As Figuras 6.4 (A e B) mostram a atividade da L-arabinose isomerase imobilizada, em Ag-IDA-Ni, Ag-IDA-Ni-glioxil e MANAE-Agarose, frente a diferentes concentrações de substrato. Utilizou-se uma concentração fixa de enzima, com baixa carga (aproximadamente 2 U. mL^{-1} , para prevenir possíveis problemas difusionais), para todos os derivados avaliados. Observou-se uma rápida ascensão da velocidade de reação, principalmente para os derivados contendo a enzima LAI-BL21, conferindo maiores valores da velocidade máxima.

Verificou-se a influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática, ver Figura 6.4. Pode-se notar que as L-AIs imobilizadas obedeceram à cinética michaeliana, permitindo uma estimativa dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), ver Tabela 6.3.

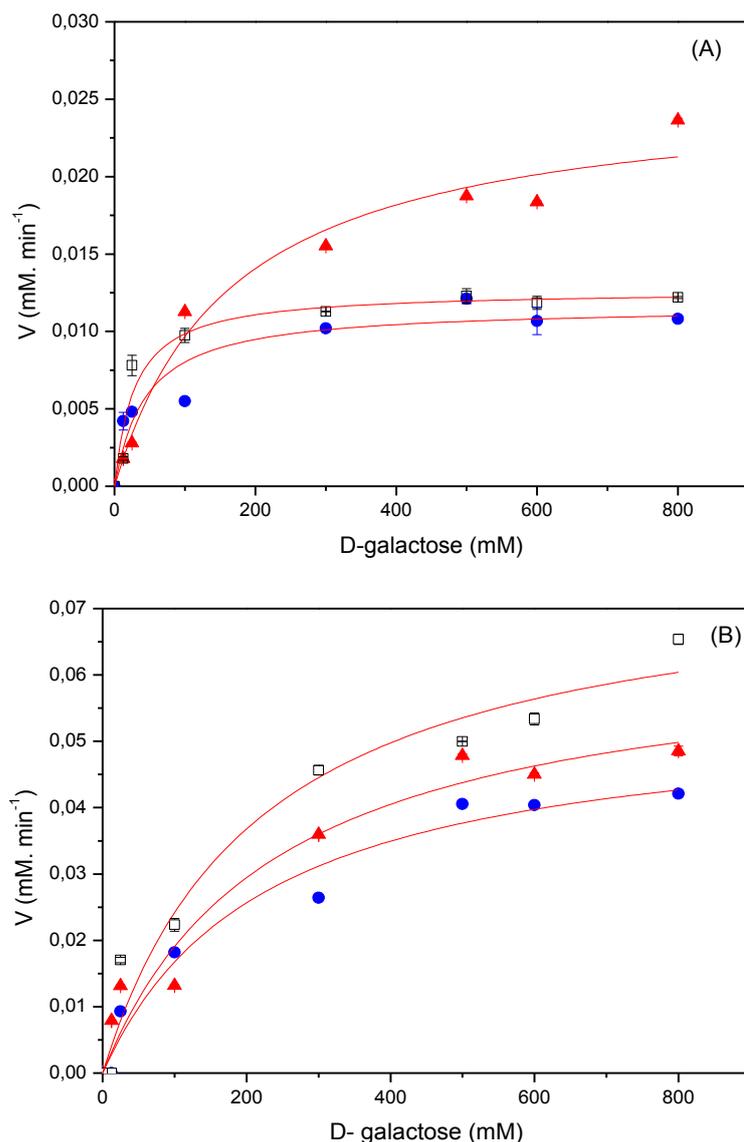


Figura 6.4. Influencia da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática. Os símbolos representam os pontos experimentais e as retas, o ajuste do modelo de Michaelis Menten, utilizando software Origin 8.1. LAI-DH10B (A) e LAI-BL21 (B) imobilizadas sobre suportes: MANAE-agarose (□), Ag-IDA-Ni (▲) e Ag-IDA-Ni-glioxil (●).

Segundo os resultados apresentados na Figura 6.4, ocorreu um decréscimo nos valores cinéticos de velocidade máxima para a enzima expressada em DH10B em relação a BL21, em quase 50%. Como foi explicado anteriormente, isto se deve ao processo de expressão da enzima em cada uma das diferentes cepas, e também quanto à presença dos resíduos de His em extremos diferentes. Segundo Copeland (2000), em alguns casos, mudanças nas condições de reação, como por exemplo, pH ou temperatura, podem ter

influência no valor de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. A Tabela 6.3 apresenta os resultados dos parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas.

Tabela 6.3. Parâmetros cinéticos das LAI-DH10B e LAI-BL21 imobilizadas em suportes Ag-IDA-NI, Ag-IDA-NI-glioxil e MANAE-Agarose, utilizando D-galactose como substrato. Atividade enzimática oferecida de 2 U. mL⁻¹.

Amostras	Suportes	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM.min ⁻¹)	R^2
LAI-DH10B	IDA-Ni	165 ± 49	0,026 ± 0,002	0,97
	IDA-Ni-glioxil	45 ± 19	0,011 ± 0,000	0,82
	MANAE	28 ± 8,6	0,013 ± 0,000	0,92
LAI-BL21	IDA-Ni	239 ± 103	0,065 ± 0,009	0,93
	IDA-Ni- glioxil	227 ± 76	0,055 ± 0,006	0,97
	MANAE	218 ± 82	0,08 ± 0,009	0,96

Para a enzima LAI-DH10B imobilizada, observaram-se menores valores das constantes cinéticas, K_m , quando comparados com a enzima na forma solúvel recombinante ($K_m=83$ mM) e nativa ($K_m=177$ mM), neste caso a mudança de afinidade devido o processo de imobilização favoreceu a afinidade para o substrato. Com exceção do derivado da LAI-DH10B em suporte Ag-IDA-Ni, que apresentou um K_m de 165 mM, maior que o K_m da enzima solúvel recombinante, sugerindo-se que provavelmente o centro ativo tenha sido modificado com a imobilização e alterações estruturais da enzima podem ter dificultado a afinidade ao substrato analisado, indicando que esse sistema imobilizado possivelmente possui certa limitação difusional (Silva *et al.*, 2014).

Na análise dos parâmetros cinéticos para os derivados da LAI-BL21, não pôde-se comparar às constantes cinéticas da enzima solúvel, pois a cinética da enzima solúvel apresentou-se de forma sigmoideal (Figura 4.12B) e a cinética da enzima imobilizada comportou-se de forma hiperbólica (Figura 6.4B). Segundo Cardoso *et al.* (2009) devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre parâmetros cinéticos da enzima, que adquirem novas propriedades cinéticas e modificações em seus valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

6.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

A diferença na sequência de poli His no extremo N-terminal para a LAI-DH10B e no C-terminal para a LAI-BL21, influenciou na capacidade de imobilização, apesar de serem enzimas da mesma fonte. Verificou-se um melhor desempenho da LAI-BL21 em todas as imobilizações testadas, apresentando-se valores superiores da atividade recuperada, para os suportes avaliados.

Em conjunto, as informações adquiridas pelo presente estudo indicaram que foi possível imobilizar a enzima L-AI, porém não estabilizá-la. Além disso, os dados coletados serão importantes na continuidade de outros trabalhos, visando à imobilização de diferentes enzimas, utilizando estes suportes estudados. Faz-se necessário um estudo de técnicas de estabilização da estrutura quaternária da enzima, para melhorar o desempenho da imobilização covalente, refletindo na estabilidade térmica do derivado.

Capítulo 7

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Esta tese de doutorado apresentou resultados significantes quanto à clonagem, fermentação, extração, purificação e imobilização da proteína recombinante L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium*. A L-arabinose isomerase (L-AI) nativa e recombinante de *Enterococcus faecium* apresentaram características bioquímicas (pH e temperatura) similares, porém, comportamentos diferentes na capacidade de imobilização, apesar de serem L-AIs da mesma fonte. Passamos de um extrato com pouca enzima para um extrato rico em enzima de interesse, através da engenharia genética, resultando em quantidades satisfatórias de L-arabinose isomerase na forma solúvel e facilmente purificável, utilizando *Escherichia coli* como micro-organismo hospedeiro.

O processo de purificação da L-arabinose isomerase envolveu um único passo e em toda recuperação da atividade enzimática foi superior a 95,9% e 38%, para L-AI BL21 e DH10B, respectivamente. A enzima purificada foi imobilizada em suporte multifuncional com rápida imobilização, apresentando um elevado rendimento de imobilização, superior a 75%. Dentre os suportes a base de agarose, o suporte MANAE apresentou-se mais apropriado para imobilização da L-AI. Sendo que a enzima nativa imobilizada a quitosana ativada por glutaraldeído, apresentou-se ainda mais estável, gerando ligações estáveis entre grupos do suporte e proteínas, visto pela estabilidade térmica a 60 °C.

Por fim, os objetivos propostos para esta tese foram alcançados, além disso, os dados coletados serão importantes na continuidade de outros trabalhos, visando à estabilização da enzima imobilizada.

Sugestões para Trabalhos Futuros

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O prosseguimento do trabalho com as proteínas de *Enterococcus faecium* pode objetivar as seguintes perspectivas:

- Estudar corpos de inclusão para produção da enzima L-arabinose isomerase, a fim de reduzir a etapa de purificação;
- Mudanças de temperatura, do tempo de indução e da expressão das células, serão suficientes para expressar maiores concentrações da enzima de interesse;
- Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} em largas faixas de temperaturas 30-50 °C;
- Conversão em D-tagatose a partir de várias concentrações de D-galactose;
- Imobilização da enzima L-AI recombinante em partículas de quitosana;
- Imobilização da enzima L-AI purificada;
- Realização de ensaios de cristalização, e uma vez obtidos os cristais, utilizar-se da difração de raios-X para estudar as estruturas tridimensionais.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adriano, A. M.; Oliveira, P. C. De; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim. Nova* (2011).

Adriano, W. S., Mendonça, D. B., Rodrigues, D. S., Mammarella, E. J., Giordano, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules* (2005) 9: 2170-2179.

Alonso, N. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sepharose supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *J. Mol. Catal. B: enz.*, (2005) 35: 57-61.

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

Aragon, C. C. Imobilização multipontual covalente de xilanases: Seleção de derivados ativos e estabilizados. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Sao Paulo, Brasil, 2013.

Arla Foods, 2003. Disponível em: <<http://www.arla.com/about-us/news-and-press/2003/pressrelease/the-world-s-first-production-of-gaio-tagatose-gets-off-the-ground-76032>>. Acesso em: 22/04/2015.

Armisen, M.P.Gil. Nuevos Métodos de Caracterización y Activación de Geles de Agarosa como Soportes para la Inmovilización de Proteínas de Interés Industrial. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 1997.

Armisen P.; Mateo C; Cortés E.; José L. Barredo, Francisco Salto, Bruno Diez, Lorenzo Rodés; García, J.L.; Fernández-Lafuente R.; Guisan J.M. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. *Journal of Chromatography A* (1999) 848: 61-70.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seiman, J. G.; Smith, J. A. Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc; ringbou edition (2003) ISBN: 047150338X.

Balduino, K. N. Renaturação em altas pressões hidrostáticas de proteínas recombinants agregadas em corpos de inclusão produzidos em *Escherichia coli*. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

Beadle, J. R., Saunder, J. P., Wajada, T. J. Process for manufacturing tagatose. US patent 500261 (1991).

Beadle, J. R., Saunders, J. P., Wajda, T. J. Process for manufacturing tagatose. U.S. Patent 5,078,796 (1992).

Bezerra, C. S. Imobilização de B-Galactosidase De *Kluyveromyces Lactis* em diferentes Suportes e Protocolos de Ativação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, 2012.

Blanco, R. M., Calvete, J. J., & Guisan, J. M. Immobilization e stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. Enzyme and Microbial Technology (1989) 11: 353 e 359.

Bolívar, J. M.; Rocha-Martin, J.; Godoy, C.; Rodrigues, R. C. and Guisán, J. M. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Process Biochemistry (2010) 45: 107-113.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. (1976.) 72:248–254.

Bresolin, I.T.L, Miranda, E. A. e Bueno, S. M. A. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) de Biomoléculas: Aspectos Fundamentais e Aplicações Tecnológicas. Quim. Nova (2009) 32: 1288-1296.

Brígida, A. I. S.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z.; Gonçalves, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis. B (2014) 101: 148-158.

- Bucke C. Glucose transforming enzymes. In: Fogarty W, editor. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: Applied Science Publishers. (1983) 93–127.
- Bullock, L. Immobilization enzymes. *Education in chemistry* (1989) 179-182.
- Candiano, G. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* (2004) 25:1327-1333.
- Cardoso, C. L., Moraes, M. C de., Cass, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*. (2009) 32: 175-187.
- Caruso, C. S. Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2007.
- Chakravorty M. Induction and Repression of L-arabinose Isomerase in *Lactobacillus Plantarum*. *Biochim Biophys Acta*. (1964) 85:152–161.
- Cheetham, P. S. J.; Wootton, A. N. Bioconversion of dgalactose into d-tagatose. *Enzyme Microb. Technol.* (1993) 15: 105–108.
- Chen, G-Q, and Kazlauskas, R. Chemical biotechnology in progress Editorial overview. *Current Opinion in Biotechnology* (2011) 22:747–748.
- Cheng, L. F.; Mu, W. M; Zhang, T.; Jiang, B. Na L-arabinose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: Cloning, expression., purification, and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010) 86: 1089-1097.
- Chinelate, G. C. B. Estudo da imobilizacao das enzimas neutrase e l-arabinose isomerase em suportes de baixo custo. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pos-Graduacao da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, 2013.
- Coolbear, T.; Daniel, R. M; and Morgan, H.W. The Enzymes from Extreme Thermophiles: Bacterial Source, Thermostabilities and Industrial Relevance. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (1992) 45, 58-98.
- Copeland, R. A. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. New York: Wiley-VCH, (2000) 2 ed. 397.

Elkaoutit, M.; Naranjo-rodriguez, I.; Domínguez, M.; Hidalgo-Hidalgo-de-cisneros, J. L. Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational. *Applied Surface Science* (2011) 257:10926-10935.

Everson, R. J.; Parker, H. E.; *Anal. Chem.* (1974) 46: 1966.

Fernández-Lafuente, R.; Rossell, C. M.; Rodríguez, V.; Santana, C.; Soler, G.; Bastida, A.; Guisan, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool or protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* (1993) 15:546-550.

Fernández-Lafuente, R. and Guisan, J. M. Enzyme and protein engineering via immobilization and post-immobilization techniques. *Recent Res. Devel. And Bioeng* 1 (1998).

Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C; Penzol, G.; Hernández-Justiz, O.; Irazoqui, G.; Villarino, A.; Ovsejevi, K.; Francisco Batista; Guisan. J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (1999) 7: 181-189.

Freimund, S., Köpper, S. The composition of 2-keto aldoses in organic solvents as determined by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* (2004) 339, 217-220.

Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N. e Silva, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova* (2007) 30:136-145.

Gonçalves, L. R. B., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J. M., Giordano, R. L. C. A Kinetic Study of Synthesis of Amoxicillin Using Penicillin G Acylase Immobilized on Agarose. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* (2000) 84–86: 931-944.

Gonçalves, L. R. B., Sousa, R., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J. M., Giordano, R. L. C, Giordano, R. C. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin Avoiding Limitations of the Mechanistic Approach for Reaction Kinetics. *Biotechnology and Bioengineering.* (2002) 80: 622-631.

Guisán, J. M.; Blanco, R. M. Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose gels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1987) 501: 67-72.

Guisán, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* (1988) 10: 375-382.

Guisan, J. M.; Gregorio, A.; Fernández-Lafuente R.; Cristina M. R.; García, J.L. and Arturo T. Stabilization of Heterodimeric Enzyme by Multipoint Covalent Immobilization: Penicillin G Acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*. (1993) 42: 455-464.

Hong Y. H.; Lee D. W.; Lee S. J.; Choe E. A.; Kim S. B.; Lee Y. H.; Cheigh C. I.; Pyun Y. R. production of d-tagatose at high temperatures using immobilized escherichia coli cells expressing l-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnol Lett* (2007) 29: 569–574.

Hung, X-G., Tseng, W-C., Liu, S-M., Tzou, W-S., Fang, T-Y. Characterization of a thermophilic l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biochemical Engineering J.* (2014) 83, 121–128.

Ibrahim, O. O., Spradlin, J. E. (2000) US Patent 6057135.

Izumori, K.; Ueda, Y.; Yamanaka, K. Pentose metabolism in mycobacterium smegmatis: comparison of l-arabinose isomerases induced by l-arabinose and d-galactose. *J. Bacteriol.* (1978) 133: 413–414.

Izumori, K.; Miyoshi, T.; Tokuda, S.; Yamabe, K. Production of Dtagatose from ducitol by *Arthrobacter globiformis*. *Appl Environ Microbiol* (1984) 46:1055–1057.

Jorgensen, F., Hansen, O.C., Stougaard, P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterization of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2004) 64:816-822.

Jung, E-S., Kim, H-J. e Oh, D-K. Tagatose Production by Immobilized Recombinant *Escherichia coli* Cells Containing *Geobacillus stearothermophilus* L-Arabinose Isomerase Mutant in a Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* (2005) 21:1335-1340.

Kim, P., Yoon, S.H., Roh, H.J. and Choi, J.H. High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Prog.* (2001) 17: 208-210.

- Kim, B-C; Lee, Y-H; Lee, H-S; Lee, D-W; Choe, E-A; Pyun Y-R. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of d-galactose to d-tagatose using the enzyme. FEMS Microbiology Letters (2002) 212: 121-126.
- Kim, H-J., Ryu, S-A., Kim, P., Oh, D-K. A Feasible Enzymatic Process for D-Tagatose Production by an Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. Biotechnol. Prog. (2003) 19:400-404.
- Kim, P. Current studies on biological tagatose production using L- arabinose isomerase: a review and future perspective. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2004) 65:243–249.
- Kim, H.-J., Oh, D.-K. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. J. Biotechnol. (2005) 120:162–173.
- Kim, H.-J.; Kim, J.-H., Oh, H.-J., Oh, D.-K. Characterization of a mutated *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose isomerase that increases the production rate of D-tagatose. Journal of Applied Microbiology (2006) 101: 213–221.
- Kim, J.-H., Ponnandy, P., Jeya, M., Tiwari, M.K., Moon, H.-J., Singh, R.K., Lee, J.-K. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2010) 85:1839-1847.
- Kaddour, S.; López-Gallego, F.; Sadoun, T.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Preparation of an immobilized-stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: the effect of Zn²⁺ on enzyme stability. J Mol Catal B: Enzym. (2008) 55: 142–145.
- Kennedy, J. F. Enzyme technology. Alemanha: Biotechnology (1987).
- Kulka, R. G. Colorimetric Estimation of Ketopentoses and Ketohexoses, Biochemical Journal, (1956), 63: 542–548.
- Lee, D. W.; Jang, H. J.; Choe, E. A.; Kim, B. C.; Lee, S. J.; Kim, S. B.; Hong, Y. H.; Pyun, Y. R. Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70:1397–1404.
- Lee, D.W., Choe, E.A., Kim, S.B., Eom, S.H., Hong, Y.H., Lee, S.J., Lee, H.S., Lee, D.Y., Pyun, Y.R. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose

isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. Arch. Biochem. Biophys. (2005a) 434:333-343.

Lee, S.J., Lee, D.W, Choe, E.A., Hong, Y.H., Kim, S.B., Kim, B.C., Pyun, Y.R. Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum. Appl. Environ. Microbiol. (2005b) 71:7888-7896.

Levin, G. V.; Zehner, L. R.; Saunders, J. P.; Beadle, J.R. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. Am. J. Clin. Nutr. (1995) 62:1161S–1168S.

Levin, G.V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. J. Med. Food. (2002) 5, 23–36.

Lheninger, A. L. Fundamentos de Bioquímica, São Paulo: Editora Savier, 1977.

Lheninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. 2 ed. São Paulo: Savier, 1995.

Li, Y.,Zhu, Y., Liu, A.,Sun, Y. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production. Extremophiles (2011) 15:441–450.

Liang, M., Chen, M., Liu, X., Zhai, Y., Liu, X.-W., Zhang, H., Xiao, M., Wang, P. 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. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2012) 93: 1469-1474.

Livesey, G.; Brown, J. C. D-Tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. J. Nutr. (1996) 126:1601–1609.

Liang, M., Chen, M., Liu, X., Zhai, Y., Liu, X-W., Zhang, H., Xiao, M., Wang, P. 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. Appl Microbiol Biotechnol (2012) 93:1469–1474.

- Lim, B-C., Kim, HJ. e Oh, D-K. Tagatose Production with pH Control in a Stirred Tank Reactor Containing Immobilized L-Arabinose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl Biochem Biotechnol* (2008) 149:245–253.
- Lima, A. F.; Cavalcante, K. F.; de Freitas, M. de F. M.; Rodrigues, T. H. S.; Rocha, M. V. P.; Gonçalves, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Process Biochemistry* (2013), 48: 443-452.
- Liu, S. Y., J. Wiegel, and F. C. Gherardini. Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489. *J. Bacteriol.* (1996) 178: 5938–5945.
- Manjasetty, B.A., Chance, M.R. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ecai), the putative target of biological tagatose production. *J. Mol. Biol.* (2006) 360:297-309.
- Manzo, R. M.; Torres, P. R.; Rubiolo, A. C.; Batista-Viera, F. D.; Mammarella, E. J. Ensayos preliminares para la producción y purificación parcial de una l-arabinosa isomerasa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL63. COBEQ, 2010.
- Manzo, R. M. Preparación y caracterización de derivados insolubilizados de La enzima L-arabinose isomerasa para su empleo em La bioconversión de D-galactosa em D-tagatosa. Tese submetida à Universidad Nacional del Litoral, 2012.
- Manzo, R. M.; Simonetta, A. C.; Rubiolo, A. C.; Mammarella, E. J. Screening and Selection of Wild Strains for L-Arabinose Isomerase Production. *Braz J Chem Eng.* (2013) 30 (4): 711–720.
- Marzur, A. W. Functional sugar substitutes with reduced calories. (1989) EP 341062.
- Markoglou, N.; Wainer, I. W. Em *Bioanalytical Separations*; Wilson, I. D., ed.; Elsevier Science: New York (2003) cap. 7.
- Mateo, C., Bolivar, J. M., Godoy, C. A., Rocha-Martin, J., Pessela, B. C., Curiel, J. A., Munoz, R., Guisan, J. M., Fernandez-Lorete, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization processo n novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules.* (2010) 11: 3112-3117.

Mateo, C.; Grazú, V.; Palomo, J. M.; López-Gallego, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature*, (2007) 2: 1022-1033.

Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F; et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol.* (2006) 39: 274–80.

Mateo, C; Femández-Lorente, G.; Benevides C.C.Pessela; Vían, A.; Carrascosa, AV.; García, J.L.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Affinlty chomatography of polyffistidine tagged enzimes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions *Journal of Chromatography A.*(2001) 915: 97-106.

Mateo, C.; Abian, O.; Lafuente, R.; Guisan, J. M. Reversible Enzyme Immobilization via a Very Strong and Nondistorting Ionic Adsorption on Support–Polyethylenimine Composites. *Biotechnology and Bioengineering.* (2000a) 68: 98-105.

Mateo, C; Femández-Lorente, G.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; and Guisan, J.M. Multifunctionai Epoxi Suports. A new tool to improve the covalent immobiization of proteins. the promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before theircovalent linkage. *Biomacromoleculas* (2000b) 1: 739-745.

Mateo, C; Abian O.; Fernández-Lafuente, R.; and Guisan, J.M. Reversible Enzyme Immobilization via a Very Strong and Nondistorting Ionic Adsorption on Support-Polyethylenlmine Composites. *Biotechnology and Bioengineerin.* (1999) 68.

Men, Y.; Zhu, Y.; Zhang, L.; Kang, Z.; Izumori, K.; Sun, Y.; Ma, Y. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. *Microbiol Res.* (2014) 169 (2):171–178.

Mendes, A. A., Oliveira, P. C., Castro, H. F., Giordano, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim. Nova* (2011a) 34:831-840.

Mendes, A. A.; de Castro, H. F.; Rodrigues, D. S.; Adriano, W. S.; Tardioli, P. W.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; J. Multipoint covalent

immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2011b) 38:1055-66.

Moldes, Z. M. Caracterización del Sistema Regulador de Dos Componentes Híbrido TolR en *Azoarcus* sp. CIB. Tese de doutorado, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología Molecular, 2014.

Nakamatu, T., Yamanaka, K. Crystallization and properties of l-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Biochim. Biophys. Acta, Enzymol.* (1969) 178:156-165.

Oh, D.-K., Kim, H.-J., Ryu, S.-A., Rho, H.-J., Ki, P. Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose. *Biotechnol. Lett.* (2001) 23:1859-1862.

Oh D.-K. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 76:1–8.

Patrick, J. W.; Lee, N. *J. Biol. Chem.* (1968) 243:4312–4318.

Pessela, B.C.C. Ingeniería de Biocatalizadores y Bioprocesos: β -Galactosidasa de *Thermus* sp., Cepa T2. Tese de doutorado em Ciências Químicas, Universidad Politécnica de Madrid, Espanha (2002).

Pessela, B.C.C.; Vian, A.; Mateo, C.; Lafuente, R.; García, J. L.; Guisan, J. M.; Carrascosa, A. V. Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 B-Galactosidase in *Escherichia coli* and Preparation by Using Tailor-Made Metal Chelate Supports. *Applied and Environmental Microbiology.* (2003a) 69: 1967–1972.

Pessela, B. C. C., Mateo, C.; Carrascosa, A.V., Vian, A., García, Jose L., Rivas, G., Alfonso, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of a Thermophilic Poly-His-Tagged, β -Galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by using Novel Heterofunctional Chelate- Epoxy Sepabeads. *Biomacromolecules* (2003b), 4: 107-113.

Pessela, B. C. C.; Mateo, C.; Filho, M.; Carrascosa, A.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of

high imidazole concentrations: purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic and galactosidases. *Enzyme Microb Technol.* (2007) 40:242–8.

Pessela, B. C. C.; Mateo, C.; Filho, M.; Carrascosa, A.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. *Process Biochem.* (2008) 43:193–8.

Pezzella, C., Russo, M. E., Marzocchella, A., Salatino, P., Sanna, G. Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* Laccase Mixture on Perlite and Its Application to Dye Decolourisation. *BioMed Research International*, (2014) <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308613>.

Prabhu, P.; Tiwari, M. K.; Jeya, M.; Gunasekaran, P.; Kim, I. W.; Lee, J. K. Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2008) 81(2): 283–290.

Prabhu, P.; Jeya, M.; Lee, J-K. In silico studies on the substrate specificity of an L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2010) 20: 4436–4439.

Pisan, F.M.; Relia, C.A.; Raya, C; Rozzo, R.; Nucci, A.; Gambacorta, M.; De Rosa and Rossi, M. Thermostable p-galactosidase from archaeobactrium *Solfulobus solfataricus*. Purification and properties. *Eur. J. Biotechnol.* (1990) 187, 321-328.

Porath, J., J. Carlsson, J. Olsson, and G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* (1975) 258: 598–599.

Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

Ricard, J., Cornish-Bowden, A. Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur J Biochem.* (1987) 166: 255-72.

Rhimi, M., Bejar, S. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive l-arabinose isomerase from the *Bacillus stearotherophilus* US100 strain. *Biochim. Biophys. Acta*, (2006) 1760: 191–199.

Rhimi, M., Messaoud, E. B., Borgi, M. A., khadra, K. B., Bejar, S. Co-expression of l-arabinose isomerase and d-glucose isomerase in *E. coli* and development of an efficient process producing simultaneously d-tagatose and d-fructose. *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 40: 1531–1537.

Rhimi, M., Ilhammami, R., Bajic, G., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., Aghajari, N. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23 K is an attractive D-tagatose producer. *Bioresour. Technol.* (2010) 101, 9171-9177.

Rhimi, M., Bajic, G., Ilhammami, R., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., Aghajari, N., The acid-tolerant L-arabinose isomerase from the mesophilic *Shewanella* sp. ANA-3 is highly active at low temperatures. *Microb. Cell Fact.* (2011) 10:96.

Ryu, S-A., Kim, C. S., Kim, H-J., Baek, D. H., Oh, D-K. Continuous D-Tagatose Production by Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* (2003) 19:1643-1647.

Royer, G. P. Immobilized enzyme catalysis. *Reviews Catalysis Reviuwes. Science and Engineering.* (1980) 22: 29-73.

Roh, H.J., Yoon, S.H., Kim, P. Preparation of L-arabinose isomerase originated from *Escherichia coli* as a biocatalyst for D-tagatose production. *Biotechnol. Lett.* (2000a) 22, 197-199.

Roh, H.J., Kim, P., Park, Y.C., Choi, J.H. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2000b) 31, 1-4.

Rollini, M., Manzoni, M. Bioconversion of D-galactitol to tagatose and dehydrogenase activity induction in *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* (2005) 40:437–444.

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

Rodrigues, D. S.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B.; Giordano, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* (2008) 51: 100–109.

- Salonen, N., Nyyssölä, A., Salonen, K., Turunen, O. *Bifidobacterium longum* L-Arabinose isomerase—Overexpression in *Lactococcus lactis*, purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2012) 168:392-405.
- Sadana, A.; Henley, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* (1987).30:717-723.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; and Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- Sanjurjo, P., Matorras, R. and Perteagudo, L. Influence of fatty fish intake during pregnancy in the polyunsaturated fatty acids of erythrocyte phospholipids in the mother at labor and newborn infant. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* (1995) 74:594–598.
- Scott, D. J., Harding, S. E., Rowe, A. J. A Brief Introduction to the Analytical Ultracentrifugation of Proteins for Beginners. *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*, (2005), 1-25, DOI:10.1039/9781847552617-00001.
- Serpa, L.; Priamo, W. L.; Reginatto, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica, 2nd International Workshop, *Advances in Cleaner Production*, 2009.
- Soares, D. S., Fai, A. E. C., Oliveira, A. M., Pires, E. M. F., Stamford, T. L. M. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* (2011) v.63:4:996-1002.
- Silva, T. M., Pessela, B. C., Silva, J. C. R., Lima, M. S., Jorge, J. A., Guisán, J. M., Polizeli, M. L. T. M. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* (2014) 104: 95–100.
- Silva, J. A., Macedo, G. P., Rodrigues, D. S., Giordano, R. L. C., Gonçalves, L. R. B. Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal* (2012) 60 :16–24.
- Staudigl, P., Haltrich, D., Peterbauer, C. K. L-Arabinose Isomerase and D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus reuteri*: Characterization, Coexpression in the Food Grade Host

Lactobacillus plantarum, and Application in the Conversion of D-Galactose and D-Glucose. J. Agric. Food Chem. (2014) 62, 1617–1624.

Tadeu, I., Bresolin, L., Miranda, E. A., Bueno, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. Quim. Nova (2009) 32: 1288-1296.

Takata, G., Poonperm, W., Rao, D., Souda, A., Nishizaki, T., Morimoto, K., Izumori, K. Cloning, expression, and transcription analysis of L-arabinose isomerase gene from Mycobacterium smegmatis SMDU. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2007) 71, 12, 2876-2885.

Tardioli, P. W. Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, 2003.

Torres, P. R., Manzo, R. M., Rubiolo, A. C., Batista-Vieira, F. D., Mammarella, E. J. Purification of an L-arabinose isomerase from Enterococcus faecium DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. (2014) 102: 99–105.

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

Villeneuve P.; Muderhwa J. M.; Graille J.; Haas M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J. Mol. Catal. B-enz. (2000) 9: 113-148.

Yamanaka K., Wood, W. A. L-Arabinose isomerase. Methods Enzymol (1966) 9: 596–602.

Weetall, H. H. Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. Process Biochemical. (1975) 3-30.

Xu, Z., Qing, Y., Li, S., Feng, X., Xu, H., Ouyang, P. A novel l-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for d-tagatose production: Gene cloning, purification and characterization. J. Mol. Catal. B: Enzym. (2011) 70:1-2, 1-7.

Xu, Z., Li, S., Fu, F., Li, G., Feng, X., Xu, H., Ouyang, P. Production of D-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 Cells. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 166:961–973.

Yoon, S. H.; Kim, P.; Oh, D. K. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. *World J Microbiol Biotechnol*. (2003) 19(1):47–51.

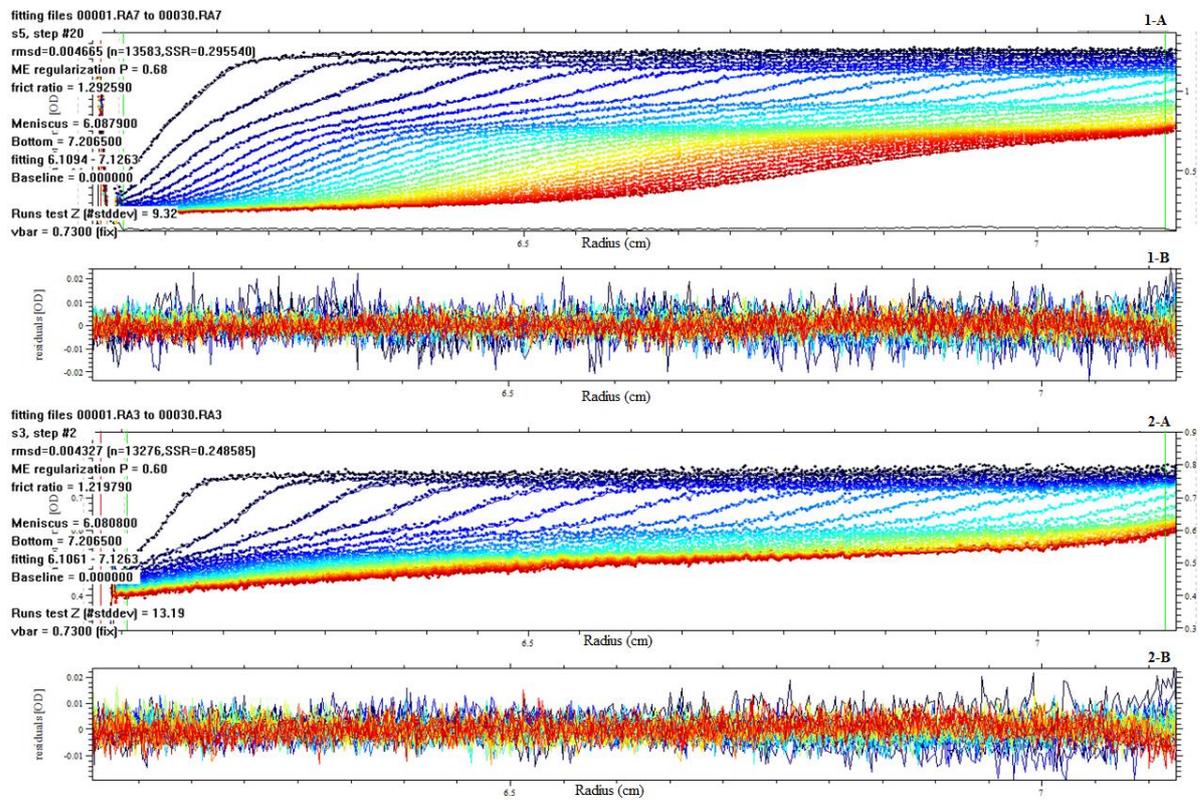
Zadow, J. G. Lactose: Properties and uses. *Journal of Dairy Science*. (1984) 67: 2654-2679.

Zhang, H., Jiang, B., Pan, B. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. *World J. Microbiol. Biotechnol*. (2007) 23:641-646.

Zhang, Y.-W., Prabhu, P., Lee, J.-K. Immobilization of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (2009) 73:2234-2239.

Zhang, Y. W.; Jeya, M.; Lee, J. K. Enhanced activity and stability of L-arabinose isomerase by immobilization on aminopropyl glass. *Appl Microbiol Biotechnol*. (2011) 89(5):1435–1442.

ANEXO A



Anexo A. Velocidades de sedimentação e diagnóstico de associação da LAI-DH10B (1A e B) e LAI-BL21 (2A e B), respectivamente. Dados experimentais adquiridos em função do tempo. O *fitting* dos dados de absorbância *versus* raio (cm) da cela.

Gráficos do equilíbrio de sedimentação para as duas enzimas avaliadas observam-se que ambas as enzimas LAI-DH10B e LAI-BL21 apresentam distribuição desordenada das moléculas do sistema sobre o eixo do gráfico (1B e 2B), indicando que a proteína sedimenta como uma mistura de espécies moleculares. A princípio, observou-se, pelos gráficos, um equilíbrio quase uniforme e estável que à medida que vai avançando na rotação da centrífuga ocorre uma desorganização na distribuição das partículas.

ANEXO B

Sednterp - [unnamed]

File Results Estimating Database Help

Experiment Data (select from list to retrieve from database) Reference Date
unnamed

Sed Equilibrium	Exact	Molecular Weight	From Sigma	From Composition
20.00 T (°C)	1.4960E+1	σ	48,000 RPM	54,398.86 → Mr
Sed Velocity	20.00 T (°C)	4.3E-1 mg/ml	3.8850E-13 → S*	

Results 14.431.36 Mb 2.5126E-7 Ro 3.9069E-13 S_{20,w}^o

Sample Name Select unnamed

V-bar Direct Entry Standard Compute 0.7356

Buffer Data Select unnamed pH 7.000 pH

Density Direct Entry Standard Compute 0.99886 ρ

Viscosity Direct Entry Standard Compute 1.0020E-2 η

Hydrodynamic Size, Shape, and Hydration: unnamed

Return Results from Which Method? V-bar Method Teller Method

Results from Vbar Method:	Results from Teller Method:	Hydration Options
Ro= 2.5126E-7	Rp= 2.5462E-7	<input type="radio"/> Input nothing
fo= 4.7456E-8	fp= 4.8091E-8	<input type="radio"/> Input a/b prolate
f/fo= 1.2948	f/fp= 1.2777	<input type="radio"/> Input a/b oblate
Smax= 5.0585E-13	Smax= 4.9916E-13	<input checked="" type="radio"/> Use computed delta1
Dmax= 8.5288E-7	Dmax= 8.4160E-7	<input type="radio"/> Input Delta1: 0.41950
Exact Delta1= 0.4195	Exact Delta1= 0.4195	Assumed Shape
a/b= 3.019	a/b= 2.883	<input checked="" type="radio"/> Prolate ellipsoid
2a= 12.203 nm	2a= 11.934 nm	<input type="radio"/> Oblate ellipsoid
2b= 4.042 nm	2b= 4.140 nm	<input type="radio"/> Cylinder

Rstokes= 3.2532E-7

Graph Shape Graph a/b vs. Hydration

Save to Database Done

Select from List to Retrieve from Database

Anexo B. Pico de 3.9S: Compatível com a massa teórica de um monómero (54.398,86 Da), com coeficiente de sedimentação (s) de 3.8850×10^{-13} , relação friccional para determinação da forma hidrodinâmica desta proteína, foi mais propensa de encontrar formas alongadas com $f/f_0 = 1,2948$.