



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

RHONYELE MACIEL DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOCATALISADOR A PARTIR DA CO-
IMOBILIZAÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE EM SUPORTE
AGAROSE-EPÓXIDO**

FORTALEZA

2018

RHONYELE MACIEL DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOCATALISADOR A PARTIR DA CO-IMOBILIZAÇÃO
DA DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE EM SUPORTE AGAROSE-EPÓXIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues.

FORTALEZA

2018

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

S583d Silva, Rhoneyele Maciel da.
Desenvolvimento de um biocatalisador a partir da co-imobilização da dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido / Rhoneyele Maciel da Silva. – 2018.
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

1. Agarose-epóxido. 2. Co-imobilização. 3. Dextrana-sacarase. 4. Oligossacarídeos. I. Título.

CDD 660

RHONYELE MACIEL DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOCATALISADOR A PARTIR DA CO-IMOBILIZAÇÃO
DA DEXTRANA-SACARASE E DEXTRANASE EM SUPORTE AGAROSE-EPÓXIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 21/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho aos meus pais, Ernandes e Isabel pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado. À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues, pela excelente orientação, paciência, apoio e confiança dada para a execução desse projeto.

À Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves pela colaboração durante a execução desse projeto e por aceitar participar da banca.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristiane Rabelo por repassar seu conhecimento de forma tão paciente, generosa e ter aceitado participar da banca.

Ao Prof. Dr. Fabiano Fernandes pela colaboração e contribuição para o desenvolvimento desse projeto.

Às professoras que fizeram parte da minha formação acadêmica Cláudia Miranda, Lucicléia Barros, Daniele Rios e Suzana Martins pelas oportunidades, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A minha família por todo o amor e compreensão que me fez querer buscar o melhor de mim. Ao meu irmão Ronyeldo pelo apoio, confiança e amizade. À minha irmã Manuelle pela alegria e amizade. Ao meu Sobrinho Guilherme por me fazer sorrir todos os dias.

Aos colegas e professores da turma de mestrado, pela ajuda durante as disciplinas, críticas e sugestões recebidas.

Aos amigos do LAMAB pessoas com as quais compartilhei momentos maravilhosos.

Aos amigos Mona lisa, Jéssica, Carlos, Airlane, Bianca e Claudilane pelos momentos bons e pelo apoio durante a caminhada em busca dos nossos objetivos.

Aos amigos do LABIOTEC Dayana, Iane, Tatiane, Ronnyeli, Fátima, Karol, Thatyane, Nathan, Dyana e Lucy que auxiliaram de alguma forma na execução desse trabalho seja com esclarecimento de dúvidas até os momentos de descontração.

À Priscila Souza pela paciência, amizade e companheirismo durante a execução deste projeto.

“Somos feitos da mesma matéria que nossos
sonhos. ”

(William Shakespeare)

RESUMO

A demanda por tecnologias verdes ampliou o interesse na aplicação de enzimas em processos industriais. Com isso, a imobilização de enzimas é vista como uma tecnologia chave para uma maior viabilidade comercial desses biocatalisadores, além de melhorar a estabilidade e permitir o reuso. Dessa forma, a aplicação industrial da enzima dextrana-sacarase se dá pela produção de dextrana e oligossacarídeos prebióticos. Por sua estrutura complexa, esse catalisador se torna de difícil imobilização, pois é composto de três subunidades, além da dextrana endógena covalentemente ligada a um de seus sítios ativos. No entanto, sabe-se que a hidrólise da dextrana endógena, pela enzima dextranase, possibilita uma maior interação com os grupos reativos dos suportes. Com isso, o objetivo desse estudo foi desenvolver um biocatalisador no qual as enzimas dextrana-sacarase e dextranase são co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido. Este, surge como uma alternativa ao suporte comercial Eupergit C, descrito como o mais adequado para a dextrana-sacarase, mas foi descontinuado. Dessa forma, foram estudadas as condições de imobilização, pH e temperatura ótima de atividade enzimática, além de estabilidade a estocagem, operacionalidade e síntese de oligossacarídeos. A co-imobilização favoreceu a atividade enzimática em ampla faixa de pH e temperatura para os biocatalisadores analisados (AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5). O biocatalisador AGE-DS-DN0,5 apresentou a maior atividade recuperada (59,54%), demonstrando ser o mais indicado para os testes posteriores. Este, mostrou-se estável ao armazenamento à 4 °C, retendo atividade acima de 70%, durante 60 dias. Na produção de oligossacarídeos o AGE-DS-DN0,5 indicou a mesma eficiência da enzima livre, produzindo oligossacarídeos de até 5 graus de polimerização. Na avaliação da estabilidade operacional o AGE-DS-DN0,5 perdeu 60% de sua atividade na primeira batelada. Após análise por espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi observado a dessorção da enzima durante as bateladas. Ao comparar os espectros AGE-DS-DN0,5 com o do suporte comercial Eupergit CM após o reuso, foi visto que a enzima interage com outros grupos presentes no suporte comercial, que não estão presentes na agarose-epóxido. Tais grupamentos seriam os responsáveis pela forte ligação multipontual gerada entre a enzima e o suporte Eupergit CM, que impediu a lixiviação das enzimas durante os ciclos de reuso. Portanto, estudos posteriores são necessários para funcionalizar a agarose com grupos reativos, além do epóxi, que permitam uma forte interação entre enzima e suporte.

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

ABSTRACT

The current demand of green technology increases the interest in enzymatic process. Thus, enzymes immobilization is pointed as a key technology to improve the commercial viability of that biocatalyst, besides yield stability and reusability. Therefore, the industrial application of the enzyme dextranase is due to the production of dextran and prebiotics oligosaccharides. The complex structure of this enzyme turns its immobilization a tough task, because it has three subunits, besides a covalent dextran attached into one of its active sites. However, it is known that the hydrolysis of the endogenous dextran, by the enzyme dextranase, allows a greater interaction with the reactive groups of the supports. Thus, the objective of this study was to develop a biocatalyst in which the enzymes dextranase and dextranase are co-immobilized on epoxy-agarose support. This appears as an alternative to Eupergit C, a commercial support described as the most suitable for dextranase but has been discontinued. Thus, the conditions of immobilization, pH and optimum temperature of enzymatic activity, as well as storage stability, operability and synthesis of oligosaccharides were studied. The co-immobilization provides enzymatic activity in a wide range of pH and temperature for the biocatalysts (AGE-DS-DN0.5, AGE-DS-DN2.5 and AGE-DS-DN4.5). The biocatalyst AGE-DS-DN0.5 showed the highest activity recovered (59.54%), proving to be the most suitable for the subsequent tests. This biocatalyst was stable during storage at 4 °C, retaining activity above 70% for 60 days. In the production of oligosaccharides, AGE-DS-DN0.5 demonstrated the similar efficiency of the free enzyme with polymerization degree up to 5. In the evaluation of the operational stability, AGE-DS-DN0.5 lost 60% of its activity in the first batch. After Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, the enzyme desorption was observed during the batch. When comparing the AGE-DS-DN0.5 spectra with that of the Eupergit CM commercial support after reuse, it was seen that the enzyme interacts with other groups present in the commercial support, which are not present in the epoxy-agarose. Such groups would be responsible for the strong multipoint linkage generated between the enzyme and the Eupergit CM support, which prevented the leaching of the enzymes during the reuse cycles. Therefore, further studies are necessary to functionalize agarose with reactive groups, besides the epoxy, that allow a strong interaction between enzyme and support.

Keywords: Epoxy-agarose. Co-immobilization. Dextranase. Oligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS









Figura 1 - Mecanismo da dextrana-sacarase para síntese de dextrana e reação do aceptor ...	19
Figura 2 - Critérios para classificação de um ingrediente alimentício como prebiótico	24
Figura 3 - Produção da dextrana pela dextrana-sacarase e a hidrólise da dextrana pela dextranase	27
Figura 4 - Ativação da agarose com epícloridrina formando o suporte agarose-epóxido	32
Figura 5 - Imobilização de enzimas em Eupergit C	33
Figura 6 - Espectro de Infravermelho da agarose não modificada (—) e do suporte agarose-epóxido (—)	42
Figura 7 - Espectro de Infravermelho do suporte agarose-epóxido (—) e do Eupergit CM (—)....	44
Figura 8 - Efeito da carga enzimática na co-imobilização da dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) em suporte agarose-epóxido	45
Figura 9 - Efeito do tempo de contato no processo de co-imobilização da dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) à 4 °C e pH 5,2	46
Figura 10 - Atividade relativa das enzimas dextrana-sacarase (A) e dextranase (B) em função do pH à 30 °C nos biocatalizadores  AGE-DS,  AGE-DS-DN0,5,  AGE-DS-DN2,5 e  AGE-DS-DN4,5 em função do pH à 30 °C	50
Figura 11 - Atividade relativa das enzimas dextrana-sacarase (A) e dextranase (B) nos biocatalizadores  AGE-DS,  AGE-DS-DN0,5,  AGE-DS-DN2,5 e  AGE-DS-DN4,5 em função da temperatura em pH 5,2.....	52
Figura 12 – Espectro de infravermelho do suporte agarose-epóxido (—) e do biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (—)	53
Figura 13 - Estabilidade ao armazenamento da co-imobilização de dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) em suporte agarose-epóxido (AGE-DS-DN0,5)	54
Figura 14 – Análise CCD do Grau de Polimerização (GP) de oligossacarídeos sintetizados pela enzima livre (1 UI/mL) e dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizada em suporte agarose-epóxido (1 UI/g de suporte) em pH 5,2. A1 e A2 enzima livre à 4 °C e 25 °C, respectivamente, B1 e B2 enzimas co-imobilizadas à 4 °C e 25 °C, respectivamente.	55
Figura 15 - Estabilidade operacional das enzimas co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido	56

Figura 16 – Espectro de infravermelho do suporte agarose-epóxido (—), biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (—) e biocatalisador AGE-DS-DN0,5 após reuso (—)	57
Figura 17– Espectro de infravermelho do suporte Eupergit C (—), do biocatalisador Eupergit C-DS-DN0,5 (—) e biocatalisador EupergitC-DS-DN0,5 após reuso (—).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligossacarídeos funcionais.....	25
Tabela 2 – Grupos funcionais presentes em suportes para formar ligações covalentes com enzimas	30
Tabela 3 – Parâmetros da co-imobilização de dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Agarose-epóxido
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DN	Dextranase
DS	Dextrana-sacarase
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
UI	Unidade Internacional
IR	Infravermelho
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Dextrana-sacarase	18
2.2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20
2.3	Dextrana.....	21
2.4	Oligossacarídeos.....	22
2.5	Dextranase	26
2.6	Imobilização de Enzimas.....	28
2.7	Suporte Agarose-epóxido	31
2.8	Imobilização da dextrana-sacarase	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos gerais	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	35
4.1	Obtenção das enzimas.....	35
4.2	Atividade enzimática da dextrana-sacarase	36
4.3	Atividade enzimática da dextranase.....	36
4.4	Preparo do suporte agarose-epóxido.....	36
4.5	Quantificação dos grupos epóxis em suporte agarose-epóxido	36
4.6	Solução enzimática contendo dextrana-sacarase e dextranase	37
4.7	Co-imobilização da dextrana-sacarase e da dextranase em suporte agarose-epóxido.....	37
4.8	Co-imobilização da dextrana-sacarase e da dextranase em Eupergit CM.....	37
4.9	Parâmetros de co-imobilização da dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido.....	38
4.10	Determinação do pH e da temperatura ótima	39
4.11	Análise densitométrica de carboidratos	39
4.12	Cromatografia de camada delgada (CCD)	39
4.12.1	<i>Cromatografia de camada delgada (CCD) - detecção de açúcares simples</i>	39
4.12.2	<i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD) – detecção de oligossacarídeos</i>	40
4.13	Síntese de oligossacarídeos	40

4.14	Estabilidade a estocagem	41
4.15	Estabilidade operacional.....	41
4.16	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.17	Análises estatísticas	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Caracterização do suporte agarose-epóxido por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	42
5.2	Quantificação dos grupos epóxis	43
5.3	Comparação do suporte agarose-epóxido e Eupergit CM (suporte comercial) por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	43
5.4	Efeito da carga enzimática na atividade recuperada do biocatalisador	44
5.5	Efeito do tempo de contato enzima-suporte	45
5.6	Parâmetros de imobilização	46
5.7	Caracterização do biocatalisador.....	48
5.7.1	<i>Efeito do pH na atividade enzimática</i>	48
5.7.2	<i>Efeito da temperatura na atividade enzimática</i>	51
5.8	Caracterização do suporte agarose-epóxido após imobilização por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	52
5.9	Estabilidade a estocagem	53
5.10	Síntese de oligossacarídeos	54
5.11	Estabilidade operacional das enzimas co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido.....	56
5.12	Avaliação do reuso do suporte agarose-epóxido por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	57
5.13	Avaliação do reuso do suporte Eupergit CM (suporte comercial) por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	58
6	CONCLUSÃO	59
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	59
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biocompatíveis e biodegradáveis que podem ser obtidas a partir de recursos renováveis. Essas características permitem sua aplicação na conversão de matérias-primas tornando processos industriais menos onerosos (SHELDON; VAN PELT, 2013). A enzima dextrana-sacarase (1,6- α -D-glucan-6- α -glucanosil transferase, EC.2.4.1.5) é uma glicosiltransferase que pode ser produzida pela cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F via processo fermentativo (VERGARA et al., 2010). Esse biocatalisador usa a sacarose como substrato para a produção de dextrana. No entanto, com o crescimento do mercado de alimentos funcionais a dextrana-sacarase vem sendo estudada para a produção de oligossacarídeos de cadeia longa, promovendo sua funcionalidade como prebióticos (SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Os oligossacarídeos são compostos por monossacarídeos com grau de polimerização que podem variar de dois a treze (SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014). Podem ser obtidos por meio físico, químico e enzimático (AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; HU et al., 2009; SEO et al., 2007). Alguns desses carboidratos são prebióticos: fibras alimentares com propriedades funcionais reconhecidas (WANG, 2009). A síntese desses açúcares torna-se cada vez mais importante para produção de alimentos mais saudáveis que oferecem componentes bioativos, além de nutrir. Ao chegar no intestino, os oligossacarídeos são fermentados por bactérias benéficas produzindo ácidos graxos de cadeia curta. Outros benefícios associados a eles são menor risco de câncer e o aumento da absorção de cálcio e magnésio (AL-SHERAJI et al., 2013).

A imobilização de enzimas é uma técnica utilizada para proporcionar o reuso desses catalisadores para que a produção de bioprodutos de interesse seja mais econômica. Para se obter um biocatalisador eficiente e estável é necessário conhecer as características da enzima para desenvolver um suporte compatível. Nos protocolos de imobilização podem ser usadas matrizes orgânicas e inorgânicas para o encapsulamento, adsorção física, ligação covalente ou até mesmo não usar matrizes formando agregados enzimáticos, através das ligações cruzadas (KUBIK; SIKORA; BIELECKI, 2004; PEDROCHE et al., 2007; WANG et al., 2008, 2013). A agarose é uma matriz polimérica com boa aplicabilidade por não ser facilmente degradada por micro-organismos, ser de baixo custo, fácil uso, não tóxica e possuir grande área superficial com diferentes tamanhos de poros (PORATH; AXÉN, 1976; ZUCCA;

FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Ao modificar a agarose com epícloridrina, os grupamento epóxis gerados podem se ligar covalentemente aos grupos reativos da enzima gerando ligações multipontuais que tornarão a estrutura da enzima mais rígida o que pode promover uma maior estabilidade a enzima (MATEO et al., 2000).

A imobilização da enzima dextrana-sacarase é considerada um grande desafio por muitos autores. Isso se deve a estrutura complexa dessa enzima, pois trata-se de um trímero de 180 kDa, que possui uma camada de dextrana mascarando seus grupos reativos impedindo-os de ligar-se aos grupos reativos presentes no suporte (KIM; ROBYT, 1994; PARLAK; USTEK; TANRISEVEN, 2013). Outro fator apontado para explicar os baixos rendimentos na imobilização da dextrana-sacarase, está na presença de resíduos como lisina, aspartato e glutamato no centro ativo da enzima que podem ligar-se a grupos como os aldeídos presentes alguns suportes (ALCALDE et al., 1999). Para tornar os grupos reativos da dextrana-sacarase mais acessíveis são usadas técnicas de co-imobilização com a enzima dextranase. A dextranase promove a hidrólise da molécula de dextrana ligada à dextrana-sacarase o que aumenta a atividade recuperada dos biocatalisadores desenvolvidos (ERHARDT; JÖRDENING, 2007; ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Dessa forma, a imobilização em suporte que promova múltiplas ligações covalentes, como agarose-epóxido, pode ser uma alternativa para imobilizar essa enzima (SEGURA et al., 2004).

Portanto, como alternativa ao suporte Eupergit C, que obteve boa compatibilidade com a enzima dextrana-sacarase (SEGURA et al., 2004), mas foi descontinuado, esse trabalho propõe estudar condições de co-imobilização das enzimas dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido para promover a síntese de oligossacarídeos.

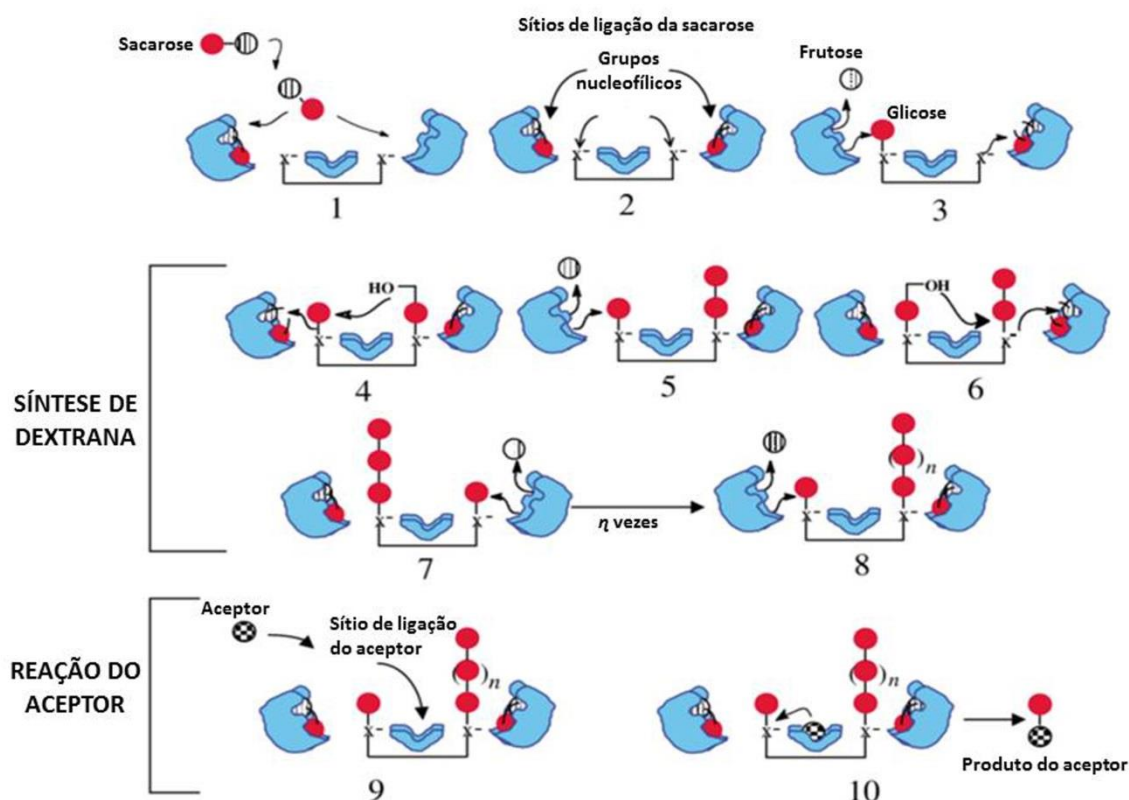
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dextrana-sacarase

Dextrana-sacarase (DS) é uma enzima extracelular produzida por micro-organismos dos gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Ela se apresenta como um trímero agregada à dextrana endógena (KOBAYASHI; MATSUDA, 1986). Essa enzima catalisa dois tipos de reações: a reação primária (reação do substrato) na qual a dextrana é sintetizada a partir da sacarose e a secundária (reação do aceptor) em que a fração D-glicose da sacarose é adicionada aos carboidratos aceptores produzindo oligossacarídeos (VETTORI; MUKERJEA; ROBYT, 2011).

As reações catalisadas pela dextrana-sacarase como a hidrólise da sacarose, polimerização da glicose da sacarose e transferência da glicose para aceptores, são competitivas, o que indica que elas podem ocorrer no mesmo sítio ativo (SU; ROBYT, 1994). Os mecanismos das sínteses de dextrana e oligossacarídeos foram discutidos na literatura. A Figura 1 apresenta um dos mecanismos propostos que descreve o sítio ativo da dextrana-sacarase do *Leuconostoc mesenteroides* B-512F como tendo dois sítios de ligação para a sacarose e um sítio de ligação para o aceptor (PLOU et al., 2002; SU; ROBYT, 1994). A transferência das unidades de glicose para produção de dextrana ocorre após a formação de dois complexos enzimáticos covalentes glicosil-enzima (PARK; ROBYT; CHOI, 1996). A reação do aceptor foi primeiramente descrita por Koepsell *et al* (1953), eles observaram que com a presença de moléculas como maltose ou isomaltose, a rota de produção da dextrana era desviada para a produção oligossacarídeos. Desse modo, a reação do aceptor é encadeada pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila presente na terminação não-redutora do aceptor ao C-1 de um dos dois resíduos glicosil presentes em um dos complexos enzimáticos covalente glicosil-enzima (ROBYT; KIMBLE, 1974). Kobayashi e Matsuda (1978) sugerem que um dos sítios de ligação da sacarose pode ser o sítio de ligação do aceptor.

Figura 1- Mecanismo da dextrana-sacarase para síntese de dextrana e reação do acceptor



Fonte: PLOU *et al.* (2002).

Essa enzima é geralmente produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides*, bactéria ácido láctica presente naturalmente em alimentos fermentados e por isso reconhecida como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (AMAN *et al.*, 2011). A atividade enzimática dessa enzima expressa em Unidade Internacional (UI), é definida como uma unidade de atividade de dextrana-sacarase que libera 1 μmol de frutose a partir da hidrólise da sacarose por minuto.

A produção da enzima dextrana-sacarase pelo *Leuconostoc mesenteroides* se dá apenas na presença de sacarose (indutor) como fonte de carbono, pois trata-se de uma enzima indutiva, sendo necessário adicionar fontes de nitrogênio e sais minerais (NEELY; NOTT, 1962). Outros fatores como pH, aeração, temperatura e concentração de substrato são cruciais na produção de dextrana-sacarase (NAESSENS *et al.*, 2005). Para melhorar a estabilidade dessa enzima é indicada sua purificação parcial com polietileno-glicol, o que permite a presença de dextrana, além de outros fatores como íons de cálcio (Ca^{+2}) que se associam ao seu centro ativo conferindo maior estabilidade a sua estrutura tridimensional (CURRALERO,

1993; ROBYT; WALSETH, 1979).

A demanda por tecnologias verdes, que não agredem o meio ambiente, aumentou o interesse por tecnologias enzimáticas em processos industriais. Com isso, estudos avaliam as melhores condições de produção dessa enzima para diminuir o custo de produção e potencializar a síntese dos bioprodutos de interesse. Gan e colaboradores (2014) investigaram o efeito sinérgico da dextrana-sacarase com a dextranase visando a obtenção de dextranas com diferentes massas molares, como resultado observaram que dextranase adicionada ao meio com dextrana-sacarase sintetiza dextranas de baixa massa molar, e quando adicionada durante a reação, produzia dextranas de média massa molar. Na produção de oligossacarídeos utilizando a enzima dextrana-sacarase foi constatado que aumentando a concentração de açúcares redutores aumenta-se a formação de oligossacarídeos chegando ao grau de polimerização 12 (SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014). Quanto maior o grau de polimerização mais chances tem esse oligossacarídeo de ser usado como substrato por bactérias da microbiota intestinal.

2.2 *Leuconostoc mesenteroides*

Micro-organismos produzem uma vasta quantidade de exopolissacarídeos através de enzimas. O *Leuconostoc mesenteroides*, bactéria ácido láctica aeróbia facultativa, tendo como fonte de carbono a sacarose, produz a enzima dextrana-sacarase e assim possibilita a síntese de dextrana (VERGARA, 2007). Para seu crescimento ótimo, esse micro-organismo necessita de condições como a presença de minerais, vitaminas e aminoácidos, além de pH ótimo 6,5 para crescimento e temperatura de 25 °C a 30 °C (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2000).

A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F é segura do ponto de vista alimentar sendo usada comercialmente para produção de dextrana. As propriedades da enzima e do produto de interesse estão relacionadas à cepa bacteriana. Durante a produção da enzima, como a sacarose é usada como indutor, há a formação de um caldo viscoso, já que ao mesmo tempo em que a enzima é produzida pelo micro-organismo a dextrana é sintetizada (MIZUTANI et al., 1994).

A cepa mutante de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC, linhagem constitutiva, produz dextrana-sacarase usando outras fontes de carbono, porém não produz dextrana

durante o processo o que poderia diminuir a estabilidade da enzima formada (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011). Esta cepa foi isolada na Iowa State University e não está disponível comercialmente.

Diferentes linhagens de *L. mesenteroides* são aplicadas na produção de dextrana-sacarase, dextrana, frutose, manitol, ácido láctico, oligossacarídeos prebióticos, bioprodutos de interesse nas indústrias alimentícia e da saúde. O cultivo *L. mesenteroides* BD1710 foi testado em suco de tomate suplementado com 15% de sacarose, sintetizando 32g/L de dextrana (HAN et al., 2014). Na avaliação do suco de caju clarificado como substrato para produção de produtos com alto valor agregado, o cultivo da *L. mesenteroides* B-512F mostrou-se viável, assim como a síntese de oligossacarídeos, dextrana, manitol e ácido láctico (HONORATO et al., 2007). A produção da enzima dextrana-sacarase a partir do *L. mesenteroides* B-512F tendo o suco de caju clarificado como substrato comprovou que a atividade enzimática é 3,5 vezes maior que a encontrada em meio sintético (CHAGAS et al., 2007).

2.3 Dextrana

Dextrana é um polissacarídeo produzido a partir da enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides*. Consiste em monômeros de glicose ligados 95% por ligações α -(1-6) na cadeia principal e ligações α -(1-2), α -(1-3) e α -(1-4) nas ramificações (VANDAMME; SOETAERT, 1995). Esse termo foi introduzido pela primeira vez em 1874, quando observou-se que o espessamento de caldo de cana-de-açúcar e de beterraba, ricos em sacarose, era devido à presença desse carboidrato (ALSOP, 1983).

Esse exopolissacarídeo é amplamente aplicado na indústria de alimentos, farmacêutica e química. As dextranas são solúveis em água e insolúveis em álcool. Seu grau de ramificação diminui sua solubilidade e altera suas propriedades reológicas. Apesar de ter grande aplicação industrial em alguns processos, ela não é muito desejada na indústria de bebidas e usinas de cana de açúcar, pois forma precipitados que geram problemas operacionais e aumentam a viscosidade da bebida (RODRIGUES FILHO et al., 2007).

Na produção enzimática de oligossacarídeos a dextrana é formada em maior ou menor quantidade dependendo do aceptor e das condições da reação. Na presença de aceptor, as frações de glicose são desviadas da cadeia de dextrana e incorporadas na molécula do aceptor formando oligossacarídeos (ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008). Os aceptores são

classificados como: fortes, médios e fracos. Dentre eles os glicossacarídeos maltose e isomaltose são considerados fortes aceptores, favorecendo a produção de oligossacarídeos com alto grau de polimerização (DEMUTH; JÖRDENING; BUCHHOLZ, 2002; NEELY, 1959; RABELO, 2012).

Vários estudos avaliaram as concentrações de açúcares redutores e sacarose para obter menor quantidade de dextrana e maior de oligossacarídeos prebióticos. Em sucos de caju, acerola, abacaxi, melão e laranja foi observado que o ajuste da proporção aceptor/sacarose diminui a produção de dextrana e maximiza de oligossacarídeos (ARAÚJO et al., 2015; SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; FONTES et al., 2015; JOHANSSON et al., 2016).

2.4 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são carboidratos compostos de três a dez unidades de monossacarídeos que podem ser lineares ou ramificados e são ligados entre si por ligações glicosídicas α - e/ou β - (ZHAO et al., 2017). Esses carboidratos podem ser reconhecidos como prebióticos quando estimulam o crescimento dos micro-organismos (bifidobactérias e lactobacilos) que compõem a biota intestinal beneficiando a saúde do hospedeiro (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Uma das características que confere a funcionalidade dos oligossacarídeos como prebióticos está no carbono anomérico (C1 ou C2) das unidades de monossacarídeos, pois possuem uma configuração que não permite que suas ligações osídicas sejam susceptíveis a atividade hidrolítica das enzimas digestivas (α -amilases, sacarases e maltases). A fermentação desses oligossacarídeos produz ácidos carboxílico de cadeia curta por isso são classificados como ingredientes de baixo valor energético variando entre 1,5 a 2 kcal/g (ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Esses oligossacarídeos são solúveis em água e apresentam poder adoçante, no entanto seu dulçor diminui com o aumento da cadeia (HODONICZKY; MORRIS; RAE, 2012).

O uso dos oligossacarídeos, como ingredientes alimentares prebióticos, depende da sua capacidade de não ser digerido e absorvido na parte superior do intestino e assim atingir a parte inferior onde promoverá a fermentação e estimulação seletiva do crescimento de bactérias intestinais associadas a saúde (ZHAO et al., 2017). Dentre os efeitos benéficos

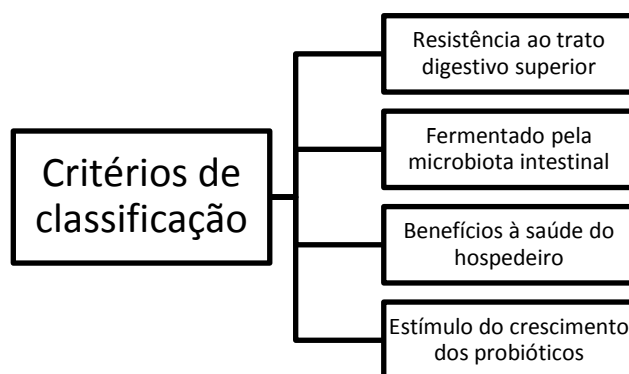
associados aos oligossacarídeos estão o não aumento da glicemia, pois ao chegar ao intestino eles formam um gel viscoso que diminui a absorção da glicose liberada, efeito não-cariogênico, estímulo à absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro pelo intestino (DELZENNE et al., 2007; GIBSON et al., 2004). Dentre os minerais, o cálcio é o mais comum no corpo humano e apresenta papel fundamental para o bom funcionamento de órgãos como o cérebro e o coração, além do desenvolvimento de ossos e dentes (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009).

De acordo com várias pesquisas, os metabólitos da fermentação dos oligossacarídeos apresentam um efeito protetor contra o câncer de cólon, diminuem as doenças intestinais infecciosas pela inibição de bactérias patogênicas (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.), reduz o risco de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II (DOU et al., 2009; ZHAO et al., 2017).

Atualmente o interesse em ter uma vida saudável tem aumentado, o que faz as pessoas buscarem alimentos que, além de saborosos, tragam benefícios à saúde. A aplicação de oligossacarídeos prebióticos como um ingrediente funcional em alimentos apresenta grande potencial para o incremento da qualidade do alimento, no que se refere a saúde do consumidor. O que possibilita uma vasta aplicação dos oligossacarídeos na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e química (PATEL; GOYAL, 2011).

A aplicação de prebióticos nos alimentos traz vantagens como o aumento das características sensoriais e um melhor balanceamento da composição nutricional. Em estudo das características sensoriais do sorvete de leite de cabra, a substituição da gordura do leite por prebióticos (inulina, frutooligossacarídeos, galactoolissacarídeos entre outros) aumentou os aspectos nutricionais e funcionais do alimento (BALTHAZAR et al., 2017). Em massas congeladas, a adição de frutooligossacarídeos e isomalto-olissacarídeos, melhorou a qualidade sensorial do pão (PARK; JANG; LIM, 2016).

Os oligossacarídeos são classificados como prebióticos quando são metabolizados tão bem como a glicose pelas cepas probióticas e não são pelas outras bactérias da biota intestinal (RASTALL; GIBSON, 2015). Na Figura 2 são apresentados alguns critérios para a classificação de um ingrediente alimentício como prebiótico.

Figura 2- Critérios para classificação de um ingrediente alimentício como prebiótico

Fonte: Wang (2009).

Os oligossacarídeos podem ser obtidos de fontes naturais como mel, cebola, alho, banana, tomate, centeio e cevada, porém em baixas concentrações. No entanto, também podem ser produzidos através da extração de fontes naturais (hidrolisando polissacarídeos) ou síntese enzimática a partir de dissacarídeos (BELORKAR; GUPTA, 2016; FLAMM et al., 2001). Sua nomenclatura se dá segundo os monossacarídeos que os compõem. A maioria dos prebióticos no mercado é derivada de oligossacarídeos não digeríveis. A Tabela 1 apresenta os oligossacarídeos produzidos comercialmente.

Tabela 1- Oligossacarídeos funcionais

Tipo	Monossacarídeos	Número de monossacarídeos	Ligações indicativas de funções
IMOS (isomalto-oligossacarídeos)	Glicose	2-5	α -1,4
SBOS (oligossacarídeos da soja)	Frutose, Galactose e glicose	2-4	α -1,4
FOS (frutooligossacarídeos)	Sacarose e frutose	2-5	β -1,2
XOS (xilooligossacarídeos)	Xilose	2-7	α -1,4
MOS (maltooligossacarídeos)	Manitose e glicose	2-10	α -1,2, α -1,4
Gentiooligossacarídeos	Glicose	2-10	β -1,6
Glico- oligossacarídeos	Glicose	2-10	α -1,2, β -1,3, β -1,6
Palatinose	Glicose e frutose	2	β -1,6
Malto-oligossacarídeos	Glicose	2-8	α -1,2
Lactusacarose	Galactose e frutose	2-3	β -1,4
Glicosilsacarose	Glicose e frutose	3	α -1,2, β -1,4
Galactooligossacarídeos	Galactose	2-5	β -1,2, α -1,4
Lactulose	Galactose e frutose	2	β -1,4
Rafinose	Galactose, frutose e glicose	3	β -1,2, α -1,4
Estaquiase	Galactose, frutose e glicose	4	α -1,4

Fonte: Qiang, YongLie & QianBing (2009).

Os processos enzimáticos são largamente aplicados na produção desses oligossacarídeos diferindo-os no grau de polimerização e no tipo de ligação. As enzimas são excelentes catalisadores, pois ao ajustar as condições de processamento é possível maximizar a produção e reutilizá-las na forma imobilizada. A produção de bebidas com baixa caloria a partir da modificação enzimática de açúcares em oligossacarídeos contribui para um balanceamento da dieta, pois é possível beber um suco com as mesmas características sensoriais, mas com uma redução de calorias de até 30% (NGUYEN et al., 2015). A produção enzimática de oligossacarídeos, através da reação do aceptor, em suco de limão desidratado obteve 94,81 g/L de oligossacarídeos com uma conversão de 63,21% dos açúcares. Os oligossacarídeos formados apresentaram grau de polimerização acima de 11 (COELHO et al., 2015). A produção de oligossacarídeos de cadeia longa pode aumentar a chance desse carboidrato alcançar o colón e assim garantir sua funcionalidade como prebiótico, promovendo a regulação do trânsito intestinal e absorção de minerais (Patel & Goyal, 2011).

2.5 Dextranase

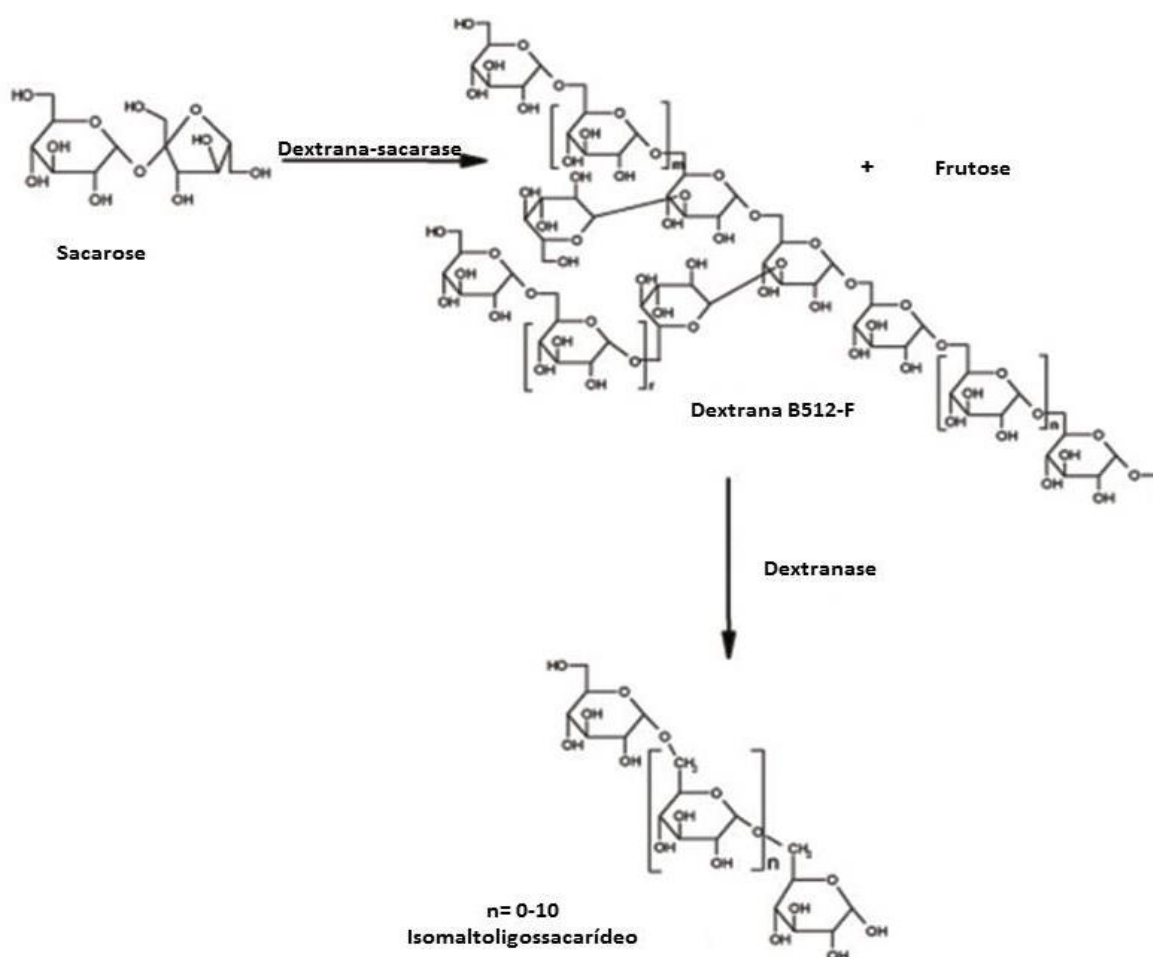
Dextranases são enzimas produzida por fungos, bactérias e leveduras, mas possuem maior atividade quando de origem fúngica. A aplicação principal dessas enzimas é a hidrólise de dextrana, polissacarídeo composto por monômeros de glicose. Essas enzimas podem ser divididas em exodextranases e endodextranases, dependendo de como agem e qual produto liberam na clivagem da molécula de dextrana. Exodextranases clivam as ligações α -1,6 da cadeia principal da dextrana liberando glicose e isomaltose, enquanto endodextranases liberam glicose e isomalto-oligossacarídeos (LEE et al., 2010). Os principais gêneros produtores de endodextranases são os *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Streptococcus* e *Bacillus* de bactérias, e *Penicilium*, *Aspergillus* e *Chaetomiun* de fungos (KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005).

A dextranase do *Chaetomiun erraticum* (1,6- α -D-glucan-6-glucanhydrolase, EC 3.2.1.11) é a mais usada comercialmente, é apresentada em forma líquida e reconhecida como segura do ponto de vista alimentar (GRAS). Industrialmente tem o objetivo de degradar as dextranas que contaminam a matéria-prima na indústria açucareira, além de outras aplicações como a produção de dextranas clínicas de baixa massa molar utilizadas na indústria farmacêutica e produtos que combatem a placa dentária como cremes dentais (EGGLESTON

et al., 2007; MAROTTA et al., 2002).

Estudos recentes exploraram o efeito sinérgico entre a dextranase e a dextrana-sacarase na produção de oligossacarídeos prebióticos, que promovem o crescimento de micro-organismo benéficos a biota intestinal (BERTRAND et al., 2014). Esse efeito se dá pela produção de dextrana pela dextrana-sacarase e o posterior uso da dextrana formada para produção de isomalto-oligossacarídeos pela dextranase (Figura 3). Foi visto que variando as condições de reações e concentração de dextranase e dextrana-sacarase é possível obter oligossacarídeos com grau de polimerização acima de 10 e com massa molar desejada para ser usada como prebióticos (GOULAS et al., 2004).

Figura 3- Produção da dextrana pela dextrana- sacarase e a hidrólise da dextrana pela dextranase



Fonte: Ölçer & Tanriseven (2010).

Outro avanço importante no uso sinérgico da dextranase com dextrana-sacarase está na sua aplicação imobilizada, a partir do desenvolvimento de protocolos de co-imobilização. Quando co-imobilizadas em cápsulas de alginato o mecanismo de ação dessas enzimas foi estudado, sabe-se que em baixas concentrações de glicose: sacarose (aceptor e substrato) a síntese de isomalto-oligossacarídeos é priorizada pela ação da dextranase. No entanto, com o aumento da concentração de acceptor (glicose) a produção de dextrana cai, desfavorecendo a atividade da dextranase, enquanto oligossacarídeos são produzidos pela dextrana-sacarase (ERHARDT et al., 2008).

A dextranase foi imobilizada em matrizes com diferentes grupos reativos dentre eles os epóxios, tais como os presentes no Eupergit C, obtendo atividade recuperada de 90% (ASLAN; TANRISEVEN, 2007). Esse resultado demonstra que a dextranase possui grupos reativos compatíveis com os grupos das matrizes epoxiladas, que promovem ligações multipontuais gerando um biocatalisador apto para produção de oligossacarídeos.

2.6 Imobilização de Enzimas

Técnicas de imobilização de enzimas são ferramentas importantes na indústria para a realização de processos que possibilitem a sua recuperação e reuso. Isso se deve ao fato de que a aplicação das enzimas livres é dificultada pela baixa estabilidade operacional, processo down-stream complexos, baixa produtividade e risco de contaminação. Com isso, um protocolo de imobilização ideal deve estabelecer todas essas condições, ter uma boa eficiência, além de custos acessíveis (CANTONE et al., 2013).

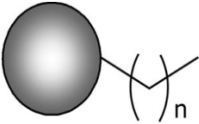
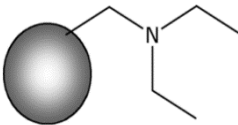
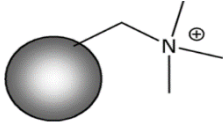
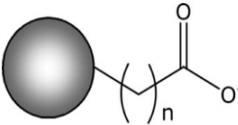
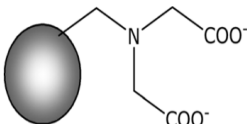
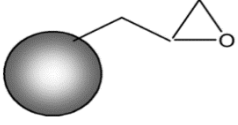
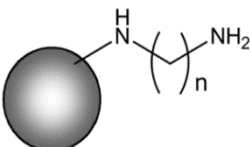
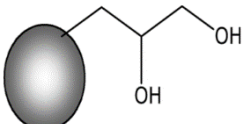
Atualmente, os métodos de imobilização têm a missão de preservar a atividade catalítica e obter as vantagens biotecnológicas que esses biocatalisadores oferecem. As principais técnicas de imobilização são: adsorção, aprisionamento, ligações covalentes e ligações cruzadas. Na adsorção, técnica reversível, a enzima é adsorvida à matriz por forças de Van de Waals, interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio (IZRAEL ŽIVKOVIĆ et al., 2015). É uma forma barata de se obter a enzima imobilizada, mas considerada fraca devido à natureza de suas ligações com a matriz.

No aprisionamento (técnica irreversível) a enzima é encapsulada por uma estrutura que retém a enzima, mas permite a passagem de substrato e produtos. Esse tipo de imobilização cria um ambiente ótimo para a enzima diminuindo a lixiviação e aumentando a

estabilidade mecânica (SHELDON; VAN PELT, 2013). No método ligações cruzadas (método irreversível livre de suporte) as enzimas formam ligações cruzadas entre si por meio de reagentes bi ou multifuncionais, como glutaraldeído. O aglomerado de enzimas formado não é mecanicamente resistente necessitando de um suporte físico para aumentar a resistência e possibilitar a aplicação industrial (SHAARANI et al., 2016) .

A imobilização por ligações covalentes é a mais usada para reter enzimas irreversivelmente. Essa imobilização se dá pela interação entre grupos reativos no suporte e os grupos das cadeias laterais da enzima como lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol), ácido aspártico e glutamato (grupo carboxílico), que não interferem na atividade catalítica da enzima (Tabela 2). O acoplamento da enzima com o suporte pode ser feito a partir dos grupos existentes ou gerando grupos reativos na superfície da matriz (MERYAM SARDAR, 2015).

Tabela 2 - Grupos funcionais presentes em suportes para formar ligações covalentes com enzimas

Método de imobilização	Grupo funcional	Estrutura	Ligação	Grupo reativo na enzima
Força de Van der Waals e interações hidrofóbicas	Alquila		A cadeia longa do alquila aumenta as interações hidrofóbicas na imobilização da enzima	Áreas hidrofóbicas na superfície
Interações iônicas	Triálquiamino		Adsorção iônica	Aminoácidos carregados negativamente
Interações iônicas	Tetraalquilamônio		Adsorção iônica	Aminoácidos carregados negativamente
Interações iônicas	Carboxilato		Adsorção iônica	Aminoácidos carregados negativamente
Afinidade metálica	Iminodiacético		Carregando metais como Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}	Poli-histidina
Ligações covalentes	Epóxi		Ligações covalentes formadas a partir de ataque nucleofílico e abertura do anel do grupamento epóxi	Grupos nucleofílicos (NH_2 e SH)
Ligações covalentes	Amino		Ativação com glutaraldeído introduz grupos aldeídos que formam ligações imino por ataque nucleofílico das aminas primárias	Aminas primárias (amino terminal e cadeias laterais de lisina)
Ligações covalentes	Diol		Ativação com BrCN gera um iminocarbonato cíclico reativo. Oxidação dos cis-diols com NaIO_4 para gerar dialdeídos	Aminas primárias (amino terminal e cadeias laterais de lisina)

Fonte: Cantone *et al.* (2013).

2.7 Suporte Agarose-epóxido

As características do suporte são determinantes na efetividade da imobilização, pois a interação enzima/suporte é o ponto fundamental para uma boa imobilização. Um suporte ideal deve ser hidrofílico, inerte exceto pela enzima, biocompatível, resistente aos micro-organismos, biodegradável, não tóxico e, principalmente, de baixo custo (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). A escolha do método de imobilização depende das características da enzima que se quer imobilizar. Para isso, existem vários suportes disponíveis no mercado com diferentes características físicas e químicas. Estes suportes são classificados quanto sua solubilidade, e subdivididos quanto à sua natureza orgânica e inorgânica.

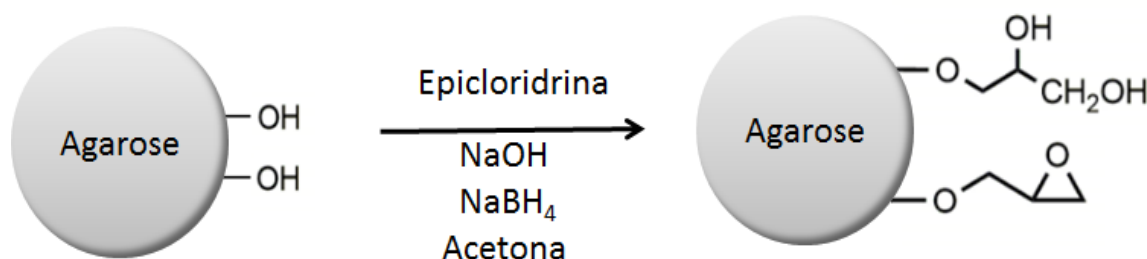
Os suportes porosos são os mais aplicados, pois possuem uma grande área superficial permitindo mais unidades de enzimas acopladas. Dentre eles a agarose se destaca por ser uma opção natural, extraída de algas, com alguns pontos positivos como o custo, hidrofiliabilidade, compatibilidade com várias técnicas de ativação, diferentes tamanhos de poros, resistência mecânica e resistente ao ataque microbiano, visto que poucos micro-organismos clivam as ligações β (1-4) e α (1-3) desse polímero (HEHEMANN; BORASTON; CZJZEK, 2014; PORATH; AXÉN, 1976). A agarose é considerada GRAS adequando-se como uma boa matriz polimérica na imobilização de enzimas para a aplicação em produtos alimentícios (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Uma variável que pode aumentar a intensidade da interação enzima suporte é a congruência geométrica. O gel de agarose é formado por associação não covalente de polímeros de agarose formando troncos. Quanto maior for a concentração de agarose maior serão esses troncos o que aumenta as chances de múltiplas ligações covalentes entre enzima e suporte, pois tem-se uma maior área superficial para ser modificada com grupos reativos (PEDROCHE et al., 2007).

A agarose possui grupos hidroxilas que podem ser funcionalizados com grupamentos epóxi (Figura 4). Tais grupamentos permitem uma intensa ligação covalente multipontual entre enzima e suporte, o que pode evitar a lixiviação da enzima. Grupos epóxi são estáveis em pH neutro e reagem com diferentes grupos nucleofílicos, além de amino primário, como tiol e hidroxila para formar fortes ligações sem modificação química da enzima. A imobilização covalente em agarose epoxilada vem sendo aplicada em diferentes enzimas como lipases, β -glicosidases, β -galactosidases e levansacarase (HILL; KARBOUNE;

MATEO, 2016; MANRICH et al., 2010; OVSEJEVI et al., 2004; VIEIRA et al., 2011).

Figura 4 - Ativação da agarose com epicloridrina formando o suporte agarose-epóxido



Fonte: Modificado de Alnoch *et al.* (2016).

2.8 Imobilização da dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase apresenta dificuldades em sua imobilização. Um dos fatores que se pode citar para essa dificuldade é a presença da dextrana ligada à enzima. Esse polissacarídeo mascara seus grupos reativos (lisina, glutamato e aspartato) impedindo-os de ligar-se aos grupos disponíveis nos suportes como aldeídos e epóxi (PARLAK; USTEK; TANRISEVEN, 2014).

KABOLI E REILLY (1980) publicaram um dos primeiros estudos imobilizando a enzima dextrana-sacarase em 13 diferentes suportes. Os resultados mostraram que apenas o suporte de sílica alquilamina reteve atividade em 10%, porém não foi capaz de aumentar sua estabilidade para aplicação industrial. O encapsulamento em alginato mostrou-se como um método bastante promissor para imobilização da enzima dextrana-sacarase. Foi relatado que a presença da dextrana favorecia o encapsulamento, pois permitia a retenção da enzima na matriz (REISCHWITZ; REH; BUCHHOLZ, 1995). No entanto, o acúmulo de dextrana, produzida pela enzima, causava ruptura das cápsulas. Como alternativa, estudou-se o encapsulamento em fibras de alginato, que permitiu uma maior difusão dos produtos como isomalto-oligossacarídeos durante dez bateladas retraindo acima de 80% de atividade recuperada (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002).

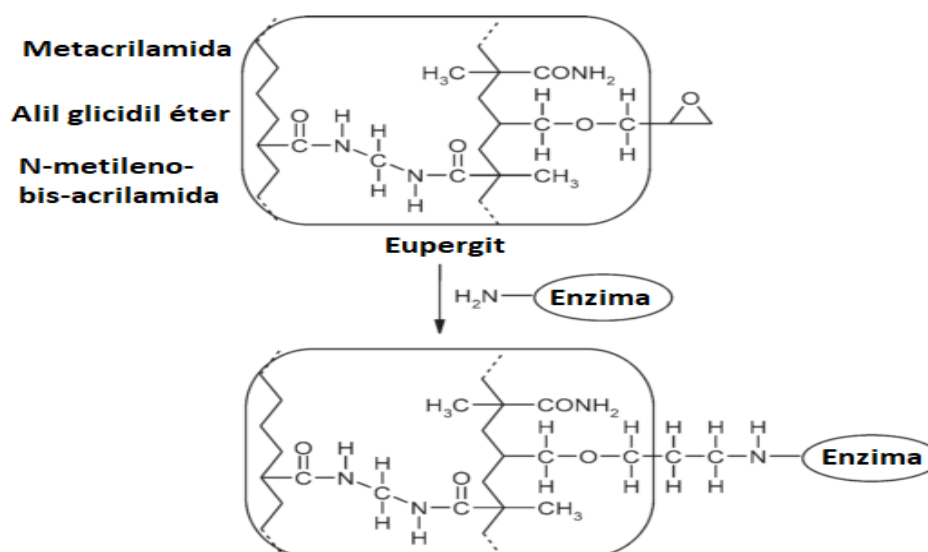
Para aumentar a estabilidade, e assim diminuir inativação da dextrana-sacarase durante o processo de imobilização, autores avaliaram a retirada da dextrana através da hidrólise realizada pela enzima dextranase, para então imobilizá-la (SEGURA et al., 2004;

HASHEM, 2012). ALCALDE e colaboradores (1999) obtiveram resultados expressivos na imobilização da enzima livre de dextrana em cápsulas de alginato, na qual apresentou maior estabilidade operacional quando comparada a enzima nativa (1999).

Nos últimos estudos envolvendo a enzima dextrana-sacarase foi explorado um possível efeito sinérgico com a enzima dextranase a partir do emprego da técnica de co-imobilização. Nessa imobilização a enzima dextranase já imobilizada é adicionada a outra solução com dextrana-sacarase para que ocorra a co-imobilização (ERHARDT et al., 2008; ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Em teste de estabilidade e armazenamento, a dextrana-sacarase co-imobilizada em cápsulas de alginato com dextranase previamente imobilizada em Eupergit C, obteve rendimento de 71%, reteve atividade enzimática durante 20 bateladas repetidas e 1 mês de armazenamento (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010).

Um dos suportes que obteve maiores rendimentos na imobilização de dextrana-sacarase foi o Eupergit C. O Eupergit C é um suporte sintético composto por matrizes com poros de 100-250 μm produzido pela copolimerização de N,N-metileno-bis-(metacrilamida), metacrilato de glicidila, éter alil-glicidílico e metacrilamida (Figura 5). Esse suporte possui 600 μmol grupos epóxi/ g de suporte o que proporciona múltiplas ligações covalentes, porém sua produção foi descontinuada (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

Figura 5- Imobilização de enzimas em Eupergit C



Fonte: Knežević-Jugović *et al.* (2011).

Na literatura é reportado um aumento na estabilidade térmica do biocatalisador contendo a dextranase e dextrana-sacarase co-imobilizadas em Eupergit C, possibilitando o sistema de operar a 30 °C. No mesmo estudo foi observado que o suporte Eupergit C 250L, com poros maiores, apresentava uma maior atividade enzimática por massa de catalisador com 710 U/g (SEGURA et al., 2004).

Quando se imobiliza uma enzima a perda de atividade pode ser compensada pelo número de reuso que aquela imobilização permite. A enzima dextrana-sacarase truncada no N e C terminais e fusionada com glutathione S-transferase nas terminações C e N imobilizada em Eupergit C, obteve um rendimento de 83,3% de atividade retida, estabilidade operacional em até 15 bateladas e preservou sua atividade durante 35 dias à 4 °C (PARLAK; USTEK; TANRISEVEN, 2013).

O sistema de imobilização deve satisfazer algumas condições para permitir a estabilidade nas ligações covalentes multipontuais da enzima com o suporte. Para isso um suporte com uma grande área superficial e maior disponibilidade de grupos reativos favorece a estabilidade do complexo enzima/suporte. Os suportes podem ser modificados a partir de adição de grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, tiosila etc, tendo como objetivo adequar-se a enzima de interesse para tornar o processo de imobilização mais eficiente (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014). A agarose quando derivatizada com epícloridrina forma grupos epóxi. Tal modificação favorece as ligações covalentes multipontuais.

Grupos reativos no suporte e aminos na enzima favorecem múltiplas ligações covalentes entre enzima e o suporte, aumentando a estabilidade a diferentes faixas de temperatura e diminuindo a desnaturação. A presença de grupamentos amino, está relacionada com os resíduos de lisina presentes na enzima, além das frações n-terminal (MANRICH et al., 2010). A enzima dextrana-sacarase possui muitos resíduos de lisina o que demonstra sua compatibilidade com suporte agarose-epóxido (FUNAME; OOKURA; KOBAYASHI, 1998). O número de resíduos de lisina está diretamente relacionado ao número de ligações entre enzima e suporte levando a uma maior estabilidade da enzima (PEDROCHE et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar condições de co-imobilização das enzimas dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido para aplicação na produção de oligossacarídeos prebióticos.

3.2 Objetivos específicos

- Co-imobilizar as enzimas dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido (AGE) por ligações covalentes multipontuais, avaliando os parâmetros de imobilização, concentração enzimática e quantidade de suporte;
- Avaliar a estabilidade do biocatalisador frente à diferentes temperaturas e pH;
- Avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador desenvolvido;
- Avaliar a estabilidade ao armazenamento das enzimas co-imobilizadas;
- Avaliar condições de síntese de oligossacarídeos prebióticos.

4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1 Obtenção das enzimas

A enzima dextrana-sacarase foi obtida através de processo fermentativo do micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* B512 F segundo RODRIGUES (2003). Foi utilizada a enzima comercial dextranase produzida pelo *Chaetomiun erraticum* (SIGMA).

4.2 Atividade enzimática da dextrana-sacarase

A determinação da atividade enzimática da enzima livre ou imobilizada se deu pela adição de solução de sacarose 10% (p/v) diluída em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 de cloreto de cálcio, pH 5,2. Após 10 minutos à 30 °C, o total de açúcares redutores foi determinado a partir do método de MILLER (1959). A atividade foi expressa em UI (Unidade Internacional) que corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de frutose, através da hidrólise da sacarose por minuto.

4.3 Atividade enzimática da dextranase

A dextrana do *Leuconostoc* spp. (SIGMA) com massa molecular relativa de 450-650 kDa foi usada na avaliação da atividade enzimática. A determinação da atividade enzimática da enzima dextranase se deu pela adição de solução de dextrana 1% (p/v) diluída em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 de cloreto de cálcio e pH 5,2. Após 10 minutos à 30 °C, o total de açúcares redutores foi determinado a partir do método de MILLER (1959). A atividade foi expressa em UI (Unidade Internacional) que corresponde a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de glicose por minuto.

4.4 Preparo do suporte agarose-epóxido

Para preparar o suporte agarose-epóxido foi lavado previamente 1g de agarose 6BCL e após esse processo foi suspensa em solução com 4,4 mL de água, 0,33 g NaOH, 0.02 g NaBH₄, 1,6 mL de acetona e 1,1 mL de epicloridrina. Após 16h sob leve agitação, o suporte já modificado foi lavado com água em abundância e seco por filtração à vácuo (MATEO et al., 2010).

4.5 Quantificação dos grupos epóxis em suporte agarose-epóxido

A quantificação dos grupos epóxi se deu pela suspensão de 1g de agarose ou

agarose-epóxido em 10 mL de ácido sulfúrico 0,5 M por 2 h para hidrolisar os grupos epóxi. Depois de hidrolisado, o material foi suspenso em 20 mL de água e oxidado com 2 mL de periodato de sódio 0,1 M por 2 h, como reportado anteriormente (GUISÁN, 1988). A quantificação se deu pela diferença entre a agarose não modificada e o suporte agarose-epóxido a partir da titulação com tiosulfato de sódio (MATEO et al., 2010).

4.6 Solução enzimática contendo dextrana-sacarase e dextranase

Previamente a co-imobilização, uma solução enzimática contendo dextrana-sacarase e dextranase foi preparada. Para definir a quantidade de dextranase adicionada a solução enzimática de co-imobilização, três diferentes quantidades foram estudadas. O biocatalisador AGE-DS (controle) continha dextrana-sacarase sem adição de dextranase, os biocatalisadores AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5 continham 0,5µL (2,76 UI), 2,5µL (13,80 UI) e 4,5µL (24,84 UI) de dextranase, respectivamente, diluído em 1ml de dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e 4 mL de tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05g/L de cloreto de cálcio e pH 5,2.

4.7 Co-imobilização da dextrana-sacarase e da dextranase em suporte agarose-epóxido

A co-imobilização se deu pela adição de 1 mL de solução enzimática ao suporte agarose-epóxido. A quantidade de suporte a ser adicionada a solução enzimática foi analisada a partir da adição de diferentes quantidades (100, 200, 300, 400 e 500 mg) e posterior imobilização por 24h à 4 °C sob leve agitação. O biocatalisador foi lavado com tampão acetato de sódio pH 5,2. O tempo de contato (4, 8, 16, 24 e 30 horas) enzima-suporte também foi analisado. A atividade enzimática do catalisador foi determinada de acordo com o item 4.2.

4.8 Co-imobilização da dextrana-sacarase e da dextranase em Eupergit CM

O suporte Eupergit CM foi usado para avaliar os grupamentos que interagem com a enzima, gerando ligações multipontuais, e comparar com os existentes no suporte agarose-

epóxico. O Eupergit CM foi submetido às mesmas condições de imobilização que o AGE-DS-DN0,5, já que este apresentou resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de imobilização. A co-imobilização se deu pela adição de 1 ml de solução enzimática contendo dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI), dextranase (0.5µl, 2,76 UI) diluídos em 4 mL de tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05g/L de cloreto de cálcio e pH 5,2 a 300 mg de suporte. A imobilização se deu por 24h à 4 °C sob leve agitação. O biocatalisador foi lavado com 10 mL tampão acetato de sódio pH 5,2. A atividade enzimática do catalisador foi determinada de acordo com o item 4.2.

4.9 Parâmetros de co-imobilização da dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxico

Para avaliar a eficiência da imobilização o rendimento de imobilização, eficiência e atividade recuperada foram calculadas a partir da equações seguintes (1-3) (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (3)$$

A atividade inicial é a atividade da solução enzimática adicionada ao suporte. Atividade imobilizada é a diferença da atividade do que foi oferecido inicialmente pela atividade que foi medido no sobrenadante. A atividade observada é aquela medida no biocatalisador.

4.10 Determinação do pH e da temperatura ótima

Os biocatalisadores AGE-DS, AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5 foram estudados quanto ao pH e temperatura ótimos para atividade enzimática. Para isso, o efeito do pH foi avaliado no intervalo de 4,5 e 7,0 (tampão acetato 20mM contendo 0,05 g/L de CaCl_2 para pH de 4,5 a 5,5 e o tampão fosfato 20mM contendo 0,05 g/L de CaCl_2 para pH de 6,0 a 7,0) a 30 °C. Para observar o efeito da temperatura os biocatalisadores foram suspensos em solução de sacarose 10 % (p/v) diluída em tampão acetato de sódio 20mM e 0,05g/L de cloreto de cálcio, pH 5,2 e expostos a diferentes temperaturas (15 °C a 40 °C). Os resultados foram avaliados em relação a quantidade de frutose e glicose liberadas ao meio por densitometria (Item 4.11).

4.11 Análise densitométrica de carboidratos

A quantidade dos açúcares glicose e frutose presentes nas amostras foi determinada por meio de análises densitométricas. Na qual a amostra (2-7 μL) foi aplicada em placa sílica gel 60 (Art.1,05553, Merck) 20 x 20 cm, formando bandas de 6,0 x 0,3 mm usando o amostrador automático ATS4 (CAMAG). Após a aplicação, as bandas correspondentes a cada açúcar foram reveladas de acordo com o Item 4.12.1. Para determinar a quantidade de açúcar foi construída uma curva de calibração com concentrações conhecidas de frutose e glicose. Para isso foi usado TLC Scanner 4 (CAMAG), com comprimento de onda de 490 nm, banda de 5,00 x 0,30 mm e avaliação por pico e área através do software winCATS.

4.12 Cromatografia de camada delgada (CCD)

4.12.1 Cromatografia de camada delgada (CCD) - detecção de açúcares simples

Para determinar qualitativamente a frutose e a glicose liberadas, as amostras foram analisadas por meio de cromatografia de camada delgada (CCD). Na qual uma quantidade de amostra (2-7 μL) foi aplicada em placa sílica gel 60 (Art.1,05553, Merck) 20 x

20cm, para sua posterior separação. Através da técnica de múltiplas ascensões essa placa foi posta em uma cuba cromatográfica contendo acetonitrila/água (85:15, v/v) para separação dos açúcares. Após o solvente atingir o limite superior da placa ela foi retirada da cuba e seca com a ajuda de secador portátil, esse procedimento foi repetido três vezes. Para detecção dos açúcares, a placa foi imersa rapidamente em solução de 0.3% (p/v) de 1-naftiletilenodiamina, 5% (v/v) ácido sulfúrico diluído em metanol para posterior aquecimento a 120 °C por 10 minutos para revelação dos spots.

4.12.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD) – detecção de oligossacarídeos

Para avaliar o grau de polimerização dos oligossacarídeos formados, as amostras foram analisadas por meio de cromatografia de camada delgada (CCD). Na qual uma quantidade de amostra (2-10 µL) foi aplicada em placa sílica gel 60 (Art.1,05553, Merck) 20 x 20cm, para sua posterior separação. Através da técnica de múltiplas ascensões essa placa foi posta em uma cuba contendo acetonitrila/acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90, v/v) para separação dos oligossacarídeos. Após o solvente atingir o limite superior da placa ela foi retirada da cuba cromatográfica e seca com a ajuda de secador portátil, esse procedimento foi repetido duas vezes. Para detecção dos oligossacarídeos, a placa foi imersa rapidamente em solução de 0.3% (p/v) de 1-naftiletilenodiamina, 5% (v/v) ácido sulfúrico diluído em metanol para posterior aquecimento a 120 °C por 10 minutos para revelação das bandas.

4.13 Síntese de oligossacarídeos

A síntese de oligossacarídeos se deu através da suspensão do biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (1UI/g de suporte) e 1UI/mL de enzima livre em solução de tampão acetato de sódio 20mM e 0,05g/L de cloreto de cálcio, pH 5,2, contendo sacarose (40g/L) e maltose (45g/L) para promover a síntese de oligossacarídeos (RABELO et al., 2006). Foram avaliadas diferentes temperaturas, 25 °C e 4 °C, para a produção de oligossacarídeos. Após 6h de síntese, a fração de oligossacarídeos (sobrenadante) foi separada da dextrana (precipitado) formada pela adição de 3 partes de álcool. A detecção dos oligossacarídeos foi realizada de acordo com o Item 4.12.2.

4.14 Estabilidade a estocagem

Para verificar a estabilidade à estocagem, as enzimas co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido, AGE-DS-DN0,5, foram armazenadas a 4 °C em tampão acetato de sódio 20mM e 0,05g/L de cloreto de cálcio, pH 5,2. A cada semana foi feito o ensaio de atividade da enzima dextrana-sacarase (Item 4.2) durante 60 dias.

4.15 Estabilidade operacional

As enzimas co-imobilizadas AGE-DS-DN0,5 e em Eupergit CM foram reutilizadas continuamente durante 10 bateladas a 25 °C. O substrato utilizado foi sacarose 10% (p/v) diluída em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 de cloreto de cálcio, pH 5,2. Após 10 minutos sob agitação, o sobrenadante foi separado do biocatalisador por centrifugação (4.025 x g, 2 min, 25 °C) e lavado para iniciar um novo ciclo.

4.16 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presentes nos suportes foram avaliados a partir dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier. As amostras de agarose, agarose-epóxido e Eupergit CM foram previamente liofilizadas e então analisadas usando um espectrofotômetro FTIR CARY 630 (Agilent Technologies), no intervalo de 4000- 500 cm⁻¹. As amostras foi posta diretamente em contato com a célula de leitura do equipamento, pois este não requer preparo de amostra.

4.17 Análises estatísticas

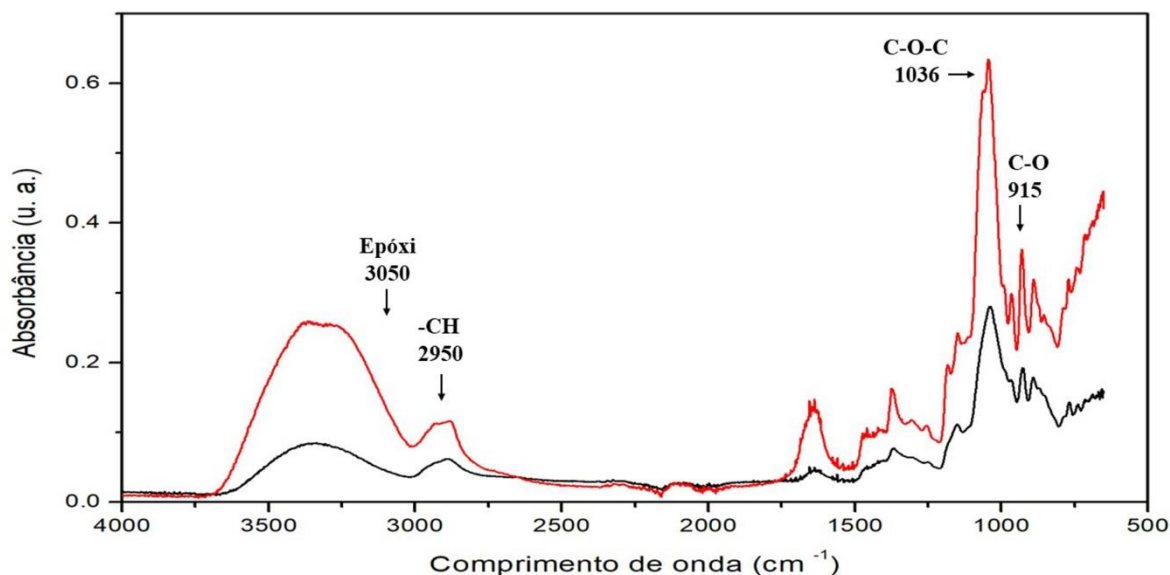
Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ao nível de confiança de 95% utilizando o programa Statistica versão 10, quando necessário. Todos os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do suporte agarose-epóxido por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A agarose vem sendo usada como matriz em protocolos de imobilização devido aos grupamentos hidroxilas presentes em sua superfície, os quais podem ser modificados gerando grupos mais reativos. A caracterização do suporte foi feita a partir do espectro de infravermelho (FTIR) da agarose antes e após modificação com epicloridrina. Os picos característicos da agarose são 3481 cm^{-1} (grupos hidroxilas), 1078 cm^{-1} (ligações glicosídicas, C-O-C) e 931 cm^{-1} (vibrações da ponte de C-O-C), dados apresentados na Figura 6 (SAMIEY; ASHOORI, 2012).

Figura 6- Espectro de Infravermelho da agarose não modificada (—) e do suporte agarose-epóxido (—)



Após ativação, é possível observar a presença de grupos epóxidos a partir de algumas regiões como a 3050 cm^{-1} (C-H do anel de epóxi), que apesar de estar muito próxima da forte absorção devido aos grupos hidroxilas ($\approx 3500\text{ cm}^{-1}$), é um indicativo da presença de grupos epóxidos. Outra região característica dos grupos epóxidos é a do pico 915 cm^{-1} (C-O do

epóxi) e 1036 cm^{-1} (C-O-C do éter) (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; CABANELAS; BASELGA, 2012). O pico 2950 cm^{-1} , correspondente as cadeias carbônicas, que também aumenta após a epoxilação indicando a presença de grupos gliceril oriundos do processo de ativação do suporte agarose-epóxido (MATEO et al., 2010).

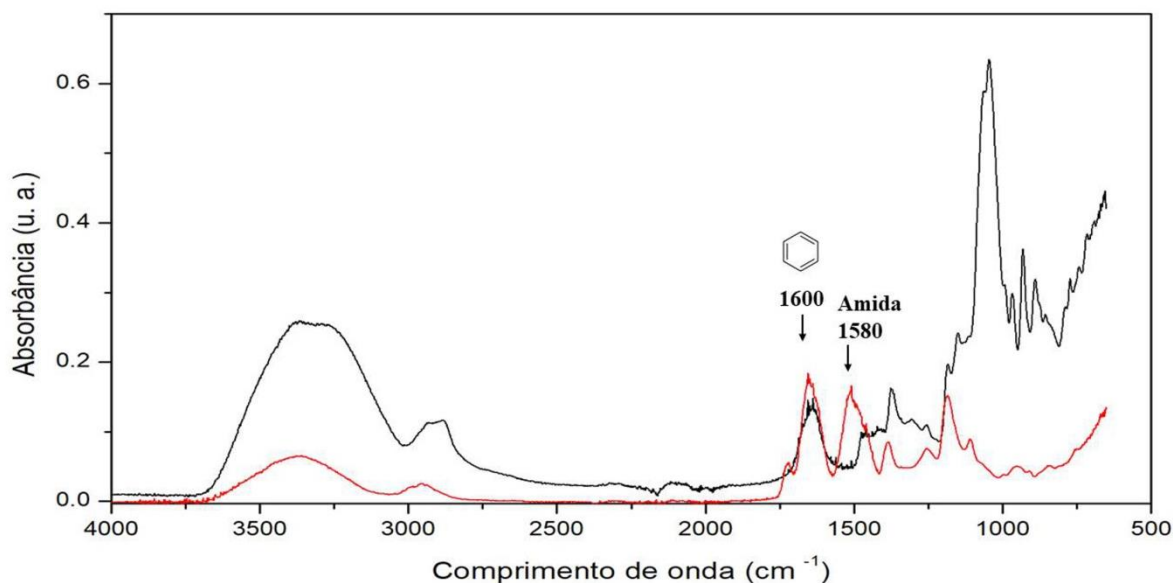
5.2 Quantificação dos grupos epóxis

A quantidade de grupamentos epóxi na agarose modificada foi de $45,50 \pm 3,54$ μmol grupos epóxi/g de suporte, valor relatado em outros estudos (MATEO et al., 2010). Sabe-se que o pH alcalino durante o processo de ativação da agarose reduz 60% do total de grupos epóxi formados, o que leva a um menor número de grupos epóxis quando comparado ao suporte comercial Eupergit C, que apresenta 600 μmol grupos epóxi/g de suporte (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

5.3 Comparação do suporte agarose-epóxido e Eupergit CM (suporte comercial) por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esse estudo buscou desenvolver um suporte com as mesmas vantagens do suporte Eupergit C, que foi descontinuado. Por esse motivo foi usado o suporte comercial Eupergit CM que difere do Eupergit C apenas no tamanho de suas partículas, que variam entre 50-300 μm . Para identificar os grupos presentes nos dois suportes, na Figura 7 é apresentado o espectro de infravermelho do suporte desenvolvido, agarose-epóxido, e do suporte comercial, Eupergit CM. Foi observado que o suporte agarose-epóxido apresenta bandas similares ao Eupergit CM. Porém exibe diferenças na região dos picos 1600 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} , regiões relacionadas a presença de anéis aromáticos e grupamentos amida (TRYTEK et al., 2015). Tais grupamentos, especialmente os grupamentos amidas, podem se ligar a enzima por interações hidrofóbicas e ligações covalentes, demonstrando a presença de outras regiões responsáveis pela estabilidade da enzima quando ligada ao suporte Eupergit C (GODOY et al., 2011). Estudos demonstram que a enzima é previamente adsorvida por interações hidrofóbicas em grupos presentes no suporte Eupergit C, o que torna os grupos reativos da enzima mais próximos aos grupos epóxi do suporte promovendo ligações multipontuais (BOLLER; MEIER; MENZLER, 2002).

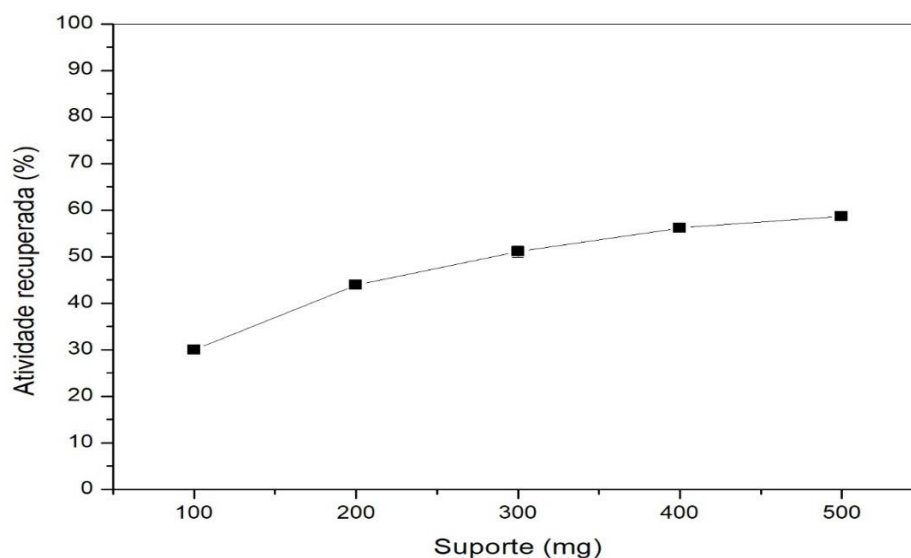
Figura 7- Espectro de Infravermelho do suporte agarose-epóxido (—) e do Eupergit CM (—)



5.4 Efeito da carga enzimática na atividade recuperada do biocatalisador

Diferentes quantidades de suporte agarose-epóxido (100-500 mg) foram suspensas em solução enzimática contendo dextrana-sacarase (1 mL, 26,16UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI). Os melhores resultados foram obtidos para 300 mg de suporte agarose-epóxido com 51% de atividade recuperada (Figura 8). O aumento da atividade recuperada obtido com quantidades superiores a 300 mg de suporte foi de 12%, valor não tão expressivo diante da quantidade de suporte oferecida. Esse resultado mostra uma possível saturação devido ao tamanho da dextrana-sacarase ou devido a ligações multipontuais com grupos associados ao centro ativo da enzima. Para os ensaios seguintes 300 mg foi a quantidade utilizada.

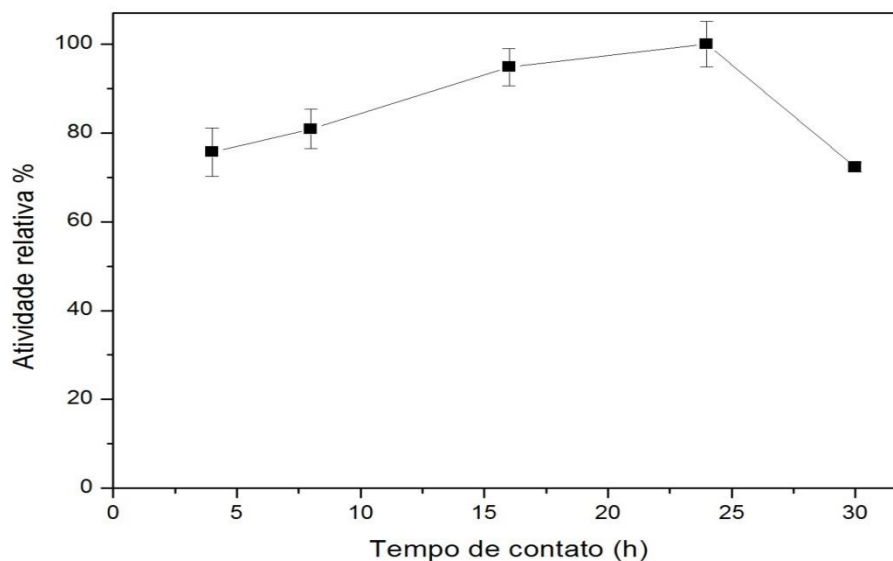
Figura 8 – Efeito da carga enzimática na co-imobilização da dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) em suporte agarose-epóxido



5.5 Efeito do tempo de contato enzima-suporte

Na Figura 9, observa-se que com 4 horas de contato a enzima apresenta mais de 70% de atividade relativa ao biocatalisador com 24h, o qual obteve o maior valor dentre os tempos analisados, indicando que rapidamente há a interação enzima-suporte e, ao longo do tempo, as mudanças conformacionais com a enzima já imobilizada favorecem a atividade enzimática. Com 30 horas de imobilização é visto um decréscimo nessa atividade, possivelmente, devido a inativação da enzima após longo período sob agitação. Para o protocolo de imobilização o tempo de contato de 24 horas foi usado. Segura e colaboradores (2004) imobilizaram a dextrana-sacarase em suporte Eupergit C e não observaram aumento significativo entre os tempo de 72 e 96 horas de imobilização à 4 °C.

Figura 9 - Efeito do tempo de contato no processo de co-imobilização da dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) à 4 °C e pH 5,2



5.6 Parâmetros de imobilização

A agarose epoxilada é capaz de promover ligações multipontuais com diversos nucleófilos presentes na estrutura da enzima. Porém, as condições como pH, temperatura, tempo de contato e carga enzimática podem influenciar os parâmetros de imobilização como o rendimento, eficiência e atividade recuperada. Para avaliar a co-imobilização da dextrana-sacarase e dextranase os parâmetros de imobilização são mostrados na Tabela 3. Todos os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey mostrando-se diferentes com grau de confiança de 95%.

Para estudar o efeito da dextranase no processo de co-imobilização, diferentes quantidades de dextranase foram adicionadas a solução enzimática 0,5µL (2,76 UI), 2,5µL (13,80 UI) e 4.5µL (24,84 UI), correspondendo aos derivados AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5. Como controle, o biocatalisador AGE-DS não teve adição de dextranase. Para rendimento de imobilização foi observado que o controle (AGE-DS) apresentou maior valor dentre as amostras com 21,50%, enquanto que para parâmetros como eficiência (184,44%) e atividade recuperada (39,62%) esse biocatalisador apresentou os menores valores. Tal resultado pode ser explicado pela inativação da enzima durante a imobilização (PARLAK; USTEK; TANRISEVEN, 2013).

Os biocatalisadores co-imobilizados AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-

DS-DN4,5 apresentaram eficiência acima de 300%, demonstrando que as mudanças conformacionais ocorridas durante a imobilização favoreceram a atividade enzimática, possivelmente por promover maior acesso ao centro ativo da enzima. Nesse estudo o íon Ca^{2+} foi usado na solução tampão para a imobilização dos catalisadores, sabe-se que o cálcio quando associado ao centro ativo da enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512F aumenta seu poder catalítico (MILLER; ROBYT, 1986). A presença desse metal estabiliza a estrutura tridimensional da enzima, o que pode ter gerado essa elevada eficiência nos biocatalisadores produzidos (PATEL; KOTHARI; GOYA, 2011; ROBYT; WALSETH, 1979). A enzima dextrana-sacarase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, previamente tratada com dextranase, apresentou eficiência de apenas 11%, porém nesse estudo o cálcio não foi usado no tampão para a imobilização da enzima (GRAEBIN et al., 2016).

Na Tabela 3 é possível observar que o aumento da quantidade de dextranase pode interferir negativamente no processo de co-imobilização, no que se refere a atividade recuperada. O uso de dextranase (AGE-DS-DN0,5) aumentou em 20% a atividade recuperada em relação ao controle (AGE-DS). No entanto, a medida que se aumenta a quantidade de dextranase o valor desse parâmetro decresce com 59,54%, 54,25% e 50,65% para os biocatalisadores AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5, respectivamente. Tal efeito pode ser explicado pela ação da dextranase na dextrana presa a dextrana-sacarase, pois esse polissacarídeo está relacionado a estabilidade desta enzima (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Com isso o AGE-DS-DN0,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 0,5µL, 2,76 UI) apresentou os melhores resultados na avaliação da co-imobilização demonstrando uma maior ativação da dextrana-sacarase quando co-imobilizada com dextranase.

Tabela 3 – Parâmetros da co-imobilização de dextrana-sacarase e dextranase em suporte agarose-epóxido

Biocatalisadores	Rendimento de imobilização *(%)	Eficiência* (%)	Atividade recuperada* (%)	Atividade do biocatalisador* (U/g de suporte)
AGE-DS	21,50 ± 0,49 ^a	184,44 ± 5,10 ^a	39,62 ± 1,10 ^a	4,20 ± 0,12 ^a
AGE-DS-DN0,5	11,16 ± 0,42 ^b	534,17 ± 8,11 ^b	59,54 ± 0,91 ^b	4,93 ± 0,07 ^b
AGE-DS-DN2,5	12,51 ± 1,13 ^b	435,72 ± 1,83 ^c	54,25 ± 0,23 ^c	5,66 ± 0,02 ^c
AGE-DS-DN4,5	16,65 ± 2,62 ^a	333,54 ± 1,57 ^d	50,65 ± 2,08 ^d	5,95 ± 0,04 ^d

AGE-DS (controle, DS 26,16 UI/mL), AGE-DS-DN0,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 0,5µL, 2,76 UI), AGE-DS-DN2,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 2,5µL, 13,80 UI) e AGE-DS-DN4,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 4,5µL, 24,84 UI). Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p > 0,05).

*Valores relacionados a atividade da dextrana-sacarase.

A enzima dextrana-sacarase apresenta dificuldades na sua imobilização devido a vários fatores envolvendo sua grande estrutura, como a dextrana endógena covalentemente ligada. Os melhores resultados reportados para sua imobilização foram através do encapsulamento em alginato, mas seu uso foi restrito pela síntese de dextrana que provocava problemas difusionais e a ruptura das cápsulas. Outros estudos demonstraram sucesso na imobilização dessa enzima em Eupergit C, suporte comercial que promove múltiplas ligações covalentes devido ao grande número de grupos epóxi. A dextrana-sacarase livre de dextrana foi imobilizada em Eupergit C 250L apresentando atividade recuperada de 22% (SEGURA et al., 2004). Na co-imobilização por encapsulação de dextrana-sacarase e dextranase, previamente imobilizada em Eupergit C250L, a atividade recuperada obtida foi de 71% (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Para solucionar os problemas encontrados na imobilização da dextrana-sacarase, Parlak e colaboradores (2013) desenvolveram uma forma truncada da enzima dextrana-sacarase fusionada com glutathione S-transferase. Esse novo catalisador foi covalentemente imobilizado em Eupergit 250L resultando em 83% de atividade recuperada. Apesar de apresentar bons resultados na imobilização da enzima dextrana-sacarase, o Eupergit C foi descontinuado pelo fabricante.

5.7 Caracterização do biocatalisador

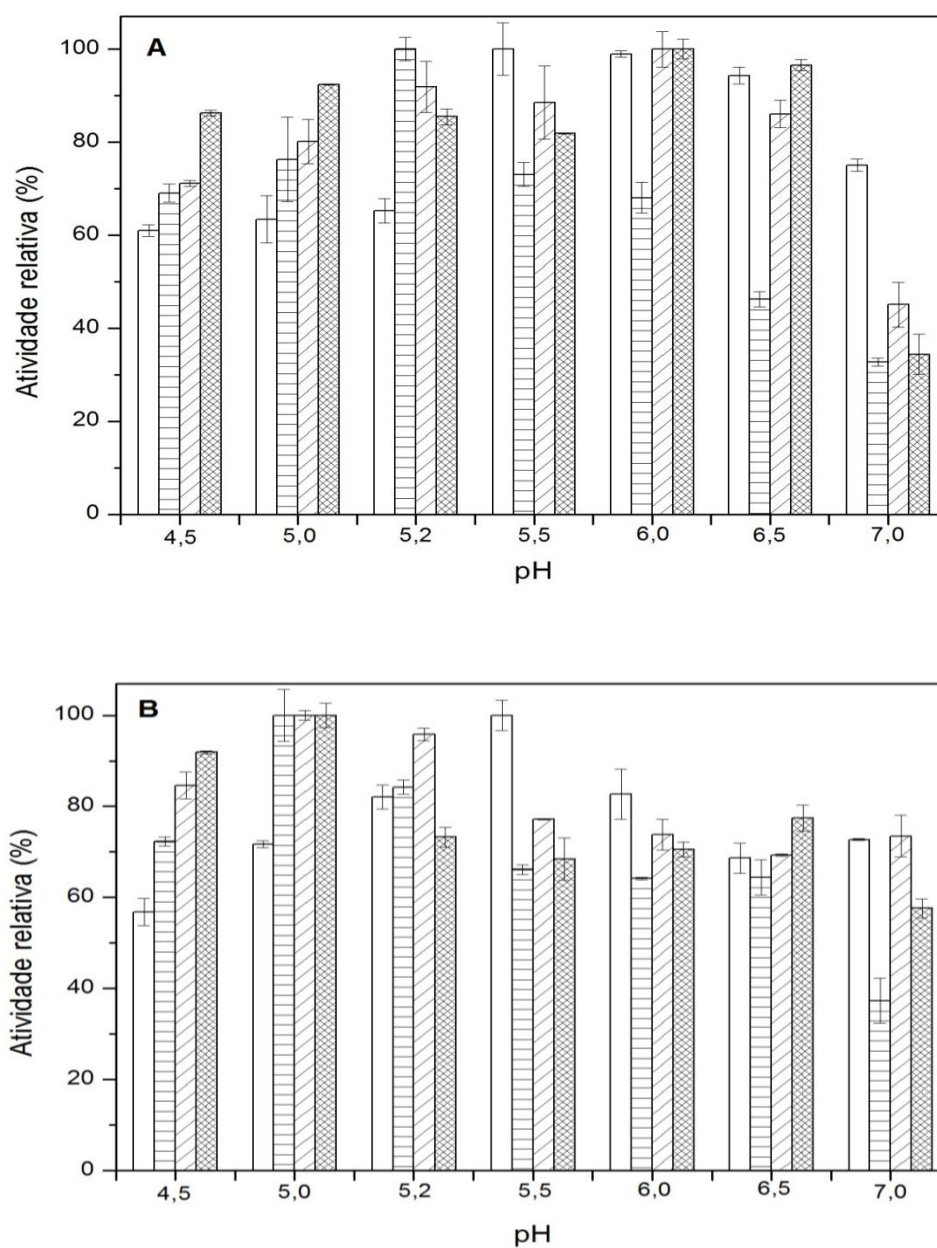
5.7.1 Efeito do pH na atividade enzimática

Estudos envolvendo co-imobilização expressam a atividade enzimática a partir da quantificação dos açúcares redutores totais pelo método de Miller (1959) que não diferencia glicose e frutose. No presente estudo, foi determinada a atividade da dextrana-sacarase que libera frutose e dextranase que libera glicose por meio de análises densitométricas e cromatografia de camada delgada, o que permite diferenciar a glicose e a frutose, mesmo que em concentrações na faixa de nanogramas. A partir da densitometria foi possível observar que a quantidade de frutose liberada foi maior que a de glicose mostrando que a atividade da dextrana-sacarase foi superior à da dextranase. A frutose liberada pela dextrana-sacarase se deve a hidrólise da sacarose para síntese de dextrana (ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008), enquanto que a glicose é produto da hidrólise da dextrana pela ação da dextranase (ERHARDT et al., 2008).

Como ponto positivo nos processos de imobilização está uma maior estabilidade diante de condições que causariam a inativação da enzima livre. Com isso, foi avaliado o comportamento da atividade da dextrana-sacarase e da atividade da dextranase co-imobilizadas em diferentes valores de pH (Figura 10). O biocatalisador AGE-DS (controle) mostrou uma ampla faixa de pH com atividade retida acima de 80% entre 5,5 a 7,0, demonstrando que a imobilização permitiu a retenção da atividade enzimática frente a diferentes pH. Esse resultado não é visto para a dextrana-sacarase livre do *L. mesenteroides* B512F, a qual apresentou atividade relativa acima de 80% apenas para pH 5,2 a 5,6 (TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017). Em outros estudos envolvendo a imobilização da dextrana-sacarase em cápsulas de alginato e Eupergit C 250L é demonstrado resultados similares com atividade retida na faixa de pH 5-6 (SEGURA et al., 2004; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017). Para os biocatalisadores co-imobilizados (AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5) foi observado comportamento similar ao controle, exceto pelo AGE-DS-DN0,5, que mostrou um decaimento em pH acima de 5,2. As enzimas co-imobilizadas apresentaram atividade relativa acima de 70% em pH 4,5, o que sugere potencial para aplicação na produção de bebidas prebióticas a base de suco de frutas, que são naturalmente ácidos (TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017).

A enzima dextranase quando co-imobilizada (AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5) obteve pH ótimo em 5,0 (Figura 10B). Em estudo com a dextranase do *Chaetomium erraticum*, a enzima livre apresentou pH ótimo em 5,2 retendo atividade acima de 60% na faixa de 4-7 (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2015). Dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizadas (AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5) mantiveram sua atividade acima de 60% até pH 7. Em estudo realizado por Aslan e Tanriseven (2007), a dextranase imobilizada em Eupergit C manteve atividade superior a 90% na faixa de pH entre 3,5 e 6,5. A dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizadas foram usadas por muitos autores devido ao efeito sinérgico para produção de oligossacarídeos, que podem ser usados em alimentos (ERHARDT et al., 2008; GOULAS et al., 2004; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017).

Figura 10– Atividade relativa das enzimas dextrana-sacarase (A) e dextranase (B) em função do pH à 30 °C nos biocatalizadores AGE-DS, AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5 em função do pH à 30 °C

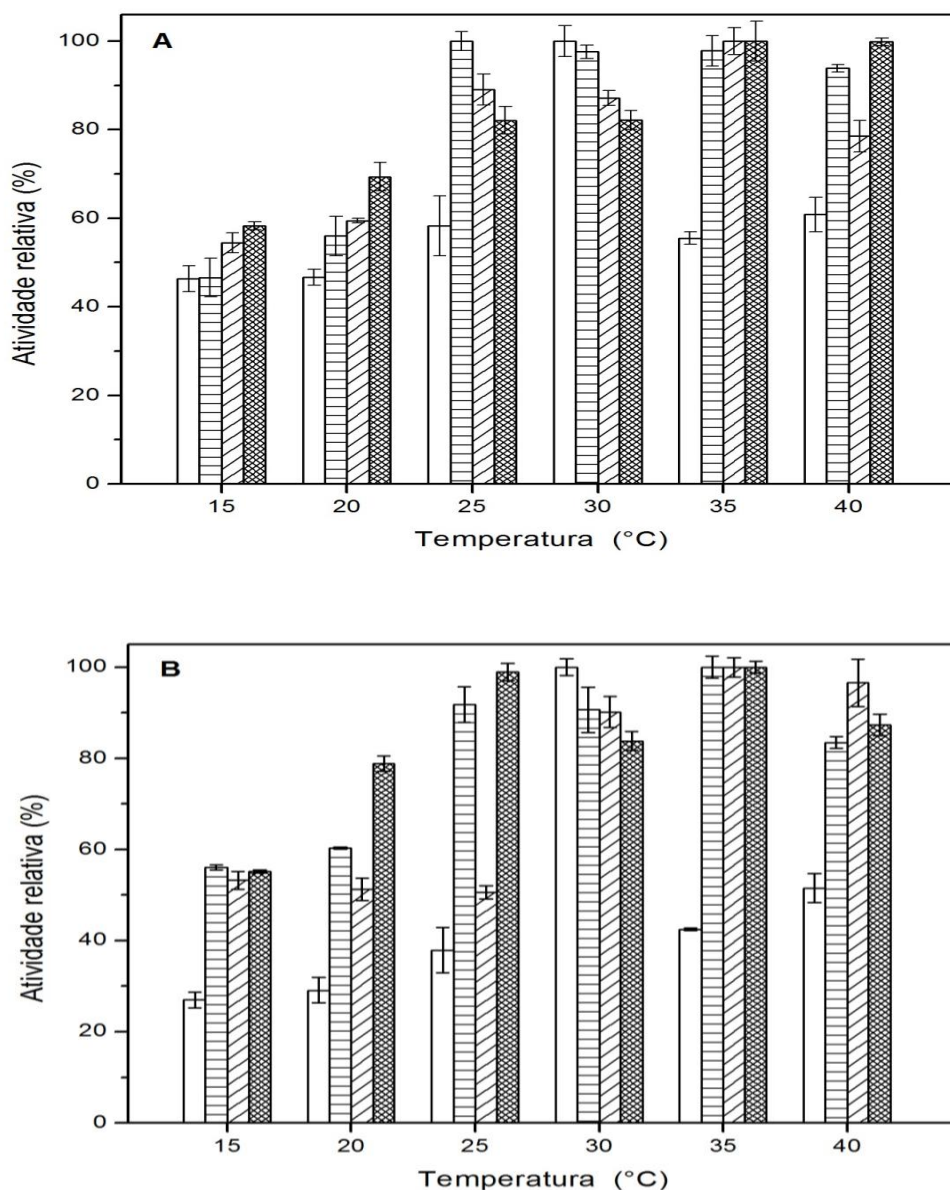


5.7.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Os biocatalisadores foram expostos a diferentes temperaturas a fim de avaliar sua estabilidade. Assim, na Figura 11 são apresentados os valores de atividade da dextrana-sacarase (A) e dextranase (B). No gráfico A da Figura 11 é possível observar que o controle (AGE-DS) apresentou decréscimos na atividade em temperaturas diferentes de 30°C, que se conhece como temperatura ótima para enzima dextrana-sacarase livre (ROBYT; WALSETH, 1979; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017). Tal comportamento já foi descrito para dextrana-sacarase imobilizada em sílica e cápsulas de alginato (HASHEM, 2012; KABOLI; REILLY, 1980). Logo, pode-se notar que a co-imobilização dessas enzimas em suporte agarose-epóxido favoreceu a retenção de atividade, com resultados acima de 75% na faixa de temperatura 25 a 40 °C. Isso pode ser explicado pela retirada da dextrana presa a dextrana-sacarase, que torna os grupamentos da enzima mais acessíveis e promove mudanças conformacionais gerando maior atividade em uma ampla faixa de temperatura. Resultados semelhantes são reportados para a enzima dextrana-sacarase imobilizada em diferentes matrizes (GRAEBIN et al., 2016; SEGURA et al., 2004; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017).

No gráfico B da Figura 11 é possível observar que a dextranase co-imobilizada (AGE-DS-DN0,5, AGE-DS-DN2,5 e AGE-DS-DN4,5) reteve atividade acima de 50% na faixa de temperatura de 30 a 40 °C. Como nesse estudo o objetivo é imobilizar a dextrana-sacarase para produção de oligossacarídeos, uma grande atividade da dextranase não é desejada, pois essa enzima pode hidrolisar oligossacarídeos formando uma quantidade expressiva de glicose. Na literatura é reportado para dextranase do *Penicillium lilacinum* livre ou imobilizada em cápsulas de alginato atividade ótima à 30-35 °C (ASLAN; TANRISEVEN, 2007). Outros autores apresentaram valores ótimos de atividade à 50 e 60 °C para dextranase do *C. erraticum* livre (BASHARI et al., 2013; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2015)

Figura 11 - Atividade relativa das enzimas dextrana-sacarase (A) e dextranase (B) nos biocatalizadores \square AGE-DS, \square AGE-DS-DN0,5, \square AGE-DS-DN2,5 e \square AGE-DS-DN4,5 em função da temperatura em pH 5,2

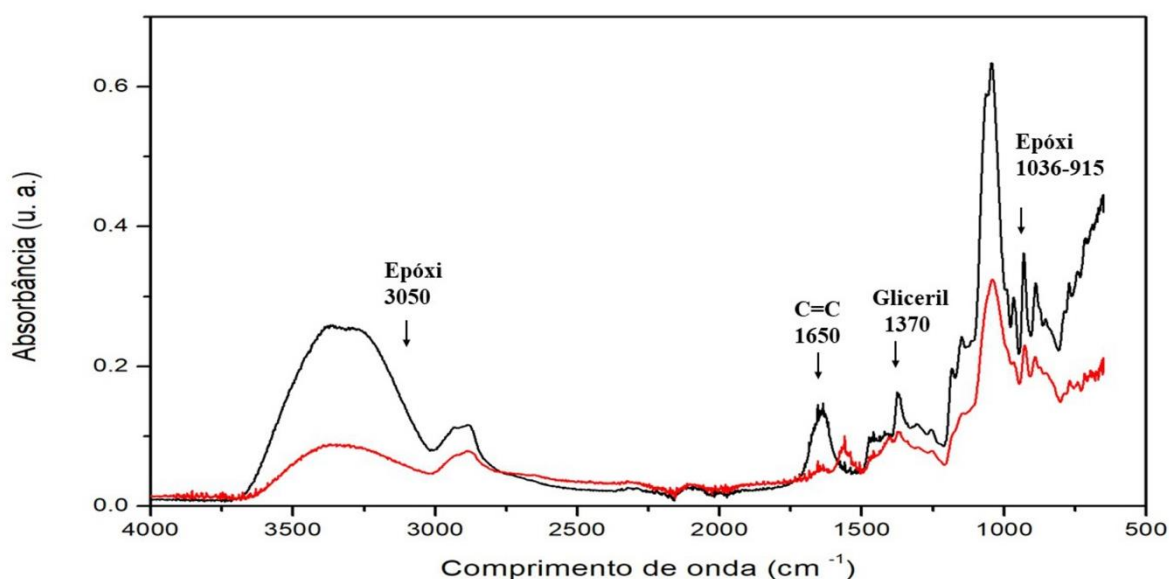


5.8 Caracterização do suporte agarose-epóxido após imobilização por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A partir da avaliação dos parâmetros de imobilização, pH e temperatura o biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 0,5 μ L, 2,76 UI) foi escolhido para os experimentos seguintes como a caracterização por espectroscopia na região do infravermelho. De acordo com a Figura 12, após a imobilização é visto que a enzima se ligou covalentemente

ao suporte agarose-epóxi, pois regiões indicativas de grupos epóxi (3050 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} e 915 cm^{-1}) apresentaram bandas de absorção menores após a imobilização. No mesmo espectro é possível observar interações em outras regiões como a 1650 cm^{-1} que está relacionada as ligações duplas de hidrocarbonetos ($\text{C}=\text{C}$) e 1370 cm^{-1} que é atribuída ao grupo gliceril ($\text{O}-\text{CH}_2$) (RABELO et al., 2015).

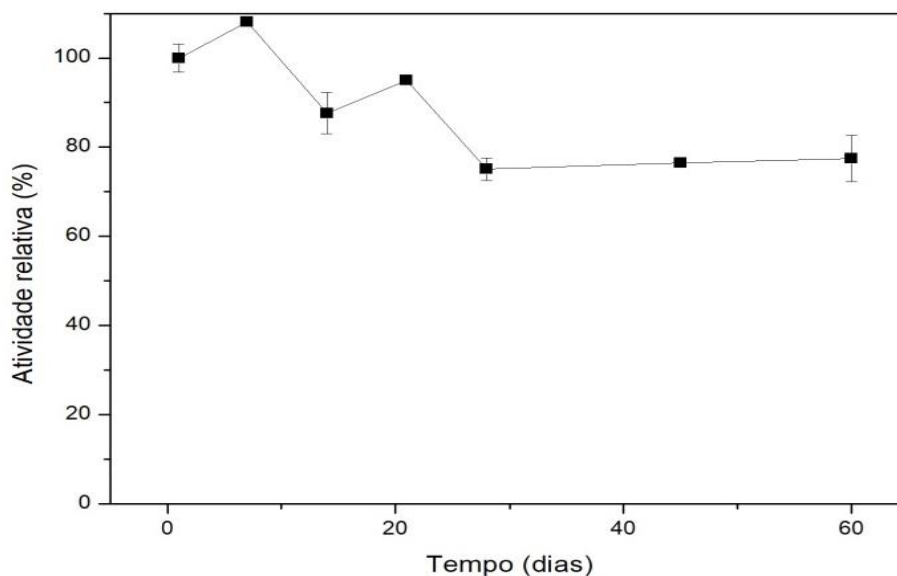
Figura 12 – Espectro de infravermelho do suporte agarose-epóxi (—) e do biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (—)



5.9 Estabilidade a estocagem

O biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (DS 26,16 UI /mL + DN 0,5 μ L, 2,76 UI) foi avaliado quanto sua estabilidade a estocagem a 4 °C. Foi observado que o biocatalisador desenvolvido reteve atividade acima de 70% por 60 dias (Figura 13). Na literatura não são encontrados resultados para estocagem por um período superior a 30 dias de armazenamento. Outros autores reportam que biocatalisadores a base de alginato e quitosana ativada com glutaraldeído e Eupergit C retiveram atividade por até 30 dias (GRAEBIN et al., 2016; SEGURA et al., 2004; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017).

Figura 13 - Estabilidade ao armazenamento da co-imobilização de dextrana-sacarase (1 mL, 26,16 UI) e dextranase (0,5 µL, 2,76 UI) em suporte agarose-epóxido (AGE-DS-DN0,5)

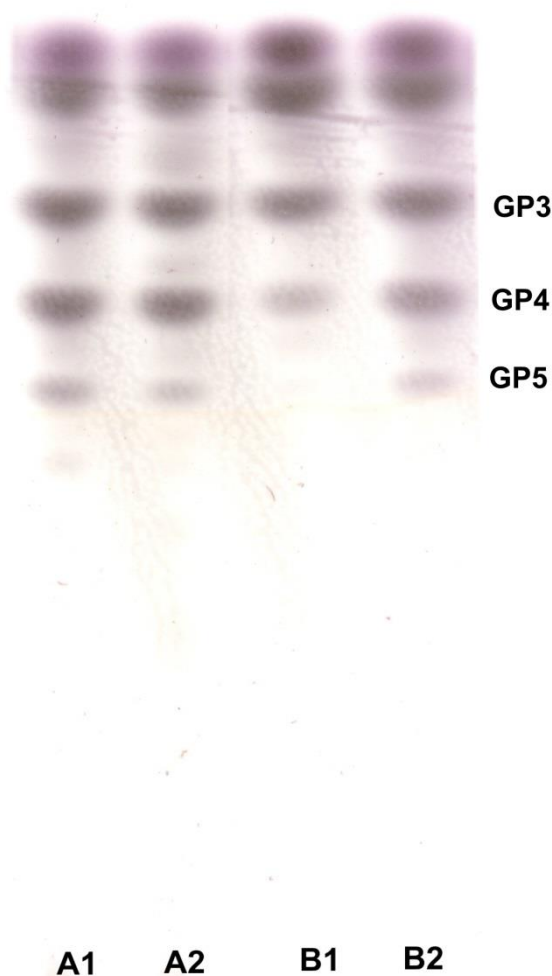


5.10 Síntese de oligossacarídeos

Para avaliar a eficiência desse biocatalisador na produção de oligossacarídeos foram utilizadas as enzimas dextrana-sacarase e dextranase livres e co-imobilizadas (AGE-DS-DN0,5) em suporte agarose-epóxido. A síntese de oligossacarídeos foi realizada por 6h, a 4 °C e 25 °C em pH 5,2. A condição de síntese foi baseada em estudos anteriores no qual foi utilizado solução tampão acetato de sódio 20mM e 0,05g/L de cloreto de cálcio, pH 5,2, contendo sacarose (40g/L) e maltose (45g/L) (RABELO et al., 2006). Na Figura 14, a placa de CCD mostra os graus de polimerização obtidos depois da síntese. As enzimas co-imobilizadas apresentaram um bom grau de polimerização, assim como a enzima livre. As enzimas co-imobilizadas (B2) tiveram comportamento similar as enzimas livres (A2) com oligossacarídeos com grau de polimerização de até 5. As enzimas dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizadas em cápsulas de alginato produziram oligossacarídeos com grau de polimerização acima de 8 após 9h de síntese em solução de sacarose 10% (p/v) e tampão de acetato de cálcio (25mM, pH 5,4) (ÖLÇER; TANRISEVEN, 2010). Oligossacarídeos de cadeia longa estão associados a uma maior eficiência para seu uso como prebiótico, quanto

maior GP maior a probabilidade de alcançar o cólon servindo como substrato para micro-organismos que compõem a biota intestinal, assim promovendo benefícios à saúde (MAAWIA et al., 2016). Nesse estudo não foi possível comprovar o aumento na produção de oligossacarídeos a temperaturas mais baixas conforme reportado por DAUM e BUCHHOLZ (2002), uma vez que a síntese realizada a 4 °C apresentou grau de polimerização similar ao obtidos com a síntese a 25 °C tanto para enzima livre quanto para a imobilizada.

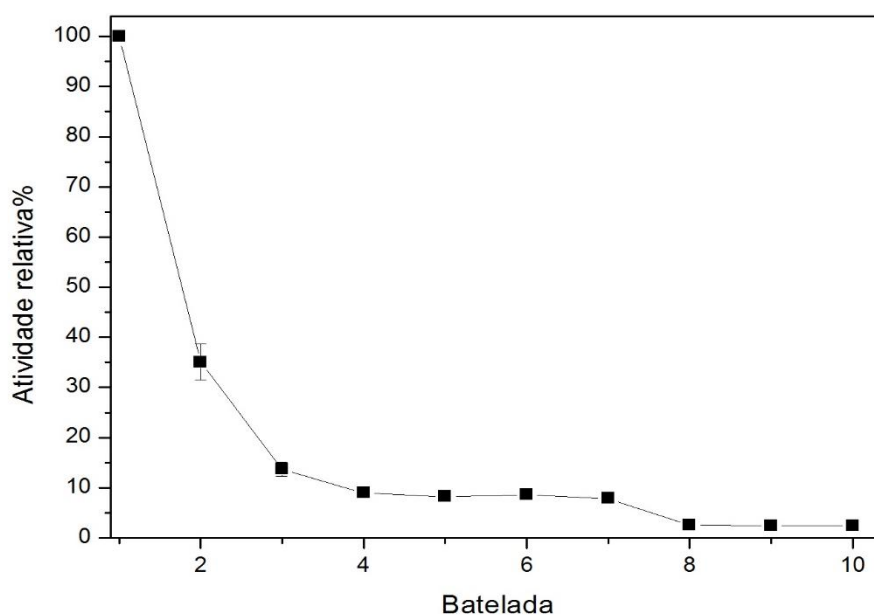
Figura 14 – Análise CCD do Grau de Polimerização (GP) de oligossacarídeos sintetizados pela enzima livre (1 UI/mL) e dextrana-sacarase e dextranase co-imobilizada em suporte agarose-epóxido (1 UI/g de suporte) em pH 5,2. A1 e A2 enzima livre à 4 °C e 25 °C, respectivamente, B1 e B2 enzimas co-imobilizadas à 4 °C e 25 °C, respectivamente.



5.11 Estabilidade operacional das enzimas co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido

A maior vantagem biotecnológica oferecida pelo processo de imobilização de enzimas é possibilitar seu reuso, diminuindo custos do processo. Na Figura 15 são apresentados os resultados da estabilidade operacional das enzimas co-imobilizadas (AGE-DS-DN0,5), a partir da hidrólise de sacarose durante 10 bateladas consecutivas à 25 °C. Nota-se que o biocatalisador perde 65% de atividade na primeira batelada, mantendo 10% de atividade até a sétima batelada. Isso mostra que o método de imobilização foi efetivo, mas a estabilidade operacional não foi satisfatória. Possivelmente, as ligações multipontuais da enzima não foram suficientes para promover o reuso desse biocatalisador, pois a enzima pode ter sido desorvida durante os ciclos repetidos. Sabe-se que as ligações multipontuais favorecem o aumento da estabilidade operacional por promover uma maior rigidez e estabilidade diante das diversas condições de processo (BOLLER; MEIER; MENZLER, 2002), mas este comportamento não foi observado para o catalisador AGE-DS-DN0,5.

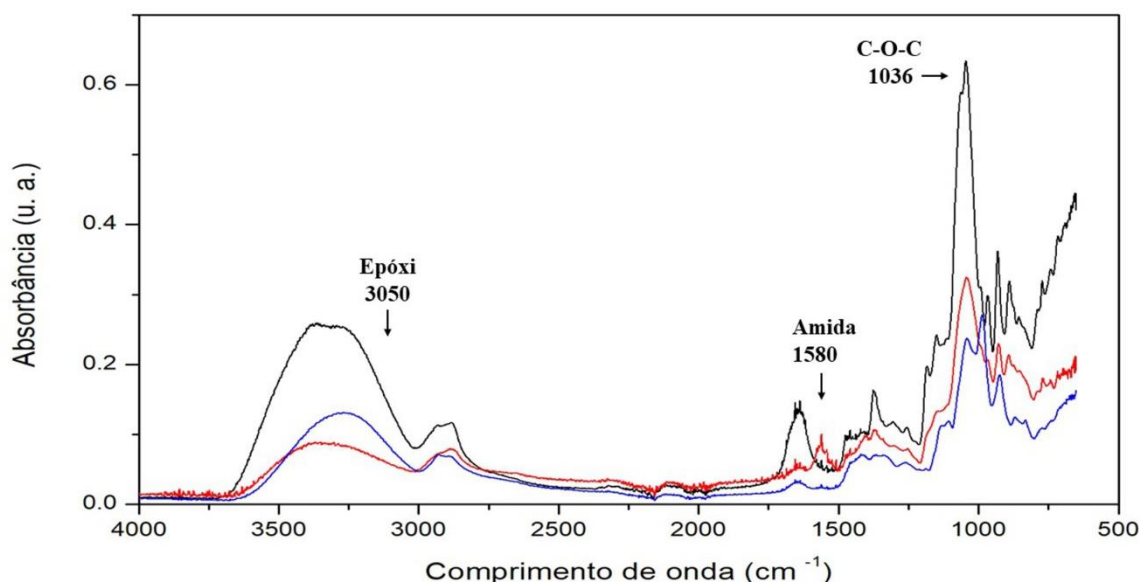
Figura 15- Estabilidade operacional das enzimas co-imobilizadas em suporte agarose-epóxido



5.12 Avaliação do reuso do suporte agarose-epóxi por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 16 apresenta o espectro IR do suporte agarose-epóxi (AGE) e do biocatalisador AGE-DS-DN0,5 antes e após o reuso. O biocatalisador AGE-DS-DN0,5 perdeu parcialmente suas enzimas durante os ciclos de reuso, conforme indicado pela bandas menores quando comparado aos espectros de absorção para o biocatalisador imobilizado. Foi observado uma redução no pico 3050 cm^{-1} , no qual é relacionado ao estiramento C-H do grupo metileno no anel epóxi, importante indicativo de grupo epóxi. Os picos indicativos de grupamento amina apresentaram bandas menores, indicando que houve dessorção da enzima. As regiões referente as aminas primárias ($1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) e secundárias ($1580\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$), características de enzimas, apresentam o mesmo perfil da agarose não modificada. Esse resultado indica que as ligações entre enzima-suporte não foram fortes suficientes para promover o reuso desse biocatalisador, promovendo a lixiviação das enzimas durante o processo (MATEO et al., 2000).

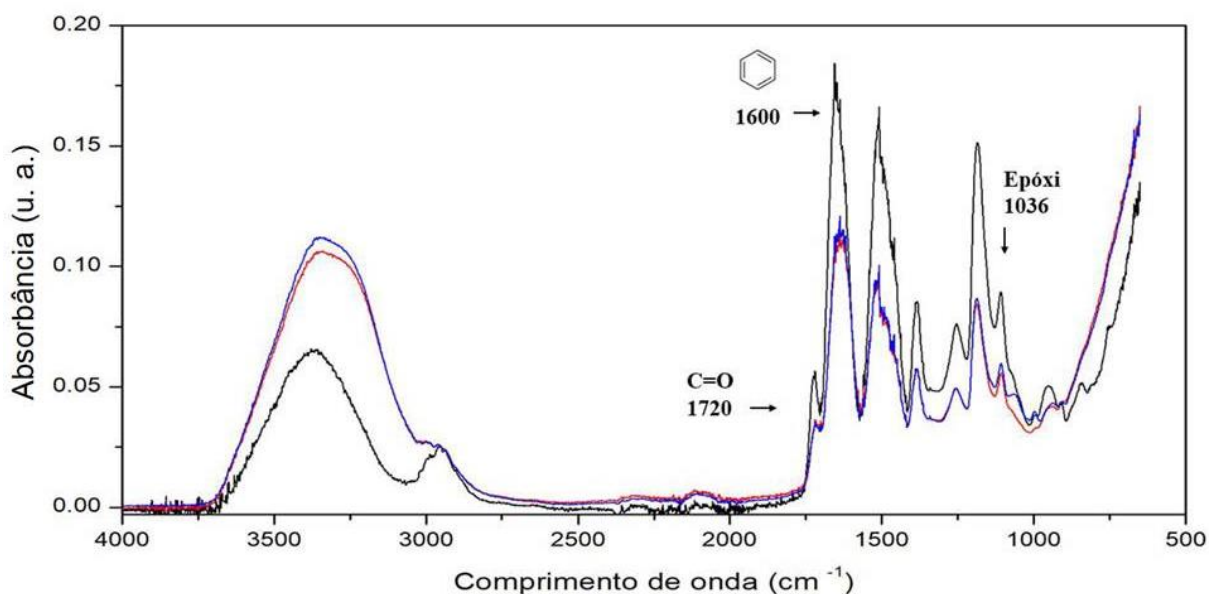
Figura 16 – Espectro de infravermelho do suporte agarose-epóxi (—), biocatalisador AGE-DS-DN0,5 (—) e biocatalisador AGE-DS-DN0,5 após reuso (—)



5.13 Avaliação do reuso do suporte Eupergit CM (suporte comercial) por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Devido a baixa estabilidade operacional do biocatalisador em suporte agarose-epóxido, o suporte comercial Eupergit CM foi submetido às mesmas condições de imobilização e reuso do biocatalisador imobilizado em agarose-epóxido, para fins de comparação. No espectro do IR (Figura 17) é mostrado que as enzimas foram co-imobilizadas no Eupergit CM, pois regiões relacionadas aos grupos epóxi ($915\text{--}1036\text{ cm}^{-1}$) apresentaram sinais menores que os do suporte Eupergit CM (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; CABANELAS; BASELGA, 2012). Após o reuso, as enzimas permaneceram imobilizadas no suporte Eupergit CM, indicando que não foram desorvidas durante os ciclos de reuso, apresentando o mesmo perfil que a enzima imobilizada em Eupergit CM. Esse resultado confirma a capacidade desse suporte em imobilizar covalentemente enzimas, devido à alta densidade de grupos epóxi (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). No entanto, outros picos foram alterados durante a imobilização, demonstrando que a enzima pode estar se ligando a outras regiões do Eupergit CM, além dos grupos epóxi. Tais como o pico 1600 cm^{-1} (anéis aromáticos), 1720 cm^{-1} (C=O) (TRYTEK et al., 2015).

Figura 17 – Espectro de infravermelho do suporte Eupergit C (—), do biocatalisador EupergitC-DS-DN0,5 (—) e biocatalisador EupergitC-DS-DN0,5 após reuso (—)



6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a co-imobilização da enzima dextrana-sacarase com a dextranase em suporte agarose-epóxido promoveu maior atividade recuperada para o biocatalisador AGE-DS-DN0,5 com 59,54%. As ligações geradas por esse processo permitiram que os biocatalisadores estudados mantivessem atividade enzimática em uma ampla faixa de pH e temperatura.

O AGE-DS-DN0,5 apresentou potencial na produção de oligossacarídeos (GP 5), mesmo resultado obtido para enzima livre, não apresentando problemas difusionais. Além disso, o biocatalisador AGE-DS-DN0,5 pôde ser armazenado durante 60 dias mantendo 70% de sua atividade à 4 °C.

O uso contínuo desse biocatalisador foi ineficiente, perdendo 65% de sua atividade na primeira batelada. A enzima foi desorvida durante o processo sugerindo que os grupamentos epóxis presentes no suporte não foram suficientes para promover a estabilidade operacional do biocatalisador produzido.

Para apresentar o mesmo sucesso de imobilização que o suporte Eupergit CM obteve com a enzima dextrana-sacarase, devido as múltiplas ligações covalentes, é preciso acrescentar outros grupamentos ao suporte agarose-epóxido. Visto que o suporte agarose-epóxido não possui a mesma densidade de grupos epóxi presentes no Eupergit CM, o qual apresenta outros grupos funcionais relacionados a ligação enzima-suporte que estão ausentes no catalisador AGE-DS-DN0,5.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para possibilitar o reuso desse biocatalisador é necessário o uso de outros protocolos de modificação da agarose, já que esta apresenta propriedades satisfatórias como matriz. Uma das alternativas é transformar o suporte agarose-epóxido em um suporte multifuncional com grupos adicionais que promovam a adsorção física (quelatos) e grupos, que simultaneamente, aos epóxidos se liguem covalentemente a enzima (glioxil) formando ligações multipontuais. Outra possibilidade, é a técnica de reticulação, na qual a adição de

reagentes como glutaraldeído fornece grupos reativos, que promovem maior rigidez a estrutura do biocatalisador.

REFERÊNCIAS

- AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 369–377, 2006.
- AL-SHERAJI, S. H. et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.
- ALCALDE, M. et al. Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 11, p. 749–755, 1999.
- ALNOCH, R. et al. New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization. **Catalysts**, v. 6, n. 12, p. 191, 2016.
- ALSOP, R. Industrial production of dextrans. **Microbial Polysaccharides: Progress in Industrial Biology**, v. 18, p. 1–44, 1983.
- AMAN, A. et al. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 910–915, 2011.
- ARAÚJO, A. D. A. et al. Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. August, p. 565–571, 2015.
- ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 1, p. 8–12, 2007.
- BALTHAZAR, C. F. et al. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p. 38–46, 2017.
- BASHARI, M. et al. Ultrasound-assisted dextranase entrapment onto Ca-alginate gel beads. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1008–1016, 1 jul. 2013.
- BELORKAR, S. A.; GUPTA, A. K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. **AMB Express**, v. 6, 2016.
- BERTRAND, E. et al. Dextranase immobilization on epoxy CIM® disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 707–713, 2014.
- BOLLER, T.; MEIER, C.; MENZLER, S. EUPERGIT oxirane acrylic beads: How to make enzymes fit for biocatalysis. **Organic Process Research and Development**, v. 6, n. 4, p. 509–519, 2002.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 42, p. 6262–6276, 2013.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para

imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CHAGAS, C. M. A. et al. Dextranucrase production using cashew apple juice as substrate: Effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 3, p. 207–215, 2007.

COELHO, R. M. D. et al. Powder lemon juice containing oligosaccharides obtained by dextranucrase acceptor reaction synthesis and dehydrated in sprouted bed. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5961–5967, 2015.

CURRALERO, I. C. B. **Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção de ferro-dextrana**. 1993. 172f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

DAUM, B.; BUCHHOLZ, K. High yield and high selectivity of reactions in the frozen state - The acceptor reaction of dextranucrase. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, n. 1, p. 15–21, 2002.

DELZENNE, N. M. et al. Non-digestible oligosaccharides. **Novel Food Ingredients for Weight Control**, n. December 2014, p. 153–173, 2007.

DEMUTH, K.; JÖRDENING, H. J.; BUCHHOLZ, K. Oligosaccharide synthesis by dextranucrase: New unconventional acceptors. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 20, p. 1811–1820, 2002.

DOU, J. et al. Effects of chitosan oligosaccharides on neutrophils from glycogen-induced peritonitis mice model. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 119–124, 5 jan. 2009.

EGGLESTON, G. et al. Overcoming practical problems of enzyme applications in industrial processes: Dextranases in the sugar industry. **ACS Symposium Series**, v. 972, p. 73–87, 2007.

ERHARDT, F. A. et al. Co-immobilization of dextranucrase and dextranase for the facilitated synthesis of isomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 673–683, 1 jul. 2008.

ERHARDT, F. A.; JÖRDENING, H. J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 4, p. 440–447, 2007.

FALCONER, D. J.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranucrase, the sucrose concentration, and the temperature. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 2, p. 280–284, 2011.

FLAMM, G. et al. Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353–362, set. 2001.

FONTES, C. P. M. L. et al. Development of low caloric prebiotic fruit juices by dextranucrase acceptor reaction. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 7272–7280, 2015.

FUNAME, K.; OOKURA, T.; KOBAYASHI, M. Glucan Binding Regions of Dextranucrase

from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 123–127, 1998.

GAN, W. et al. Biosynthesis of oligodextrans with different Mw by synergistic catalysis of dextranucrase and dextranase. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 387–395, 2014.

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

GODOY, C. A. et al. Glyoxyl-Disulfide Agarose: A Tailor-Made Support for Site-Directed Rigidification of Proteins. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1800–1809, 2011.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.; CABANELAS, J. C.; BASELGA, J. Applications of FTIR on Epoxy Resins - Identification, Monitoring the Curing Process, Phase Separation and Water Uptake. **University Carlos III of Madrid**, v. 2, p. 261–284, 2012.

GOULAS, A. K. et al. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranucrase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 327–338, 2004.

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

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

HAN, J. et al. Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 556–562, 2014.

HASHEM. Immobilization of *Leuconostoc-paramesenteroides* Dextranucrase Enzyme and Characterization of its Enzyme Properties. **Journal of Basic and Applied Sciences**, p. 344–352, 2012.

HEHEMANN, J.-H.; BORASTON, A. B.; CZJZEK, M. A sweet new wave: structures and mechanisms of enzymes that digest polysaccharides from marine algae. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 28, p. 77–86, out. 2014.

HILL, A.; KARBOUNE, S.; MATEO, C. Immobilization and stabilization of levansucrase biocatalyst of high interest for the production of fructooligosaccharides and levan. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 9, p. 2440–2448, 2016.

HODONICZKY, J.; MORRIS, C. A.; RAE, A. L. Oral and intestinal digestion of oligosaccharides as potential sweeteners: A systematic evaluation. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1951–1958, 2012.

HONORATO, T. L. et al. Production of lactic acid and dextran using cashew apple juice as a substrate. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 2, p. 254–258, 2007.

HU, K. et al. New oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of the polysaccharides from *Nerium indicum* Mill and their anti-angiogenesis activities. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 2, p. 198–203, 2009.

IZRAEL ŽIVKOVIĆ, L. T. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 73–83, 2015.

JOHANSSON, S. et al. Oligosaccharide Synthesis in Fruit Juice Concentrates Using a Glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 201–209, 2016.

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

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

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 306–325, 1 jun. 2005.

KIM, D.; ROBYT, J. F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 12, p. 1010–1015, 1994.

KNEŽEVIC-JUGOVIC, Z. D. et al. **Enzyme Stabilization and Immobilization**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 679

KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. **Carbohydrate Research**, v. 66, n. 1, p. 277–288, out. 1978.

KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Electrophoretic Analysis of the Multiple Forms of Dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. **The Journal of Biochemistry**, v. 100, p. 615–621, 1986.

KOEPSELL, H. J. et al. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 200, n. 2, p. 793–801, 1953.

KUBIK, C.; SIKORA, B.; BIELECKI, S. Immobilization of dextranase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 6, p. 555–560, 2004.

LEE, J. H. et al. Biochemical characterization of dextranase from *Arthrobacter oxydans* and its cloning and expression in *Escherichia coli*. **Food Science and Biotechnology**, 2010.

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

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

MAROTTA, M. et al. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 101–108, 2002.

- MATEO, C. et al. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 2010.
- MERYAM SARDAR, R. A. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 2, 2015.
- MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126–135, 2012.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Activation and inhibition of dextranase by calcium. **BBA - General Subjects**, v. 880, n. 1, p. 32–39, 1986.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MIZUTANI, N. et al. Constitutive mutants for dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 248–251, Jan. 1994.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.
- NAESSENS, M. et al. *Leuconostoc* dextranase and dextran: Production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 8, p. 845–860, 1 Aug. 2005.
- NEELY, W. B. Studies on the enzyme dextranase. II. The role of raffinose as an acceptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 79, p. 154–161, 1959.
- NEELY, W. B.; NOTT, J. Dextranase, an Induced Enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochemistry**, v. 1, n. 6, p. 1136–1140, 1962.
- NGUYEN, T. T. H. et al. Production of a low calorie mandarin juice by enzymatic conversion of constituent sugars to oligosaccharides and prevention of insoluble glucan formation. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 3, p. 711–716, 2015.
- ÖLÇER, Z.; TANRISEVEN, A. Co-immobilization of dextranase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1645–1651, 2010.
- OVSEJEVI, K. et al. Enzyme reduction on solid phase as a tool for the reversible immobilization of yeast β -galactosidase onto a thiol-reactive support. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 203–209, 2004.
- PARK, E. Y.; JANG, S. B.; LIM, S. T. Effect of fructo-oligosaccharide and isomaltoligosaccharide addition on baking quality of frozen dough. **Food Chemistry**, v. 213, p. 157–162, 2016.

PARK, K.-H.; ROBYT, J. F.; CHOI, Y.-D. Enzymes for carbohydrate engineering. **Elsevier Science**, v. 12, p. 23-41, 1996.

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

PARLAK, M.; USTEK, D.; TANRISEVEN, A. Designing of a novel dextranucrase efficient in acceptor reactions. **Carbohydrate Research**, v. 386, n. 1, p. 41–47, 2014.

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

PATEL, S.; KOTHARI, D.; GOYA, A. Purification and characterization of an extracellular dextranucrase from *Pediococcus Pentosaceus* isolated from the soil of North East India. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 297–303, 2011.

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

PLOU, F. J. et al. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. **Can. J. Chem**, v. 80, n. 14, p. 743–752, 2002.

PORATH, J.; AXÉN, R. Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose, and Sephadex Support. **Methods in Enzymology**, v. 44, n. C, p. 19–45, 1976.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435–441, 2009.

RABELO, M. C. et al. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 31–40, 2006.

RABELO, M. C. **Síntese enzimática e separação cromatográfica de isomalto-oligossacarídeos de cadeia longa**. 2012. 89f. Tese. (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RABELO, S. N. et al. FTIR Analysis for Quantification of Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel Produced by Microwave-Assisted Transesterification. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 6, n. 12, p. 964–969, 2015.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42–46, 2015.

REISCHWITZ, A.; REH, K. D.; BUCHHOLZ, K. Unconventional immobilization of dextranucrase with alginate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 5, p. 457–461, 1995.

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

ROBYT, F.; KIMBLE, K. Direction of Dextranucrase of Dextran. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 165, p. 634–640, 1974.

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

ROBYT, J. F.; YOON, S.-H. H.; MUKERJEA, R. Dextranucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 18, p. 3039–3048, 2008.

RODRIGUES FILHO, M. G. et al. Quantificação de dextranas em açúcares e cachaças. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1115–1118, 2007.

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

SAMIEY, B.; ASHOORI, F. Adsorptive removal of methylene blue by agar: effects of NaCl and ethanol. **Chemistry Central journal**, v. 6, p. 14, 2012.

SANTOS, M.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, A. Production of dextranucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 177–188, 2000.

SEGURA, A. G. et al. Immobilization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 5, p. 1414–1420, 2004.

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

SHAARANI, S. M. et al. Silanized maghemite for cross-linked enzyme aggregates of recombinant xylanase from *Trichoderma reesei*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 65–76, 2016.

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

SILVA, I. M.; RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. Cashew juice containing prebiotic oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2078–2084, 2014.

SU, D. L.; ROBYT, J. F. Determination of the Number of Sucrose and Acceptor Binding Sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM Dextranucrase, and the Confirmation of the Two-Site Mechanism for Dextran Synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 2, p. 471–476, 1994.

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

TINGIRIKARI, J. M. R.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S. Efficient Production of Prebiotic

Gluko-oligosaccharides in Orange Juice Using Immobilized and Co-immobilized Dextranase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–17, 2017.

TRYTEK, M. et al. An efficient method for the immobilization of inulinase using new types of polymers containing epoxy groups. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 985–996, 2015.

VANDAMME, E. J.; SOETAERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 163–186, 1995.

VERGARA, C. M. DE A. C. **Obtenção de oligossacarídeos prebióticos por processo fermentativo a partir do suco de caju clarificado**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

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

VETTORI, M. H. P. B.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Comparative study of the efficacies of nine assay methods for the dextranase synthesis of dextran. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 9, p. 1077–1082, 2011.

VIEIRA, M. F. et al. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1–2, p. 47–53, 2011.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Kinetics and thermodynamic of the purified dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 122, p. 80–86, 2015.

WANG, A. et al. An efficient immobilizing technique of penicillin acylase with combining mesocellular silica foams support and p-benzoquinone cross linker. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 509–517, 2008.

WANG, S. et al. Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 35–40, 2013.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 8–12, 2009.

ZHAO, C. et al. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 135–145, 2017.

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