



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

TICIANE CAVALCANTE DE SOUZA

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE L-
ARABINOSE ISOMERASE (L-AI) POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM
ESCHERICHIA COLI BL21 (DE3) ATRAVÉS DO MÉTODO DE AUTOINDUÇÃO**

**FORTALEZA
2020**

TICIANE CAVALCANTE DE SOUZA

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE L-ARABINOSE
ISOMERASE (L-AI) POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *ESCHERICHIA COLI* BL21
(DE3) ATRAVÉS DO MÉTODO DE AUTOINDUÇÃO

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa

FORTALEZA

2020

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)

- S236e Souza, Ticiane Cavalcante de.
Estratégias para obtenção da enzima recombinante L-arabinose isomerase (L-AI) por expressão heteróloga em Escherichia coli BL21 (DE3) através do método de autoindução / Ticiane Cavalcante de Souza. – 2020.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa .
1. L-arabinose isomerase. 2. D-tagatose. 3. Autoindução. 4. Lactose. 5. Soro de leite. I. Título.
CDD 660.6
-

TICIANE CAVALCANTE DE SOUZA

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE L-ARABINOSE ISOMERASE (L-AI) POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) ATRAVÉS DO MÉTODO DE AUTOINDUÇÃO

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Coorientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa

Aprovada em: 06.11.2020

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Martín Manzo
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)

Dedico esta tese a Deus e a Nossa Senhora, por terem me concedido força e perseverança em todo o processo, e a minha família, por toda dedicação, incentivo e cuidado.

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar sem mencionar Deus e Nossa Senhora. Eles são minha força, esperança, perseverança e fé. É a sensação de que, no final, tudo irá se concretizar, e que caminhos difíceis nos reservam boas recompensas.

GRATIDÃO a minha família, pelo qual sou apaixonada. Obrigada pela confiança, apoio, dedicação e amor. Pela presença, esforço e força. Obrigada por acreditarem e caminharem comigo. Não há palavras que mensure o sentimento que tenho por essas três mulheres (mãe, irmã e avó).

A minha amiga Geo, pelo apoio imensurável no momento mais difícil e pelas grandes risadas compartilhadas.

Aos amigos Matheus, Felipe, Ítalo, Erivan, May, Dih, Elaine, Lud, Naiara, Claudinha, Luri e Nara. Obrigada pelas risadas, que tornaram os dias mais leves e divertidos. Obrigada também pelas palavras de sabedoria. Nossas conversas, mesmo que em momentos de alegria, sempre me levaram a reflexão, fortalecendo situações.

Aos amigos que fiz no Crossfit, Rebeca, Karen, Vanda e Felipe. Vocês são exemplos de força, determinação e perseverança. Obrigada pelas manhãs de Cross, pelos desafios impostos e concretizados. Como é maravilhosa a sensação de reafirmarmos que sempre podemos mais, e que, se trabalharmos a mente, o corpo reage.

As amigas Camis e Mary, pela torcida.

A Joucy, por todo o apoio, não só nas análises, mas no dia a dia.

A toda família GPBIO, que faço parte desde 2010. OBRIGADA... por todos os momentos de descontração, pela união e companheirismo. Eu creio que não existe laboratório mais unido que o nosso :)

Em especial, muito obrigada aos amigos Ed, Juh, Reh, Lay, Ravens, Carlinha e Paulinha. Por todo o apoio, AMIZADE, pelos cafés na copa, pela companhia no laboratório, sem hora para sairmos.

Guilherme, Lorena e Davi, obrigada pelo início dessa caminhada, que foi tão rica. Obrigada pela força, união e presença.

A família Lembiotech, OBRIGADA. Fiquei encantada com a união, dedicação, compromisso e profissionalismo de vocês. Sempre dispostos a ajudar. Me senti parte da família. Em especial, agradeço ao Saulo e ao Jonathan, pela amizade, pelos momentos de descontração, por compartilhar suas experiências e por toda disposição em ajudar, caso necessário.

Cris Rabelo, você foi um anjo. Esteve comigo nos dias mais “pesados”, quando a carga horária no laboratório era mais extensa. Madrugou, dia e noite, sempre sorrindo, sempre perguntando como iam as coisas, sempre me ajudando a fazer dar certo. MUITO, MUITO OBRIGADA.

Professora Luciana, MUITO OBRIGADA. A senhora que é nosso exemplo diário, me deu a oportunidade de estar no laboratório e isso definiu quem em sou hoje, não apenas como profissional, mas como pessoa também. Sou grata pela oportunidade, pela amizade, dedicação, orientação, confiança, paciência e por acreditar que daria certo. Muito obrigada pela compreensão em cada etapa que percorremos até o momento, mesmo com as dificuldades.

Professora Denise, meu MUITO OBRIGADA. A senhora me recebeu de braços abertos. Me senti privilegiada. Me acolheu e ensinou com muito zelo. Uma orientadora maravilhosa. Obrigada por acreditar no nosso estudo, pela confiança e pela companhia na bancada do laboratório. Foi incrível aprender com você.

A professora Vânia, por permitir que parte dos experimentos fossem realizados em seu laboratório, por toda atenção, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

A professora Valderez, pelo incentivo e disponibilidade, sempre.

A Universidade Federal do Ceará e a Rede Nordeste de Biotecnologia, por possibilitar a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos.

Isaac Newton

RESUMO

A busca constante por mudanças nos hábitos alimentares levou à geração de produtos que agregam benefícios à saúde de quem os consome, apresentando vantagens de caráter fisiológico quando relacionados aos produtos disponíveis no mercado. Dentre esses produtos, a D-tagatose surge como um promissor substituto da sacarose, apresentando 90% de doçura e baixo valor calórico ($1,5 \text{ kcal. g}^{-1}$), quando comparada ao açúcar comum ($4,0 \text{ kcal. g}^{-1}$). Esse edulcorante é pouco absorvido pelo organismo, não eleva as taxas de açúcar no sangue, apresenta propriedades prebióticas, antioxidantes e antidiabéticas. Uma das formas de obtenção da D-tagatose é através da isomerização da D-galactose, catalisada pela enzima L-arabinose isomerase (L-AI). Esse estudo avalia as diferentes estratégias para a obtenção da enzima recombinante L-AI de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em *E. coli*, visando a substituição do método de indução, com emprego de $0,5\text{mM}$ de Isopropil β -1-D-tiogalactopiranósídeo (IPTG) pelo método de autoindução, voltando-se para possibilitar sua disponibilidade à nível comercial. Para o processo de obtenção da proteína recombinante, foram empregados glicose e glicerol, como fontes de carbono, lactose (comercial) e lactose proveniente de soro de leite, como agentes de indução, nas concentrações de 2 e 4g.L^{-1} . O soro de leite é considerado um subproduto da indústria de laticínios e tem se destacado como uma promissora matéria-prima aplicada em processos biotecnológicos. Os cultivos pelo método de autoindução, além de serem considerados de baixo custo, não apresentam citotoxicidade e não é necessário monitoramento do processo para adição da lactose, uma vez que as bactérias realizam a seleção das fontes de carbono e do indutor, disponíveis no meio. Os extratos de L-AI alcançaram atividades catalíticas de $1,67 \pm 0,14 \text{ U. mL}^{-1}$ e $0,7 \pm 0,04 \text{ U. mL}^{-1}$, quando produzidos com uso da lactose comercial e IPTG, respectivamente. Os extratos induzidos com a lactose derivada do soro de leite apresentaram atividade catalítica de $3,8 \text{ U. mL}^{-1}$. Avaliando o aumento de escala, a expressão da enzima com uso da lactose comercial, em biorreator, a 300 rpm , com volume útil de 3L e fluxo de transferência de oxigênio de $0,6 \text{ L.min}^{-1}$, apresentou sua máxima atividade enzimática com 8h de cultivo ($2,7 \pm 0,01 \text{ U.mL}^{-1}$). A L-AI exibiu as melhores atividades catalíticas a 50°C , pH $5,6$ e maior bioconversão da reação de isomerização da D-galactose em D-tagatose, quando a reação ocorreu com uso de 500 mM de D-galactose, atingindo uma concentração de $97,7 \text{ mM}$ e rendimento de 20% , após 28h . Assim, este estudo apresentou protocolos promissores e inovadores para a expressão efetiva da proteína recombinante, através

dos métodos de autoindução, com emprego da lactose comercial e lactose procedente do soro de leite.

Palavras-chave: L-arabinose isomerase. D-tagatose. Autoindução. Lactose. Soro de leite.

ABSTRACT

The constant changes in eating habits led to the generation of products that add health benefits to those who consume them, as improvements of a physiological nature when related to the products available on the market. Among these products, D-tagatose appears as a promising substitute for sucrose, presenting 90% sweetness and low caloric value (1.5 kcal. g^{-1}), when compared to common sugar (4.0 kcal. g^{-1}). This sweetener is poorly absorbed by the body, does not raise blood sugar levels, and has prebiotic, antioxidant and anti-diabetic properties. One of the ways to obtain D-tagatose is through the isomerization of D-galactose catalyzed by the enzyme L-arabinose isomerase (L-AI). This study evaluates different strategies for obtaining the recombinant enzyme L-AI from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 in *E. coli* aiming to replace the induction method, which uses 0.5 mM of Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) by the auto-induction method, aspiring to enable its availability at commercial level. For the process of obtaining the recombinant protein, glucose and glycerol were used as carbon sources, lactose (commercial) and lactose from whey as induction agents at concentrations of 2 and 4 g.L^{-1} . Whey is considered a by-product of dairy industry and has stood out as a promising raw material applied in biotechnological processes. Cultivations by the auto-induction method are considered low cost, do not present cytotoxicity and since the bacteria select the sources of carbon and the inducer available in the medium, there is no need to monitor the process for adding lactose. The L-AI extracts achieved catalytic activities of $1.67 \pm 0.14 \text{ U. mL}^{-1}$ and $0.7 \pm 0.04 \text{ U. mL}^{-1}$, when produced using commercial lactose and IPTG, respectively. The extracts induced with lactose derived from whey showed catalytic activity of 3.8 U. mL^{-1} . Evaluating the scale increase, the expression of the enzyme using commercial lactose in a bioreactor at 300 rpm with a useful volume of 3L and an oxygen transfer flow of 0.6 L.min^{-1} , showed its maximum enzymatic activity with 8h of culture ($2.7 \pm 0.01 \text{ U.mL}^{-1}$). L-AI exhibited the best catalytic activities at 50°C , pH 5.6 and greater bioconversion of D-galactose isomerization reaction to D-tagatose when reaction occurred using 500 mM D-galactose reaching a concentration of 97.7 mM and 20% yield, after 28h. Thus, this study presented promising and innovative protocols for the effective expression of recombinant protein through auto-induction methods using commercial lactose and lactose from whey.

Keywords: L-arabinose isomerase. D-tagatose. Auto-induction. Lactose. Whey.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Estrutura química da D-tagatose e D-frutose.....	27
Figura 2-	Métodos de obtenção para a D-tagatose.....	28
Figura 3-	Reações de isomerização catalisadas pela enzima L-arabinose isomerase. Reação entre L-arabinose em L-ribulose (<i>in vivo</i>) e D-galactose em D-tagatose (<i>in vitro</i>)	31
Figura 4-	Estratégias de funcionamento do <i>operon lac</i> . Em A . na ausência do indutor (IPTG) e em B ., mecanismo desenvolvido na presença do indutor (IPTG), permitindo a expressão da proteína de interesse.....	37
Figura 5-	Sistemas de expressão pelo método de autoindução com uso da lactose comercial como indutor de proteínas heterólogas. Mecanismo referente ao metabolismo das fontes de carbono e do indutor, no <i>operon lac</i>	39
Figura 6-	Fluxograma das fases de produção e caracterização da enzima L-AI.....	45
Figura 7-	Mapa do vetor pET302 / NT-His (+) utilizado para a construção da L-AI.....	46
Figura 8-	Perfil eletroforético dos precipitados celulares (<i>pellets</i>) obtidos após expressão da L-AI de <i>E. faecium</i> em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), durante 24h. A proteína recombinante está indicada por uma seta.....	58
Figura 9-	Cinética de crescimento da L-arabinose isomerase com uso do meio de autoindução.....	59
Figura 10-	Expressão da L-AI pelo método de autoindução. Frações dos precipitados gerados durante o cultivo, fração da enzima solúvel e fração do <i>pellet</i> (pós rompimento). ES: Extrato solúvel (pós lise); P: <i>Pellet</i> (pós rompimento)	60
Figura 11-	SDS-PAGE das frações referente a purificação dos extratos enzimáticos produzidos por autoindução. 1. Marcador de massa molecular. 2. Pico não retido. 3. Lavagem. 4. Enzima purificada.....	64
Figura 12-	SDS- PAGE das frações referentes a purificação dos extratos enzimáticos produzidos com adição de IPTG. 1. Padrões de massa molecular. 2. Pico não retido 3. Lavagem 01 4. Lavagem 02 5. Enzima purificada.....	65

Figura 13-	Perfil do consumo de (■) glicose, (●) glicerol e (▲) lactose analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	67
Figura 14-	Cinética de crescimento da proteína recombinante L-arabinose isomerase em biorreator. Delineamento equivalente aos dados coletados em relação à concentração de células geradas (■) e ao número de células viáveis (■), durante 12h.....	69
Figura 15-	Demandas de oxigênio dissolvido durante a produção da L-arabinose isomerase.....	70
Figura 16-	Produção da L-AI por <i>E. coli</i> em biorreator de bancada.....	71
Figura 17-	Purificação dos extratos de L-AI a partir de Cromatografia de Afinidade. A. 1. Marcador de massa molecular 2. Extrato enzimático com 8h cultivo 3. Pico não retido na coluna (8h) 4. Etapa de Lavagem (8h) 5. Enzima purificada (8h) 6. Extrato enzimático com 10h de cultivo 7. Pico não retido na coluna (10h) 8. Etapa de lavagem (10h) 9. Enzima purificada (10h) B. 1. Marcador de massa molecular 2. Extrato enzimático com 12h de cultivo 3. Pico não retido na coluna (12h) 4. Etapa de lavagem (12h) 5. Enzima purificada com 12h de cultivo.....	73
Figura 18-	Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor, disponíveis para a produção de L-arabinose isomerase em biorreator de bancada. A glicose, o glicerol e a lactose estão representadas, respectivamente por (■), (●) e (▲).....	75
Figura 19-	Perfil de crescimento celular da cepa BL21(DE3) em diferentes concentrações de indutor para expressão da proteína L-arabinose isomerase. (■) 2g.L ⁻¹ , (●) 4 g.L ⁻¹ e (▲) 8 g.L ⁻¹ de lactose.....	78
Figura 20-	Perfis de expressão da L-arabinose isomerase produzidos pelo método de autoindução usando lactose derivada do soro de leite. A, B e C correspondem às concentrações de 2, 4 e 8g.L ⁻¹ de lactose, respectivamente.....	79
Figura 21-	Perfil de crescimento das células para expressão da enzima L-AI em meio de autoindução com soro de leite com concentração de lactose equivalente a 4g.L ⁻¹	81

Figura 22-	Eletroforese em gel de Tricina das amostras coletadas durante a purificação dos extratos de L-AI (11h). 1. Marcador de massa molecular 2. Pico não retido na coluna 3. Solução de lavagem 4. Pós eluição 5. Solução de limpeza (500mM imidazol) 6. Enzima purificada.....	82
Figura 23-	Consumo de glicose, glicerol e lactose em relação ao tempo de cultivo para a expressão de L-arabinose isomerase. A glicose, o glicerol e a lactose estão representadas, respectivamente por (■), (●) e (▲)	85
Figura 24-	Efeito do pH na atividade catalítica dos extratos de L-AI produzidos pelo método de autoindução. Ensaio realizado nas condições padrão (50°C, 60 minutos)	87
Figura 25-	Efeito da temperatura na atividade catalítica dos extratos de L-AI produzidos pelo método de autoindução.....	88
Figura 26-	Concentração de D-tagatose produzida em relação ao tempo de reação usando (●) 500 mM de D-galactose e (■) 164 mM de D-galactose.....	89
Figura 27-	Disposição dos componentes dos meios de cultivo em relação aos custos de cada constituinte. A. Meio de indução (IPTG); B. Método de autoindução com lactose C. Método de autoindução com lactose derivada do soro de leite.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Propriedades da D-tagatose.....	30
Tabela 2-	Características bioquímicas das L-AIs de diferentes fontes produtoras.....	33
Tabela 3-	Processos biotecnológicos onde o soro de leite foi utilizado como matéria-prima.....	41
Tabela 4-	Composição do meio de autoindução ZYM-5052, pH 7,0 (STUDIER, 2005). Meio esterilizado por calor úmido (autoclave) a 121 °C por 15min.	49
Tabela 5-	Componentes das formulações dos meios de cultivo, indução ou autoindução, com os respectivos valores de mercado.....	56
Tabela 6-	Área das frações de L-arabinose isomerase e percentual calculados em relação à produção com uso do meio de autoindução.....	58
Tabela 7-	Produção enzimática da L-arabinose isomerase em diferentes métodos.....	61
Tabela 8-	Frações resultantes das etapas de purificação da enzima solúvel (L-AI). Os extratos enzimáticos foram obtidos pelos métodos de indução (IPTG) e autoindução (lactose). A enzima encontrava-se em solução tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0 suplementada com 150 mM de NaCl.....	63
Tabela 9-	Área das frações de L-arabinose isomerase e percentual correspondentes à produção com uso do meio de autoindução em biorreator.....	72
Tabela 10-	Atividade dos extratos lisados de L-arabinose isomerase produzidos por <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em biorreator.....	73
Tabela 11-	Análise das frações coletadas durante a purificação dos extratos de L-arabinose isomerase. As frações correspondem as amostras analisadas nos tempos de 8, 10 e 12h.....	74
Tabela 12-	Áreas correspondentes as bandas de L-AI e percentual relativo à produção da proteína, nas concentrações de 2, 4 e 8g.L ⁻¹ de lactose (soro), avaliadas com o emprego do software ImageJ.....	80
Tabela 13-	Caracterização dos extratos produzidos com uso do meio ZYM- 5052, suplementados com soro de leite na concentração de 4g.L ⁻¹ de lactose, com 11h de ensaio.....	81

Tabela 14-	Análise das etapas de purificação dos extratos de L-AI obtidos por cultivos, usando lactose derivada do soro de leite como indutor no <i>operon lac</i>	83
Tabela 15-	Áreas das frações de L-AI identificadas nas etapas de purificação usando soro de leite como agente de indução.....	84
Tabela 16-	Análise dos custos de produção da enzima L-AI. Os custos dos componentes dos meios de cultivo (CMM) foram expressos em centavos de dólar por litro de cultivo e o custo da produção (Cp) em centavos de dólar por unidade de enzima produzida.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Autoindução
Amp	Ampicilina
Ativ (U.mL ⁻¹)	Atividade enzimática
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D	Diluição
D.O	Densidade ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
FDA	US Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LB _{amp}	Meio de cultura Luria Bertani suplementado com 100µL.mL ⁻¹ de ampicilina
L-AI	L- arabinose isomerase
LSLt	Etiqueta de fusão a partir do módulo lectina N-terminal de LSLa
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
[TAG]	Concentração de tagatose obtida na curva
t	Tempo (min)
T	Temperatura (°C)
Ve	Volume da solução de enzima (µL)
Vr	Volume reacional (µL)
ZYM- 5052	Meio de autoindução

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Geral.....	25
2.2	Específicos.....	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	Produção de açúcares raros: D-tagatose.....	26
3.2	Química Sustentável	30
3.3	L-arabinose isomerase (L-AI)	31
3.4	L-arabinose isomerase de <i>Enterococcus faecium</i> DBFIQ E36	34
3.5	Produção de enzimas recombinantes: condições para obtenção.....	35
3.6	Sistemas de Expressão para a obtenção da L-arabinose isomerase.....	36
3.6.1	<i>Expressão da enzima L-arabinose isomerase pelo método de indução.....</i>	36
3.6.2	<i>Expressão da L-AI pelo método de autoindução.....</i>	38
3.6.3	<i>Soro de leite: um importante substrato para a expressão de proteínas pelo método de autoindução.....</i>	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Materiais.....	43
4.1.1	<i>Expressão da L-arabinose isomerase.....</i>	43
4.1.2	<i>Microrganismo.....</i>	43
4.1.3	<i>Reagentes empregados nos ensaios de atividade enzimática.....</i>	44
4.1.4	<i>Reagentes empregados nos ensaios de eletroforese (SDS-PAGE Tricina).....</i>	44
4.2	Métodos.....	44
4.2.1	<i>Fluxograma para a obtenção, caracterização e aplicação da L-AI.....</i>	45
4.2.2	<i>A L-AI de <i>Enterococcus faecium</i> em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)</i>	46

4.2.2.1	<i>Clonagem.....</i>	46
4.2.2.2	<i>Conservação da cultura e Preparo do Pré – inóculo.....</i>	46
4.2.2.3	<i>Extratos Enzimáticos de L-AI.....</i>	47
4.2.3	<i>Estratégias para a expressão da recombinante de Enterococcus faecium em E. coli BL21 (DE3)</i>	47
4.2.3.1	<i>Etapa inicial para a expressão proteína recombinante L-AI.....</i>	47
4.2.3.2	<i>Expressão da enzima por indução com IPTG.....</i>	48
4.2.3.3	<i>Produção da proteína recombinante L-AI por autoindução (AI).....</i>	48
4.2.3.4	<i>Produção da proteína recombinante L-AI por autoindução suplementada com soro de leite pré-tratado.....</i>	49
4.2.3.5	<i>Determinação do tempo de cultivo para expressão.....</i>	50
4.2.3.6	<i>Contagem de Células Viáveis.....</i>	50
4.2.3.7	<i>Extração da proteína L-AI.....</i>	51
4.2.4	<i>Ensaio de Atividade Enzimática.....</i>	51
4.2.5	<i>Quantificação de Proteínas.....</i>	52
4.2.6	<i>Determinação da Massa Molar (SDS-PAGE)</i>	52
4.2.7	<i>Estudos Preliminares de Purificação dos Extratos Enzimáticos</i>	53
4.2.8	<i>Quantificação das fontes de carbono.....</i>	54
4.2.9	<i>Caracterização do extrato enzimático de L-AI</i>	54
4.2.9.1	<i>Efeito do pH no ensaio de Atividade Enzimática da L-AI</i>	54
4.2.9.2	<i>Efeito da Temperatura no ensaio de Atividade Enzimática da L-AI</i>	54
4.2.10	<i>Estudo da Bioconversão de D-tagatose usando a enzima purificada L-AI</i>	55
4.2.11	<i>Análise do custo do meio de produção para a obtenção da L-AI</i>	55
5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	57
5.1	<i>Expressão, Purificação da recombinante L-AI e Quantificação das fontes de energia e indutor</i>	57

5.1.1	<i>Expressão da proteína L-AI e estudo do tempo de cultivo</i>	57
5.1.2	<i>Purificação dos extratos celulares</i>	62
5.1.3	<i>Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor nas etapas de expressão celular</i>	65
5.2	Produção da enzima em reator de bancada	69
5.2.1	<i>Expressão, Purificação e Quantificação dos extratos de L-AI, alcançados pelo método de autoindução em biorreator de bancada</i>	69
5.3	Avaliação do emprego de soro de leite para expressão da recombinante L-AI por autoindução em frascos agitados	76
5.3.1	<i>Estudo da concentração de lactose do soro do leite para a expressão de L-AI recombinante em frascos agitados</i>	77
5.3.2	<i>Expressão da L-AI por autoindução com soro de leite contendo 4g.L⁻¹ de lactose.....</i>	80
5.3.3	<i>Purificação dos extratos de L-arabinose isomerase obtidos com uso do soro de leite como agente de indução</i>	82
5.3.4	<i>Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor (lactose presente no soro de leite) nas etapas de expressão celular</i>	84
5.4	Caracterização da enzima L-AI purificada	86
5.4.1	<i>Efeito do pH na atividade catalítica</i>	86
5.4.2	<i>Efeito da temperatura (°C) na atividade catalítica</i>	88
5.5	Conversão da D-galactose em D-tagatose por L-arabinose isomerase (L-AI).....	89
5.6	Análise do custo de produção em relação às estratégias de cultivo avaliadas.....	90
6	CONCLUSÃO	93
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
	REFERÊNCIAS	95

ANEXO A- TRABALHOS APRESENTADOS EM ANAIS DE CONGRESSO.....	106
ANEXO B- DEPÓSITO DE PATENTE.....	107
ANEXO C- ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM PEROÓDICO.....	108

1 INTRODUÇÃO

A busca por hábitos alimentares mais saudáveis levou à geração de produtos que pudessem agregar benefícios à saúde de quem os consome, impulsionando o crescimento do mercado nutracêutico. Os nutracêuticos são definidos como compostos bioativos que apresentam múltiplas vantagens medicinais ou fisiológicas, corroborando com a prevenção e o tratamento de doenças (PANDEY, VERMA e A SARAF, 2010; ROY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016). Dentre os produtos classificados como nutracêuticos, destaca-se a D-tagatose, uma cetohexose natural, considerada “rara” devido a sua limitação na natureza, sendo ainda reconhecida como um alimento GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (US Food and Drug Administration) (LEVIN, 2002; ROY *et al.*, 2018).

Esse edulcorante é considerado um excelente substituto da sacarose nos alimentos, por trazer benefícios como: alto poder de doçura, não apresentar gostos residuais, exibir baixo teor calórico ($1,5 \text{ kcal.g}^{-1}$), podendo, portanto, ser utilizado por pacientes em tratamento contra a obesidade (LU, LEVIN e DONNER, 2008), além de ser pouco absorvido pelo organismo, não elevar as taxas de açúcar no sangue e ser sugerido para pacientes portadores de diabetes do tipo II (DONNER, MAGDER e ZARBALIAN, 2010; ENSOR *et al.*, 2016; LU, LEVIN e DONNER, 2008).

Visando a sua produção em larga escala, uma vez que a sua ocorrência na natureza está restrita a pequenas concentrações, a D-tagatose pode ser obtida através de rotas químicas das reações de isomerização da D-galactose, com uso de catalisadores (hidróxido de cálcio ou uma mistura de hidróxido de sódio e cálcio). Entretanto, esses processos geram uma série de etapas desfavoráveis, como a geração de resíduos e subprodutos que demandam tratamentos específicos para serem descartados, tornando sua obtenção indevida (ROY *et al.*, 2018).

Diante das limitações para a obtenção da D-tagatose a nível industrial, uma alternativa promissora é a utilização de sistemas enzimáticos, que atuam em condições reacionais brandas (pH, temperatura e pressão), apresentam alto nível de eficiência catalítica e especificidade, seja pelo substrato, por moléculas (regioespecificidade) ou ainda, entre isômeros ópticos (estereoespecificidade) (SANTOS, 2015), além de não gerarem subprodutos ou custos adicionais para o tratamento no final do processo. Dessa forma, uma alternativa foi a utilização bioquímica da L-arabinose isomerase (EC 5.3.1.4 - L-AI), uma enzima intracelular, encontrada em microrganismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos, que atua como biocatalisador nas reações de isomerização da D-galactose em D-tagatose, sendo possível a

produção dessa enzima em maior escala, através da sua expressão heteróloga em organismos hospedeiros utilizados industrialmente.

A expressão da enzima L-AI em *Escherichia coli* foi relatada em muitos estudos (MANZO *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2018; HUNG *et al.*, 2014; MEN *et al.*, 2014; RHIMI *et al.*, 2010), através do emprego do indutor IPTG (Isopropil β -1-D-tiogalactopiranosídeo). Este indutor atua impedindo que a proteína repressora (*lac I*) se ligue ao operador, impossibilitando que a RNA polimerase realize a transcrição dos genes no *operon lac*. Assim, quando o IPTG se encontra no meio, há expressão da proteína de interesse, que está sob o controle desse *operon* (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; MARBACH e BETTENBROCK, 2012; STUDIER, 2005). O IPTG é o indutor mais empregado em reações que visam à obtenção de enzimas heterólogas e, apesar de eficiente, ele é caro, pode ser citotóxico (DVORAK *et al.*, 2015; MALAKAR e VENKATESH, 2011), necessitando ser adicionado ao processo apenas na fase exponencial de crescimento celular, promovendo baixos rendimentos da proteína de interesse quando comparado ao método de autoindução.

A expressão de proteínas pelos sistemas de autoindução ocorre também através da regulação do *operon lac*, a partir das fontes de carbono (glicose e glicerol) e de indução (lactose), transportando e metabolizando a lactose na célula. Esse processo é considerado econômico, simples e de elevada produção da proteína, sem a necessidade de monitorar o crescimento celular para adição de indutor, além de não apresentar citotoxicidade (BRIAND *et al.*, 2016, CROWLEY e RAFFERTY, 2019, STUDIER, 2005).

Simulando condições em que a enzima L-AI pudesse ser produzida e aplicada em alta escala, o método de autoindução (AI) foi desenvolvido nesse estudo, utilizando como indutores, além da lactose comercial, a lactose derivada do soro de leite, um subproduto da indústria de laticínios (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018), considerada uma matéria-prima promissora como substrato biotecnológico e que apresenta altas concentrações de lactose (ILLANES, 2011), ideais para a expressão de proteínas recombinantes (VIITANEN *et al.*, 2003). A aplicabilidade desse resíduo foi avaliada como um excelente substituto da lactose comercial e, consequentemente, dos processos de indução com IPTG, para a expressão da enzima L-AI.

Dentro desse cenário, este trabalho teve como objetivo o estudo das condições de obtenção da enzima L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em *Escherichia coli* BL21 (DE3), com emprego de indutores alternativos e de baixo custo, através do processo de autoindução de proteínas.

Inicialmente, o estudo foi voltado para a produção com uso da lactose comercial e, em paralelo, ensaios com emprego do indutor IPTG foram realizados para que se pudesse comparar os processos de produção da proteína recombinante. Em seguida, a lactose comercial foi substituída pela lactose proveniente do soro de leite, com análise das variáveis do processo, como o tempo de expressão e a concentração de indutor.

É interessante mencionar que este foi o primeiro estudo a investigar a produção da L-AI por autoindução, incluindo o uso do soro de leite como indutor alternativo.

Os extratos de L-arabinose isomerase foram, ainda, purificados (Cromatografia de Afinidade), caracterizados (atividade catalítica, concentração de proteínas, perfis eletroforéticos, pH e temperatura (°C) ideais para as atividades enzimática) e aplicados nas reações de bioconversão da D-galactose em D-tagatose.

A tese apresentará, a seguir, a fundamentação teórica relacionada a produção da proteína de interesse, as metodologias elencadas para as diferentes estratégias avaliadas, os resultados e conclusões alcançados com as perspectivas estratégias abordadas. Além disso, como produtos da referida tese, serão destacados, ainda, um pedido de patente junto ao INPI, os estudos expostos em eventos científicos, além de um manuscrito publicado na Molecular Biotechnology.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o uso do meio de autoindução (ZYM-5052), empregando lactose comercial e lactose proveniente de um resíduo agroindustrial (soro de leite) como indutor, para a obtenção de proteínas heterólogas, viabilizando uma condição sustentável, de menor custo e com maiores produções da enzima L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36.

2.2 Específicos

- Substituir o processo de indução, com emprego do IPTG, pelo processo de autoindução, com uso da lactose comercial e lactose derivada do soro de leite;
- Obter a proteína recombinante L-arabinose isomerase (L-AI), através do método de autoindução (ZYM- 5052);
- Determinar a melhor concentração de lactose, presente no soro de leite, para o crescimento e produção da proteína recombinante;
- Quantificar as fontes de carbono e do indutor metabolizados durante o cultivo, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Purificar os extratos enriquecidos de L-AI, por Cromatografia de Afinidade, obtidos nos diferentes métodos de produção;
- Caracterizar a enzima L-AI, quanto à temperatura e pH, em relação à atividade catalítica;
- Aplicar os extratos purificados de L-AI nas reações de isomerização da D-galactose em D-tagatose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este momento da tese é dedicado a uma breve revisão dos assuntos pertinentes às investigações desenvolvidas, a fim de fundamentar os estudos que serão apresentados nos tópicos posteriores. O foco foi a produção da proteína recombinante L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 pelo método de autoindução, utilizando substratos alternativos, visando a obtenção de maiores rendimentos da proteína de interesse, menor custo de processo e o desenvolvimento de um protocolo inédito para a enzima L-AI.

3.1 Produção de açúcares raros: D- tagatose

As mudanças nos hábitos alimentares têm sido progressivas atualmente. A substituição de ingredientes na formulação dos alimentos, medicamentos ou substâncias utilizadas em diversos setores, tem se voltado, cada vez mais, para a promoção de maiores benefícios relacionados à saúde. A busca por alimentos que contenham ingredientes “do bem” está relacionada ao aumento do número de doenças associadas ao consumo de açúcar ou gordura, como a diabetes, obesidade e a hipertensão (ZHANG *et al.*, 2017).

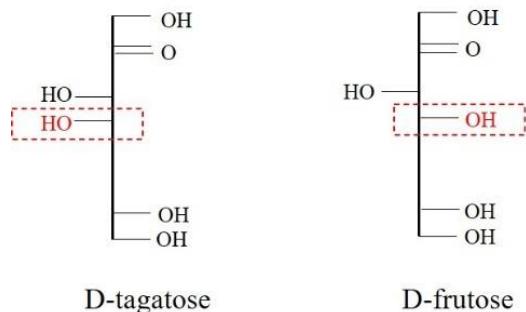
A procura pelo substituto do açúcar de mesa, sacarose, que possua as características de um adoçante considerado ideal, como o alto poder de doçura, não apresentar gosto residual, ou seja, não alterar o sabor dos alimentos, ou ainda, não promover os efeitos negativos associados ao seu consumo, tem sido desafiador para as grandes indústrias. Dos inúmeros açúcares considerados raros, quatro se destacam como potenciais substitutos da sacarose: D-allulose (D-psicose), D-tagatose, D-sorbose e D-alose (MOORADIAN *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços e da disponibilidade de edulcorantes com características sensoriais aceitáveis e que apresentam baixas calorias, nenhum destes chegou a ser considerado promissor, frente à tagatose.

A D-tagatose é um monossacarídeo, epímero da D-frutose com variação na configuração espacial do grupo hidroxila em C-4 (Figura 1). É uma cetohexose natural, apresentando 90% de doçura e baixo valor calórico (1,5 kcal. g⁻¹) (GUERRERO-WYSS, AGÜERO e DÁVILA, 2018; KIM, 2004; MOGHA, CHAUDHARI e APARNATHI, 2016; ROY *et al.*, 2018), quando comparada com a sacarose (4,0 kcal. g⁻¹) (GOMES *et al.*, 2007; MANHANI *et al.*, 2014; SANTOS, 2018), não exibindo gosto residual. Esse edulcorante possui, ainda, efeitos fisiológicos e benefícios medicinais, e foi aprovado como um material

“geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) em produtos alimentícios, incluindo suplementos dietéticos (LEVIN, 2002).

Figura 1- Estrutura química da D-tagatose e D-frutose.



Fonte: Adaptada de Mogha, Chaudhari e Aparnathi, 2016.

Além da palatabilidade, esse edulcorante é considerado multifuncional, por apresentar, dentre os benefícios, potencial antidiabético (DONNER, MAGDER e ZARBALIAN, 2010; ENSOR *et al.*, 2016; LU, LEVIN e DONNER, 2008), antioxidante (ROY *et al.*, 2018), prebiótico (LEVIN, 2002), anti-biofilme e anti-placa (PATRA, TOMAR e ARORA, 2009), além da sua ingestão não elevar o índice glicêmico (GUERRERO-WYSS, AGÜERO e DÁVILA, 2018; PATRA, TOMAR e ARORA, 2009), podendo, ainda, ser utilizado em pacientes em tratamento contra a obesidade (LU, LEVIN e DONNER, 2008).

Sua ocorrência pode se dar, naturalmente, em substâncias presentes em alguns alimentos, como em queijos, leites, iogurtes ou outros produtos lácteos (ROY *et al.*, 2018). Contudo, limita-se a pequenas concentrações (KHUWIJITJARU, MILASING e ADACHI, 2018; KIM, 2004) e, por isso, é considerado um açúcar raro, sendo, portanto, necessária à sua produção em maior escala para possibilitar sua obtenção a nível industrial.

A D-tagatose pode ser obtida através dos processos químicos ou biológicos, e, em ambos, utiliza-se a D-galactose como precursor. A D-galactose pode, ainda, ser derivada da lactose, comercial ou residual, como do soro de leite (Figura 2).

Figura 2- Métodos de obtenção para a D-tagatose.



Fonte: Adaptada de Beadlecos *et al.*, (1992); Kim (2004); Roy *et al.*, (2018).

O processo químico ocorre em duas etapas. No primeiro momento, a lactose, que pode ser do soro de leite, é hidrolisada, resultando na formação de D-galactose e D-glicose. Por um processo de separação, a D-galactose é isolada, purificada e isomerizada pelo uso de um hidróxido de metal, podendo ser de cálcio ou de cálcio e sódio, formando D-tagatose insolúvel. O segundo passo corresponde à neutralização com uso de ácido. A reação entre ácido e D-tagatose gera um sal insolúvel, que no final do processo é separado por filtração (KIM, 2004; ROY *et al.*, 2018). Esse método traz muitas desvantagens, como geração de resíduos e subprodutos, formação de etapas complexas de reação, baixos rendimentos e problemas ambientais.

A produção de D-tagatose por rota biológica é desenvolvida com emprego de biocatalisadores enzimáticos, que atuam em condições moderadas de reação, gerando pouco ou nenhum subproduto no final do processo, sendo ambientalmente amigáveis, além de eficientes, seletivos, demandando menor gasto energético para o processo (GUISAN, 2013; ZHANG *et al.*, 2017).

Izumuri apud Granstrom *et al.* (2003) identificou em seus estudos possíveis estratégias para a obtenção dos açúcares raros, a partir do uso de microrganismos e matérias primas de baixo custo, como o soro de leite, fonte de lactose, para a obtenção da D-tagatose. A produção por via biológica se destaca através das diversas vantagens associadas ao processo. Nessa rota, devido aos avanços relacionados à engenharia genética e enzimática, é possível obter biocatalisadores (enzimas), imobilizados ou não que, quando submetidos às reações de isomerização, colaboram com a obtenção de altas produções de açúcar raro.

A primeira patente destinada a produção de tagatose, a nível comercial, por rota química, foi realizada por Beadle *et al.*, (1992), que partia da hidrólise da lactose, gerando D-galactose e D-glicose. A D-galactose, era então, isolada, isomerizada com uso de hidróxido de cálcio, resultando na produção de tagatose insolúvel. A tagatose insolúvel era desmineralizada, para a remoção das impurezas geradas, seguida de cristalização. Esse processo resultava em sucessivas etapas de reação, formação de subprodutos indesejáveis para o meio ambiente, além dos baixos rendimentos (JØRGENSEN, HANSEN e STOUGAARD, 2004).

A empresa Arla Foods Ingredients (Dinamarca), adquiriu os direitos de produção da tagatose e unindo-se a Spherix (Biospherie Incorporated), iniciou a produção desse edulcorante à nível industrial (JØRGENSEN, HANSEN e STOUGAARD, 2004).

Em 2003, a Arla Foods Ingredients e a Nordzucker, empresa alemã produtora de açúcar, lançaram a Gaio Tagatose. O primeiro produto comercial com tagatose em sua composição foi a Pepsi diet (ARLA FOODS, 2003).

Em 2005, a tagatose é aprovada na União Europeia como um novo ingrediente alimentar. Em 2006, a Sweet Gradients rompe com a produção de tagatose, por rota química, justificando que os altos custos de produção não eram compensadores. Em 2010, empresa sul-coreana, Cj Cheiljedang Corporation, conquista o status GRAS e, em 2012, surgem as primeiras produções comerciais de tagatose, por rota enzimática, através da marca Beksul Tagatose (RAVIKUMAR *et al.*, 2021).

A síntese da tagatose, seja por rota química ou enzimática, foi avaliada à nível comercial, enfrentando dificuldades ainda não superadas, quando se almeja uma produção com altos rendimentos de processo e menor custo.

A Tabela 1 exibe as principais propriedades definidas para a D-tagatose.

Tabela 1- Propriedades da D-tagatose.

Atributos da D-tagatose	Características referentes
Fórmula molecular	C ₆ H ₁₂ O ₆
Classificação	Cetohexose
Forma	Pó branco cristalino
% Doçura (em relação a sacarose)	92 em relação a uma solução de 10% (m/m)
Valor calórico (kcal. g ⁻¹)	1,5
Isômero	D-galactose
T (°C) fusão	134
Reações de escurecimento	Sim, por se tratar de um açúcar redutor
Higroscopicidade	Não
Solubilidade	Em água

Fonte: Adaptado de Ferreira (2019); Mogha *et al.*, 2016.

Diante das inúmeras vantagens associadas ao uso da D-tagatose, e em consequência dos altos custos pertinentes à produção desse edulcorante, além da sua limitação na natureza, estratégias para a produção, a nível industrial, econômico e ambientalmente “amigável”, vêm sendo investigadas. Os estudos são voltados para a produção, por rota biológica, com uso da enzima L-arabinose isomerase (MEN *et al.*, 2014; RHIMI *et al.*, 2011; ROH *et al.*, 2000; RYU *et al.*, 2003), responsável pela isomerização da D-galactose, visando ao alcance de maiores rendimentos de D-tagatose, aspirando sua disponibilidade comercial equiparada a outros açúcares, disponíveis comercialmente.

3.2 Química sustentável

Química sustentável ou química verde surge como uma solução para os problemas decorrentes dos impactos ambientais causados pela geração de resíduos dos diferentes processos, e traz estratégias que visam prevenir possíveis contaminações, provenientes de diversos setores. Essas estratégias estão relacionadas às práticas adequadas dos resíduos ou a uma reavaliação do processo, visando à diminuição, ou até à eliminação, de etapas que possam gerar rejeitos (GOMES, 2018). Dentre os princípios da Química verde, pode-se destacar a relevante preocupação na prevenção ao invés do tratamento dos resíduos, depois de gerados por etapas químicas.

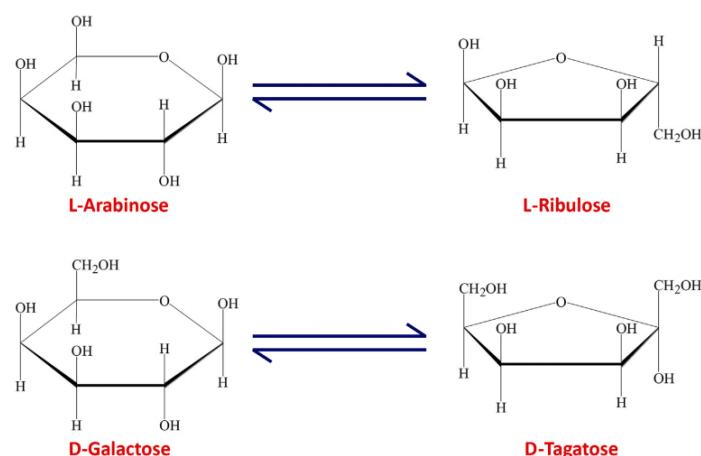
Segundo Vieira (2009), o uso da tecnologia enzimática tem se tornado proveitoso, uma vez que diminui os subprodutos indesejáveis gerados e são necessários pequenos volumes para catalisar reações específicas decorrentes da sua elevada eficiência, além de atuarem em condições reacionais brandas que as diferenciam das reações com o uso de catalisadores químicos. Dessa forma, uma viável substituição no processo ou parte do processo seria o emprego de biocatalisadores aplicados em reações, eliminando as etapas de formação de subprodutos indesejáveis ou tóxicos. A biocatálise é inserida como uma tecnologia promitente para a utilização em processos químicos sustentáveis.

Silva, Lacerda e Jones Junior (2005) apresentaram uma série de vantagens associadas ao uso das enzimas em síntese orgânica, quando confrontadas com as reações químicas convencionais. As enzimas podem promover reações que dificilmente poderiam acontecer pela síntese orgânica convencional, além de serem catalisadores naturais, seguros, seletivas, agregando benefícios aos processos industriais e ambientais.

3.3 L-arabinose isomerase

A L-arabinose isomerase (L-AI, EC 5.3.1.4) é uma enzima intracelular que catalisa a isomerização reversível entre aldoses e cetoses e é responsável pela conversão entre L-arabinose em L-ribulose e D-galactose em D-tagatose, como na Figura 3 (CHEETHAM e WOOTTON, 1993; KIM *et al.*, 2009; ROH *et al.*, 2000), além de ser considerada uma enzima chave nas vias pentoses fosfato (XU *et al.*, 2014).

Figura 3- Reações de isomerização catalisadas pela enzima L-arabinose isomerase. Reação entre L-arabinose em L-ribulose (*in vivo*) e D-galactose em D-tagatose (*in vitro*).



Fonte: Xu *et al.*, 2018.

Por ser responsável pela catálise das reações da produção de açúcares raros, a expressão dessa enzima tem sido cada vez mais investigada, uma vez que não se encontra disponível comercialmente (JAYAMUTHUNAGAI *et al.*, 2017), tornando significativa a produção em condições otimizadas a nível operacional.

As L-AIs podem apresentar características que as diferem entre si, e essas características estão relacionadas às suas origens. Essas propriedades incluem: atividade catalítica, parâmetros cinéticos, temperatura e termoestabilidade, podendo incluir o uso de bactérias psicrotolerantes, mesofílicas, termofílicas e hipertermofílicas, pH e a necessidade de íons metálicos (XU *et al.*, 2014).

Sabendo que o equilíbrio entre a D-galactose e D-tagatose muda para D-tagatose quando as reações são submetidas a temperaturas mais altas, o uso de L-AIs termofílicas é preferido (KIM, 2004; LI *et al.*, 2013). Contudo, em faixas mais elevadas de temperatura, acima de 80°C, podem gerar subprodutos indesejáveis ao processo ou escurecimento do mesmo (KIM, 2004).

A Tabela 2 apresenta alguns estudos realizados com diferentes microrganismos produtores de L-arabinose isomerase, suas características reacionais, incluindo condições ótimas de pH, temperatura e afinidade por íons metálicos.

Tabela 2- Características bioquímicas das L-AIs de diferentes fontes produtoras.

Cepa produtora de L-AI	T (°C) ótima	pH ótimo	Íons Metálicos	Referências
<i>Enterococcus faecium</i> DBFIQ E36	50	5,6	Mn ²⁺	Manzo <i>et al.</i> , 2019
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PC-5	50	6,0	Co ²⁺ + Mn ²⁺	Men <i>et al.</i> , 2014
<i>Lactobacillus fermentum</i> CGMCC2921	75	6,0	Mn ²⁺	Xu <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i> NTOUI	70	7,0-7,5	Mn ²⁺	Hung <i>et al.</i> , 2014
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	65	8,0	Mn ²⁺	Jorgensen <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50	7,0	Mg ²⁺	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus stearothermophilus</i> IAM 11001	65	7,5	Mn ²⁺	Cheng <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60	8,0	Mn ²⁺	Liang <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Elaborada pela autora.

Em geral, as L-AIs apresentam elevada dependência por íons metálicos, que garantem maiores estabilidades às reações (LEE *et al.*, 2005). Com base na Tabela 2, as L-AIs denotam certa afinidade pelos metais Co²⁺ ou Mn²⁺. A concentração desses metais, oferecida no processo, pode exibir melhorias nas atividades catalíticas, desempenhando um aumento significativo da estabilidade estrutural (XU *et al.*, 2018).

Existem ainda outros fatores relevantes quando se deseja produzir, ou ainda, aplicar a enzima L-AI em uma reação de isomerização, visando à obtenção de D-tagatose. Como essa enzima reage com outros açúcares, além da galactose, um outro parâmetro relevante é o estudo da especificidade pelo substrato. Através do melhoramento genético, com uso de técnicas de

biotecnologia, é possível alcançar uma maior afinidade de L-AI para a D-galactose, quando comparada ao seu substrato natural, L-arabinose. Além disso, os parâmetros cinéticos reacionais e a determinação das melhores condições para a bioconversão e, consequentemente, a produção de açúcares raros, são consideráveis (KIM, 2004).

Dessa forma, as características para a L-AI, consideradas ideais para aplicação nas reações de obtenção de D-tagatose, industrialmente, incluem pH pouco ácido (KIM, 2004; XU *et al.*, 2018), maior afinidade pelo substrato D-galactose e boa estabilidade em temperaturas mais elevadas (KIM, 2004).

A busca pela obtenção de um processo, que resulte em altos rendimentos da enzima de interesse, com características favoráveis para aplicação à nível comercial, associada às técnicas de melhoramento genético, levou à produção de L-AI expressa em *E. coli* BL21 (DE3), a partir de cepas de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36. As características dessa enzima serão descritas no tópico seguinte.

3.4 L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36

A L-arabinose isomerase, como mencionado inicialmente, é uma enzima responsável pela isomerização, *in vitro*, da D-galactose em D-tagatose. O interesse em alcançar uma produção viável para esta enzima, uma vez que ainda não é possível encontrá-la comercialmente, está relacionado às vantagens em se obter D-tagatose por rotas biológicas. Com as condições disponíveis para o melhoramento genético de uma enzima, esse tópico mostrará as características da L-AI alcançadas em estudos anteriores, realizados por Manzo *et al.*, (2013) e Manzo *et al.*, (2019), e que resultaram na enzima produzida por esse estudo.

A L-AI isolada de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 é compatível com as bactérias do ácido lático, considerada GRAS e selecionada nos estudos desenvolvidos por Manzo *et al.*, (2013), por ter apresentado a melhor produção da proteína de interesse. Essa enzima, na sua forma nativa, apresenta elevada atividade catalítica na faixa de pH 7,0 a 7,5, reduzindo sua atividade em pHs com perfil alcalino e mantendo sua atividade catalítica superior a 60%, em pHs com perfil ácido (pH 4,0 a 6,5). Em relação à temperatura, a máxima atividade ocorreu quando as reações foram submetidas a 50°C, comprovando se tratar de um microrganismo mesofílico. A L-AI ainda necessita de íons divalentes, que promovem maior estabilidade térmica e maior atividade catalítica, sendo o Mn²⁺ o cofator mais adequado para o uso nas reações.

O gene que codifica a L-AI de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 foi clonado no sistema hospedeiro da *Escherichia coli*, através da inserção no vetor pET302/NT-His (Invitrogen), e o plasmídeo recombinante, transferido para a linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3), com o gene resistente à Ampicilina. A proteína recombinante resultante da expressão heteróloga nesse sistema de expressão teve sua produção induzida através do operon lac e apresenta em sua estrutura 6 resíduos de histidina (His) na porção N-terminal, auxiliando a purificação em colunas de afinidade por níquel. Essa enzima apresenta massa molecular em torno de 55,87 kDa, como descrito nos estudos de Manzo *et al.*, (2019). A melhor atividade catalítica se deu na temperatura a 50 °C e pH 5,6 (SOUZA *et al.*, 2017). A sequência gênica da L-AI encontra-se disponível no banco de dados GenBank com número de acesso ANS 10198.1.

3.5 Produção de enzimas recombinantes: condições para obtenção

A biotecnologia tem desempenhado estratégias, de forma relevante, para a produção de enzimas de importância industrial, através do desenvolvimento da engenharia genética, no que se chamou de tecnologia do DNA recombinante (VASCONCELOS, 2018). Os processos fermentativos têm sido alinhados às novas condições reacionais, buscando a produção de enzimas com maiores atividades catalíticas, estabilidade reacional e escala comercial.

Para se alcançar protocolos promissores para a produção de enzimas, os processos visam: a obtenção de altos rendimentos do produto, custo de processo, viabilidade técnica e recuperação da enzima a partir do caldo fermentado, bem como a triagem de substratos adequados (MALDONADO, 2006). Alguns fatores são relevantes para a produção da enzima, como a escolha do microrganismo utilizado, condições de preparo do inóculo, composição do meio de fermentação (fontes de carbono, nitrogênio), aeração, agitação, pH do meio de fermentação e temperatura (MALDONADO, 2006), tipo de indutor, momento de indução, concentração do indutor, tempo de expressão/produção, geração de subprodutos ou ainda as condições operacionais do processo (VASCONCELOS, 2018). Todos esses fatores podem interferir no rendimento de produção do ensaio (RENGE, KHEDKAR e NANDURKAR, 2012).

Os tópicos seguintes discutirão as condições de obtenção da enzima L-arabinose isomerase (L-AI), realizando uma análise dos diferentes métodos de expressão, incluindo possíveis alterações nos compostos reacionais. Serão apresentadas três diferentes estratégias,

com elevado potencial para a produção a nível industrial e aplicação na bioconversão através das reações de isomerização da D-galactose em D-tagatose.

3.6 Sistemas de Expressão para a obtenção da L-arabinose isomerase

3.6.1 Expressão da enzima L-arabinose isomerase pelo método de indução

As estratégias para a obtenção de proteínas recombinantes têm levado a um intenso estudo, buscando reduzir os impasses relativos à produção, otimizando métodos e alcançando produções com perspectivas industriais. O interesse em obter a enzima L-AI, por condições viáveis, vem sendo avaliado. A indisponibilidade no mercado tem levado a uma reavaliação das metodologias disponíveis para sua obtenção, que ainda enfrenta dificuldades associadas ao rendimento ou ao elevado custo por parte dos componentes presentes no meio de cultivo.

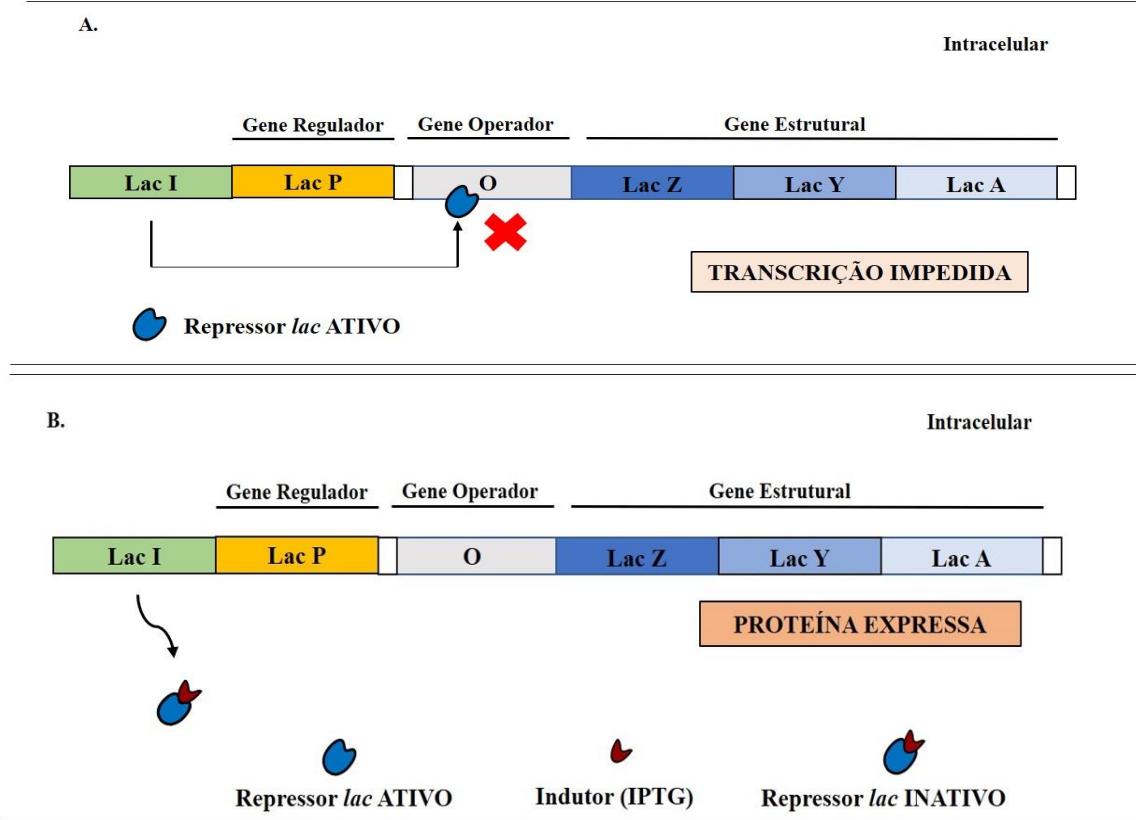
Um dos métodos para a expressão em *E. coli*, mais comumente usados, baseia-se no *operon lac*. Nesse sistema de expressão, é necessário a presença de um indutor, como o IPTG. O IPTG se liga a proteína represora (*lacI*), por difusão simples ou transporte ativo (CROWLEY e RAFFERTY, 2019), levando à diminuição da sua afinidade e possibilitando que a RNA polimerase faça a transcrição do *operon*, através da regulação gênica, resultando na síntese da proteína de interesse.

A proteína represora, regula o acesso à sequência que codifica a RNA Polimerase por ligação ao *operon lac* (Figura 4) (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; WOYSKI e CUPP-VICKERY, 2001). O *operon lac* compreende os genes de regulação, operação e estrutural, sendo os genes estruturais identificados como *lac Z*, *Y* e *A*.

O *lac Z* é responsável pela clivagem da lactose, produzindo alolactose. Na presença de alolactose, há indução da proteína de interesse. O *lac Y* codifica a lactose permease, atuando na captação de lactose e possibilitando sua entrada nas células e, o *lac A*, é o gene que codifica a transacetilase (MARBACH e BETTENBROCK, 2012).

A RNA polimerase, produzida após a indução, reproduz especificamente a sequência de codificação da proteína de interesse (sequência operadora O), que é inserida no plasmídeo de expressão sob o controle do promotor T7. Além disso, o acesso ao promotor pode ser regulado pelo represor *lacI* quando o promotor T7 se liga ao operador *lac* (DUBENDORFF e STUDIER, 1991; OVERTON, 2014). Assim, quando o IPTG se encontra disponível no sistema, o *operon lac* é ativado e, consequentemente, os genes que o compõem (*lac Z*, *Y* e *A*) são traduzidos (VASCONCELOS, 2018).

Figura 4 - Estratégias de funcionamento do operon lac. Em A. na ausência do indutor (IPTG) e em B., mecanismo desenvolvido na presença do indutor (IPTG), permitindo a expressão da proteína de interesse.



Fonte: Adaptado Vaz (2011).

Na Figura 4 A, o lacI (repressor) inibe a ação do promotor, impossibilitando, dessa forma, a expressão da proteína. Para o caso B, quando o indutor (IPTG) está presente no sistema, este se liga ao lac repressor, liberando o operador, permitindo, assim a expressão da proteína de interesse.

O Isopropil β -1-D-tiogalactopiranósideo (IPTG) é um indutor químico convencional, muito empregado em sistemas de expressão de proteínas heterólogas. Para a sua incorporação nos meios de cultivo, é necessário o monitoramento da cultura, uma vez que as células precisam estar em altas concentrações no meio (fase exponencial de crescimento) para se iniciar a indução. (DVORAK *et al.*, 2015; EINSFELDT *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009).

Muitos são os estudos voltados para a produção da L-arabinose isomerase utilizando o IPTG como indutor (VAN HOLSBEECK *et al.*, 2014; LAKSMI *et al.*, 2020; MANZO *et al.*, 2013; SOUSA, 2017). Contudo, diante das dificuldades em aplicar este indutor nos sistemas associados ao aumento de escala, devido ao seu alto custo de mercado, os riscos à citotoxicidade (BRIAND *et al.*, 2016; SARGO, 2011) e a necessidade de expressões com maiores

rendimentos de produção, uma alternativa favorável foi desenvolver sistemas de produção heteróloga viáveis e passíveis de serem obtidos a nível industrial, sugerindo a substituição do uso do IPTG por indutores mais acessíveis. Nesse contexto, o processo de autoindução (ZYM-5052) torna-se uma alternativa promissora, por empregar indutores de baixo custo, como a lactose, e gerar maiores rendimentos da proteína de interesse, não apresentando, até o momento, outro estudo na literatura para a expressão da L-AI. O tópico a seguir discutirá as vantagens associadas ao emprego do método de autoindução e a dinâmica envolvendo o processo.

3.6.2. Expressão da L-AI pelo método de autoindução

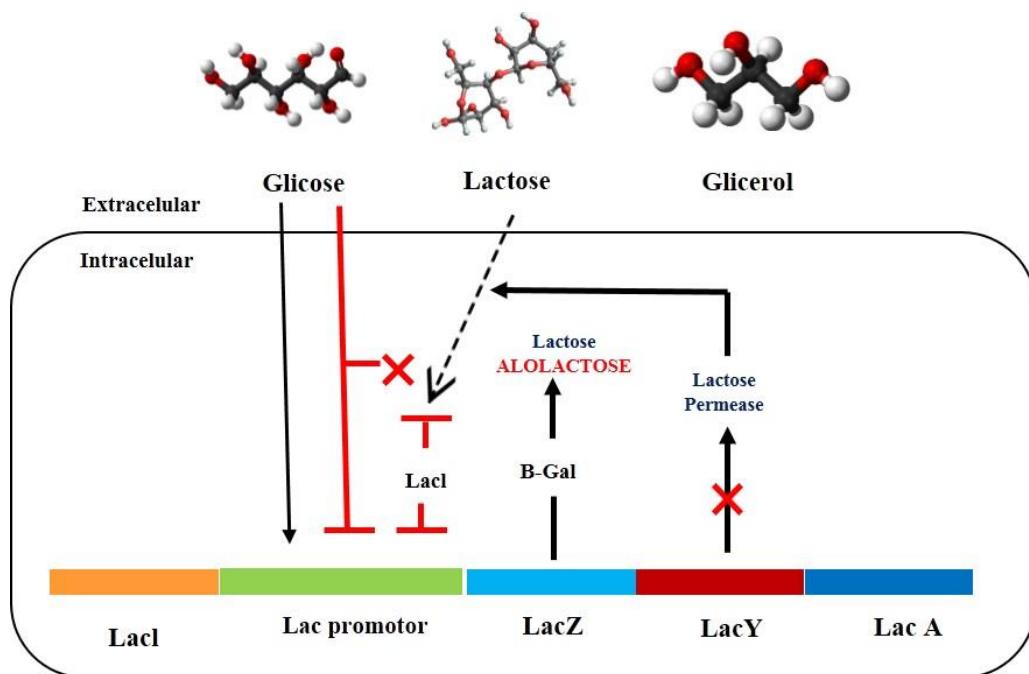
O processo de autoindução (AI) é aquele cuja expressão da proteína recombinante se dá pela dinâmica entre as fontes de carbono, energia e indução, disponíveis no meio, mediadas através do processo dinâmico de regulação do promotor e repressor, presentes no *operon lac* (BLOMMEL *et al.*, 2007). Este método surge como uma alternativa promissora, conveniente e econômica, que não requer monitoramento da densidade de células ou indução com emprego do IPTG (BRIAND *et al.*, 2016).

Nesse processo, o crescimento celular se dá à medida que os substratos (fontes de carbono, energia e indutores) são metabolizados, através das reações bioquímicas. O protocolo desenvolvido por Studier (2005) pode ser utilizado para qualquer sistema de expressão de proteínas.

Dos componentes presentes no meio de autoindução (ZYM- 5052), destacamos a glicose, glicerol e lactose. A glicose é a fonte de carbono preferencial e, portanto, a primeira a ser metabolizada. O seu consumo pelas células ocorre de forma imediata e chega a ser esgotada durante o crescimento. Na presença da glicose, a ação do indutor é bloqueada, não havendo expressão efetiva da proteína de interesse e, consequentemente, sem regulação do *operon lac*. A concentração dessa fonte de carbono deve ser escolhida para que o seu consumo total ocorra no meio ou no final da fase exponencial de crescimento celular, para que não ocorra repressão catabólica no *operon lac* (CROWLEY e RAFFERTY, 2019). Outro fator importante é a concentração de glicose oferecida no processo. Studier (2005) avaliou concentrações limitantes para a não formação de ácido no meio, pois, caso excedesse o limite, a formação de ácido impediria o crescimento das células e, consequentemente, comprometeria a produção proteína de interesse. Quando a glicose é esgotada no meio, as bactérias passam então a utilizar como fonte secundária o glicerol ou a lactose (BLOMMEL *et al.*, 2007; STUDIER, 2005).

O metabolismo do glicerol proporciona a manutenção do crescimento celular até a densidade ser a ideal para o início da indução. Essa fonte de carbono não inibe a indução pela lactose. Nesse momento, a cultura é automaticamente induzida, quando a lactose entra na célula, por transporte ativo via lactose permeasse. Parte dessa lactose é convertida em alolactose, através de transglicosilação por β -Gal (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; STUDIER, 2005). Para os sistemas de expressão recombinante que ocorrem sob controle do operon lac, a formação e presença de alolactose durante o cultivo indicam que haverá expressão das proteínas heterólogas (STUDIER, 2005). A Figura 5 mostra o mecanismo das fontes de carbono e do indutor no operon lac, baseado nos estudos de Studier (2005).

Figura 5- Sistemas de expressão pelo método de autoindução com uso da lactose comercial como indutor de proteínas heterólogas. Mecanismo referente ao metabolismo das fontes de carbono e do indutor, no operon lac.



Fonte: Adaptado de Crowley e Rafferty, 2019

O lac I é o gene da proteína de repressão. Quando ligado ao operador, impossibilita a ligação da RNA polimerase e, com isso, não há a transcrição gênica. Na presença de glicose, a lactose é impedida de induzir a proteína de interesse. Quando há o esgotamento da glicose, a lactose disponível no meio atua como fonte de indução, ligando-se ao repressor (lac I), liberando o operador, promovendo a ação do promotor e, consequentemente, permitindo a transcrição a partir da RNA polimerase. O lac Z é o gene estrutural. Nesse ponto do operon

lac, ocorre a hidrólise das ligações glicosídicas da lactose e formação da glicose e galactose, a partir da enzima β -galactosidase, produzindo alolactose, análogo ao IPTG, sendo considerado indutor primário. *Lac Y* é o gene que codifica a *lac* permease e é responsável pelo transporte ativo da lactose para dentro da célula. Por fim, o *lac A* codifica a transacetinase (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; GYNNÅ, 2014).

Os sistemas de produção de proteínas por autoindução (ZYM-5052) apresentam as concentrações dos componentes consideradas adequadas para a expressão de proteínas heterólogas. Contudo, é válido realizar um estudo voltado para a obtenção da proteína de interesse.

O metabolismo celular, os níveis de expressão e as variáveis do processo podem ser influenciados com base nos nutrientes disponíveis no meio e a formação de subprodutos indesejáveis. Em alguns casos, pode existir a necessidade de alimentação de determinado componente, a geração de subprodutos indesejáveis ao processo ou o não tamponamento. Cada variável deve ser acompanhada e possíveis ajustes dos compostos presentes no meio podem ser realizados.

3.6.3 Soro de leite: um importante substrato para a expressão de proteínas pelo método de autoindução

O soro de leite é considerado um subproduto oriundo do processo de obtenção de queijos, obtido após a remoção da coagulação da caseína ou durante a produção de queijos, possuindo elevada importância associada ao volume gerado e por apresentar em sua composição altas concentrações de lactose (ILLANES, 2011). Esse subproduto representa 80-90% do volume total do leite empregado nas produções de queijo (ALVES *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017) e contém, aproximadamente, 55% dos nutrientes do leite (SISO, 1996).

A geração desse subproduto está associada a problemas no impacto ambiental oriundas das indústrias de laticínios, uma vez que as produções nesse setor geram elevadas cargas orgânicas (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017), podendo causar sérios impactos ao ambiente, quando descartados sem tratamentos (REGHELIM e RIGHI, 2018). Cerca de 50% do soro de leite gerado globalmente é processado e aplicado para a produção de alimentos humanos, suplementos animais ou produtos farmacêuticos, precisando de uma solução ou tratamento para o restante do soro gerado (AMARO *et al.*, 2019; ISRANI *et al.*, 2020). Os efluentes formados são diversificados, pois variam com base nas características do produto gerado (iogurte, queijo, manteiga, leite, sorvete). Além disso, o planejamento do descarte dos

resíduos e as condições operacionais influenciam nas características dos efluentes, contribuindo substancialmente para a poluição da superfície das águas e solo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

Para a produção de 1kg de queijo, são necessários, em média, 10L de leite, e boa parte desse produto é soro de leite (SILVA *et al.*, 2017). Considerando o alto volume de soro de leite gerado anualmente, são necessárias aplicações viáveis, que possam agregar valor ao produto, reduzindo possíveis contaminações que seriam geradas para o ambiente ou os altos custos de processo para o seu descarte ser realizado de forma correta, não trazendo prejuízos ao ambiente, devido à elevada carga orgânica. Um fator que deve ser considerado é o alto custo para o desenvolvimento de uma planta visando o processamento de soro de leite e o volume de soro de leite líquido necessário para justificar o seu processamento industrial (SILVA *et al.*, 2017). Dos componentes pertencentes ao soro, a lactose e as proteínas são os de maiores destaques. O soro de leite apresenta em sua composição, aproximadamente, 70 a 72% de lactose (de sólidos totais), entre 8 a 10% de proteínas e 12 a 15% de minerais (JELEN, 2011). Por ser rico em lactose, muitos são os estudos voltados para a sua aplicação, como por exemplo, seu uso como fonte energética para processos biotecnológicos (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001; SISO, 1996), agregando valor ao produto e ao processo, colaborando, dessa forma, com a não geração de poluentes ou a redução de custos associados aos tratamentos dos efluentes para seu descarte. Uma alternativa favorável é o emprego do soro de leite nos processos fermentativos. Por ser rico em lactose, esse substrato pode ser utilizado em fermentações diretas ou na hidrólise da lactose, gerando glicose e galactose (JELEN, 2011).

A Tabela 3 apresenta estudos em que foram utilizados soro de leite como componente dos meios de cultivo.

Tabela 3 – Processos biotecnológicos onde o soro de leite foi utilizado como matéria-prima.

Microrganismos utilizados	Bioproductos gerados	Referências
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactulose	Albuquerque, 2018.
<i>B. megaterium Ti3</i>	Polihidroxialcanoatos	Israni <i>et al.</i> , 2020.
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Lacto- oligossacarídeos	Mano <i>et al.</i> , 2019.
<i>Saccharomyces fragilis IZ 275</i>	β -galactosidase	Bosso <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus sp</i>	α - amilase	Bajpai <i>et al.</i> , 1991.

Fonte: Elaborada pela autora.

No Brasil, o primeiro trimestre de 2020 contou com a industrialização de leite cru, resfriado ou não, de 6.300.048 bilhões, dos quais 80.928 milhões foram pertencentes ao Ceará (IBGE, 2020).

Para o desenvolvimento do protocolo de autoindução de proteínas heterólogas (STUDIER, 2005), é necessária a adição de lactose no meio de cultivo (ZYM -5052), que atua como fonte de carbono e indutor responsável pela regulação do *operon lac*. Sendo o soro de leite utilizado em estudos de biocatálise enzimática (ILLANES, 2011), uma aplicação promissora é o emprego da lactose disponível no soro, que atuará como fonte de indução de baixo custo/ substrato alternativo para a produção de proteínas (VIITANEN *et al.*, 2003). Essa aplicação resolveria os problemas relacionados à inviabilidade do emprego do IPTG em processos em escala comercial, colaborando ainda com o uso de um subproduto em um processo de interesse industrial.

Portanto, nos estudos desenvolvidos neste trabalho, o indutor IPTG foi substituído pela lactose comercial, objetivando a redução dos custos associados ao processo, visando alcançar maiores expressões da proteína de interesse, além da não necessidade do monitoramento do processo para adição do indutor, uma vez que, nesse método, o indutor está contido no meio e seu metabolismo é realizado pela própria bactéria.

A fim de alcançar melhores expressões pelo processo de AI, em relação ao de indução com IPTG, um novo protocolo foi avaliado, agora utilizando o soro de leite como fonte de lactose. Esse processo permitiu a produção de extratos ricos em L-arabinose isomerase, apresentando maiores atividades catalíticas quando comparados aos extratos obtidos pelo processo de indução, além de reduzir os custos associados ao meio de cultivo e geração de produtos de alto valor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentados os materiais e as metodologias empregados nas etapas de expressão, caracterização e aplicação da enzima L-arabinose isomerase (L-AI).

4.1 Materiais

4.1.1 Expressão da L-arabinose isomerase

Os meios de cultivo e os reagentes que os compõem: cloreto de amônio (Sigma-Aldrich), extrato de levedura, fosfato de potássio (Synth), fosfato de sódio, glicose (Dinâmica), lactose comercial (Dinâmica), sulfato de magnésio (Dinâmica), sulfato de sódio (Vetec) e triptona (Kasvi) foram de grau analítico.

O meio de cultivo Luria Bertani (LB) e o ágar bacteriológico, utilizados nas etapas de reativação do microrganismo, foram adquiridos da marca Kasvi. Isopropil β -1-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e ampicilina (Amp) foram da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O soro de leite em pó foi cedido pela Indústria Alibra Ingredientes Ltda (Campinas-SP). Albumina de soro bovino, utilizada como padrão para a quantificação de proteínas, foi da marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

4.1.2 Microrganismo

Neste trabalho, a produção da enzima L-arabinose isomerase se deu a partir do uso de cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3), geneticamente modificadas com o plasmídeo contendo o gene para a L-AI (Laiso_pET302/NT-His).

Essa cepa foi selecionada, em estudos prévios por Manzo *et al.*, (2013), na sua forma nativa, como a que melhor expressou a enzima L-arabinose isomerase (L-AI). Em seguida, no trabalho desenvolvido por Manzo *et al.*, (2019), as etapas de clonagem e expressão da proteína se deram a partir do emprego da cepa selecionada, resultando em maiores quantidades da proteína recombinante.

4.1.3 Reagentes empregados nos ensaios de atividade enzimática

Para a determinação da atividade catalítica, foram utilizadas soluções de D-galactose e D-tagatose (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA), através da metodologia cisteína-carbazol (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A 70% da marca Neon.

4.1.4 Reagentes empregados nos ensaios de eletroforese (SDS-PAGE Tricina)

A preparação dos géis de eletroforese (SDS-PAGE Tricina) para a identificação da massa molecular da L-AI se deu a partir do empregado de acrilamida, bis-acrilamida, β -mercaptopoetanol, N, N, N', N' tetra- etilenodiamina (TEMED), persulfato de amônio 1%, SDS (dodecilsulfato de sódio), trisma básico, tricina, comassie blue e glicerol.

O marcador de massa molecular compreendia proteínas entre 10 kDa – 245 kDa (GE Healthcare Life Sciences).

4.2 Métodos

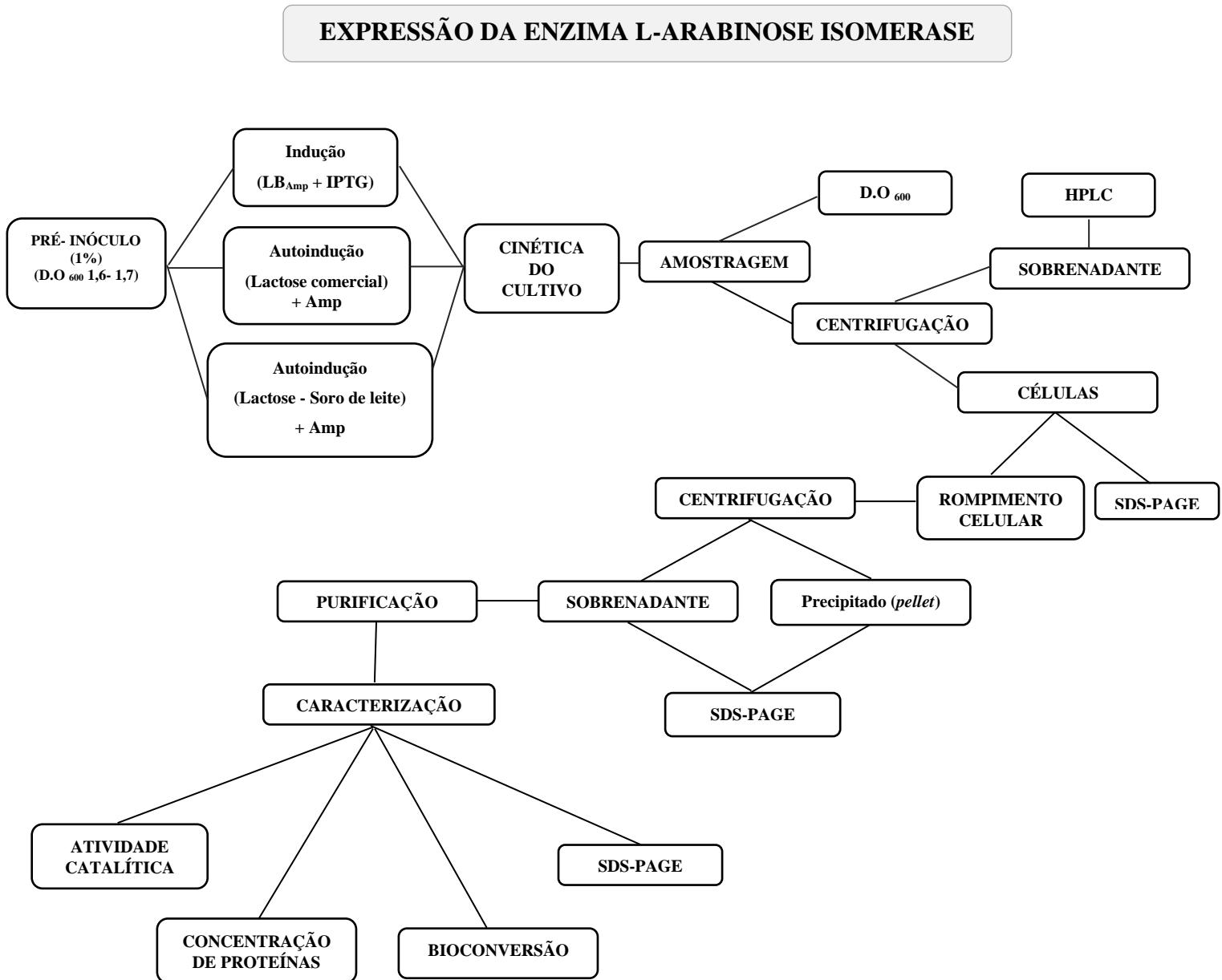
Esse tópico mostrará as metodologias empregadas durante as investigações para a expressão da enzima L-arabinose isomerase (L-AI). Apresentará, ainda, as estratégias de cultivo, suas adaptações e progressões, as caracterizações dos extratos produzidos (ensaio de atividade catalítica, concentração de proteínas, determinação da massa molecular, efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática), quantificação dos carboidratos presentes no meio de autoindução (ZYM-5052) e bioconversão da D-galactose em D-tagatose, com uso do biocatalisador (L-AI).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são apresentados como a média destes valores e com desvio padrão.

4.2.1 Fluxograma para a obtenção, caracterização e aplicação da L-AI

A Figura 6 apresenta as principais etapas desenvolvidas nesse estudo.

Figura 6- Fluxograma das fases de produção e caracterização da enzima L-AI.



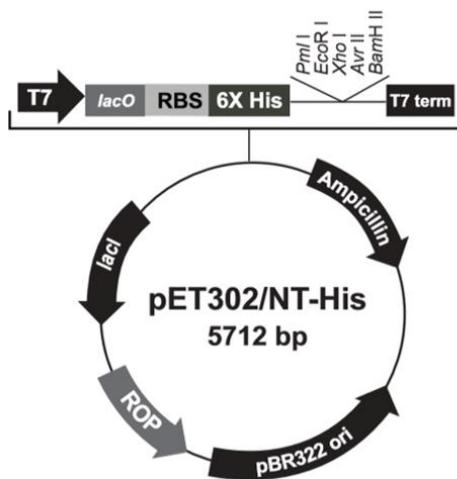
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 A L-AI de *Enterococcus faecium* em *E. coli* BL21 (DE3)

4.2.2.1 Clonagem

A escolha do plasmídeo, vetores e todas as etapas inerentes à clonagem foram realizadas nos estudos de Manzo *et al.*, (2019). O gene araA, DNA genômico que codifica a L-AI de *Enterococcus faecium*, foi clonado e super expresso em *E. coli* BL21 (DE3), contendo a polimerase T7. O plasmídeo pET302 / NT-His (+) possui uma cauda com seis histidinas (His) na região N-terminal, promovendo a purificação das proteínas por afinidade a um metal. O vetor pET302 confere resistência ao antibiótico ampicilina (Amp) e apresenta uma região que propicia a indução com uso de lactose ou IPTG. A sequência gênica de nucleotídeos da cepa de *E. faecium* DBFIQ E36 e a sequência da proteína de interesse (L-AI) encontram-se disponíveis no banco de dados GenBank com número de acesso KU 221400.1 (ANS 10198.1). A Figura 7 apresenta o mapa do vetor pET302 / NT-His (+) (Invitrogen– Thermo Fisher Scientific).

Figura 7- Mapa do vetor pET302 / NT-His (+) utilizado para a construção da L-AI.



Fonte: Invitrogen – Thermo Fisher Scientific

4.2.2.2 Conservação da cultura e Preparo do Pré – inóculo

As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) modificadas com Laiso_pET302/NT-His foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100µg/mL) e 20% (v/v) de glicerol, como agente crioprotetor. As amostras foram preservadas a -80°C, assegurando sua estabilidade. Para cada cultivo, as cepas estocadas foram previamente reativadas, inicialmente

em caldo (LB_{amp}) e, posteriormente, em placas, para em seguida serem adicionadas ao pré-inóculo.

O pré-inóculo (50 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL) foi realizado inserindo alçadas da cultura em meio LB_{amp} , incubados a 37°C, overnight, atingindo $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ entre 1,6 -1,7 (espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Genesys 6). Todas as etapas foram desenvolvidas em ambiente estéril.

4.2.2.3 Extratos Enzimáticos de L-AI

O conhecimento inicial das soluções de enzima deste estudo foi desenvolvido e avaliado por Manzo e colaboradores (2019), utilizando IPTG como indutor. Essa enzima possui etiquetas de Histidina (His) na região N-terminal, 488 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 55,87 kDa e ponto isoeletérico de 5,07 (MANZO *et al.*, 2019).

4.2.3 Estratégias para a expressão da recombinante de *Enterococcus faecium* em *E. coli BL21 (DE3)*

4.2.3.1 Etapa inicial para a expressão proteína recombinante L-AI

Os processos descritos a seguir serão os mesmos para as diferentes estratégias apresentadas nesse estudo. Os cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) modificados com Laiso_pET302/NT-His, estocados em *cryovials*, foram retirados do freezer a -80°C e deixados em banho de gelo, até que estivessem descongelados. Em seguida, alçadas foram adicionadas ao caldo LB (composição por litro: triptona 10g, extrato de levedura 5g e cloreto de sódio 5g), suplementados com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Depois de incubados nas condições mencionadas anteriormente, alçadas foram estriadas em placa contendo meio LB_{amp} (20mL) e ágar bacteriológico (2%). A placa estriada foi então incubada a 37°C por 24h.

Para o preparo do pré-inóculo, foram utilizados 50mL de meio LB_{amp} . Colônias isoladas foram adicionadas ao pré-inóculo, incubadas a 37°C, 200rpm, overnight, garantindo uma D.O_{600} de pré- inóculo entre 1,6-1,7.

Para os processos de indução e autoindução realizados em mesa agitadora (shaker), os ensaios foram realizados utilizando 200mL de meio de cultivo em frascos de 1000mL.

Nos cultivos em biorreator, foram utilizados 3000mL meio AI (ZYM-5052) a 300rpm e taxa de aeração de 0,6 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

A calibração do eletrodo de oxigênio, no biorreator, se deu após autoclavagem e foi realizada a partir de um único ponto. A temperatura e a agitação do sistema, durante a calibração, foram as mesmas utilizadas durante os cultivos.

O ar era forçado a entrar no meio de cultivo, com auxílio de um compressor de bancada (ar comprimido), que dispõe do valor de saturação. A calibração do sistema era então definida como 100% da saturação de oxigênio (ponto máximo). O meio de cultivo era então, saturado com oxigênio e, durante o cultivo, o sistema mostrava percentuais, em relação ao ponto máximo, exibindo dessa forma a porcentagem de oxigênio dissolvido para cada ponto em análise.

4.2.3.2 Expressão da enzima por indução com IPTG

Para a expressão da enzima de interesse (L-AI), inicialmente estudou-se a produção com o emprego de um indutor convencional, o Isopropil β -1-D-tiogalactopiranósideo (IPTG).

Foi transferido 1% de pré-inóculo para o meio de cultivo LB_{amp} (1:5), incubado a 37°C, 200rpm, até se atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,8 e 1,0, o que correspondeu a aproximadamente 4 a 5h de ensaio. A indução teve início após a adição de 0,5 mM de IPTG. A concentração de indutor foi adotada por diversos estudos e garante uma boa expressão da enzima de interesse (VAN HOLSBEECK *et al.*, 2014; MEN *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2018; MANZO *et al.*, 2019).

As culturas foram então centrifugadas (Hettich Zentrifugen-Rotina 420R) a 7000 x g, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células formadas foram lavadas com solução salina, 0,1 M NaCl, seguidas de centrifugação a 7000 x g, 4°C durante 20 min. O concentrado de células (*pellet*) foi então armazenado a -20°C.

4.2.3.3 Produção da proteína recombinante L-AI por autoindução (AI)

A expressão da enzima L-AI por autoindução se deu através da metodologia desenvolvida por Studier (2005). Nesse processo, o indutor (lactose) encontra-se disponível no meio de cultivo. A autoindução depende do mecanismo que a própria bactéria possui e utiliza para selecionar as fontes de carbono e nutrientes presentes no meio. O meio definido como ZYM -5052 foi o escolhido para a expressão da enzima por autoindução, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4- Composição do meio de autoindução ZYM-5052, pH 7,0 (STUDIER, 2005). Meio esterilizado por calor úmido (autoclave) a 121 °C por 15min.

Composição do meio	Concentrações
Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
Fosfato de sódio (Na_2HPO_4)	25 mM
Fosfato mono potássico (KH_2PO_4)	25 mM
Cloreto de amônia (NH_4Cl)	50 mM
Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	5 mM
Glicerol	0,5%
Glicose	0,05%
Lactose	0,2%
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	2 mM

Fonte: Elaborada pela autora.

O pré-inóculo foi realizado nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.2. Após a esterilização, procedeu-se com a adição de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e de 200 μL por litro de meio da solução de elementos traços. Os elementos traços são formados por uma mistura de 50 mM FeCl_3 , 20 mM CaCl_2 , 10 mM MnCl_2 , 10 mM ZnSO_4 , 2 mM COCl_2 , 2 mM CuCl_2 , 2 mM NiCl_2 , 2 mM Na_2MoO_4 , 2mM Na_2SeO_3 e 2 mM H_3BO_3 e foram esterilizados por filtração.

4.2.3.4 Produção da proteína recombinante L-AI por autoindução suplementada com soro de leite pré-tratado

Considerando que o soro de leite é uma fonte rica em lactose, avaliou-se a produção da enzima L-AI a partir do cultivo com uso do meio de autoindução ZYM-5052, empregando a lactose proveniente do soro de leite como indutor disponível no meio.

O soro de leite, em pó, utilizado no estudo, foi cedido pela indústria Alibra Ingredientes Ltda. Para ser adicionado como indutor, no meio de cultivo, foi necessário realizar um pré-tratamento, uma vez que ele é rico em proteínas e essas poderiam interferir de forma negativa na síntese enzimática da L-arabinose isomerase.

Além do pré-tratamento, três diferentes concentrações de lactose foram estudadas, a fim de identificar a que melhor promoveria maiores rendimentos da proteína de interesse. Esse estudo foi importante, pois não fizemos uso de um permeado de soro, e sim, do soro de

leite, podendo, portanto, apresentar em sua composição demais nutrientes, além da lactose, que é o substrato de interesse, ou ainda, impurezas, que poderiam interferir na produção da proteína de interesse.

Dessa forma, o soro de leite em pó foi pré-tratado em três diferentes concentrações de lactose (2g.L^{-1} , 4g.L^{-1} e 8g.L^{-1}), aquecido até se atingir a temperatura de 85°C , sob agitação. Nessa temperatura, foram adicionadas gotas de ácido lático P.A (Vetec) até o ajuste do pH para 4,8. Quando a solução de soro de leite atingiu a temperatura de 90°C , agitação e aquecimento foram suspensos. A solução foi mantida em repouso até que se observasse a formação de precipitado (LIMA, 2013). Após sedimentação das proteínas, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo, suplementada com os componentes descritos na Tabela 4.1 e esterilizada a 110°C por 10 minutos. O pré - inóculo e o cultivo seguiram nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.2, com adição de antibiótico e elementos traço.

Para quantificar a concentração de lactose no soro, as amostras foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA), com detector de Índice de Refração (IR) modelo 2414 e coluna HPX-87H na vazão de $0,5\text{ mL.min}^{-1}$ a 65°C e 5mM de ácido sulfúrico como fase móvel. O tempo de corrida das amostras foi de 20 minutos e o volume injetado, $20\text{ }\mu\text{L}$.

Todas as etapas descritas para a expressão da proteína foram desenvolvidas em ambiente estéril.

4.2.3.5 Determinação do tempo de cultivo para expressão

O melhor tempo para a expressão da proteína de interesse, nas diferentes estratégias avaliadas, foi determinado através da coleta de alíquotas (amostragem), em tempos (h) predeterminados, e seus perfis de expressão avaliados através dos ensaios de eletroforese (SDS-PAGE Tricina) e do software ImageJ (MACHADO *et al.*, 2013).

4.2.3.6 Contagem de Células Viáveis

Enquanto o número total de células foi verificado por densidade ótica (D.O), lido em espectrofotômetro a 600nm e submetida a curva de crescimento padrão para a quantificação de biomassa formada (g.L^{-1}), a avaliação da viabilidade celular nas diferentes fases de produção da proteína de interesse foi determinada por contagem em placas (microgotas).

As placas foram divididas em quadrantes, correspondendo às diluições seriadas, contendo o meio LB_{amp} (20mL). As amostras, preparadas em microtubos, continham 900µL de solução salina + Tween 80 (0,5%) e 100 µL das amostras retiradas em tempos predeterminados.

Depois de inoculadas, as placas foram incubadas a 30°C por 24h. As colônias formadas foram contabilizadas (entre 5-100) e mensuradas por Unidade Formadoras de Colônia (UFC) por mL. Todo o experimento foi realizado em ambiente estéril.

4.2.3.7 Extração da proteína L-AI

Por se tratar de uma enzima expressa intracelularmente em *E. coli*, os concentrados de células (*pellets*) foram ressuspensos em tampão 50mM Tris HCl pH 8,0, suplementados com 150mM NaCl. A ruptura das células foi realizada através de ultrassom de ponteira (Sonicator Qsonic, Q500 Sonicators, EUA) com 30% de amplitude, pulsos de 3 segundos *on* e 3 segundos *off*, durante 4 minutos. O processo foi realizado, inicialmente, uma única vez, e, reavaliando a melhor condição para extração da proteína de interesse, o protocolo foi repetido três vezes, para cada amostra. Todas as etapas ocorreram em banho de gelo.

Após a ruptura celular, as amostras foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen-Rotina 420R) para que houvesse a separação dos resíduos celulares e do extrato enzimático. A centrifugação ocorreu a 7000 x g, 4°C durante 20 minutos. Ao final do processo, o sobrenadante livre de células correspondeu ao extrato enzimático. O extrato de L-AI foi então caracterizado (atividade enzimática, concentração de proteínas e análise da massa molecular). As células (*pellet*) foram armazenadas a -20 °C para posterior avaliação nos géis de eletroforese.

4.2.4 Ensaio de Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade catalítica da L-AI_pET302_BL21(DE3), preparou-se uma solução contendo 0,4 mL de 500mM de D- galactose em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,6, suplementado com 1mM de MnCl₂ + 0,1 mL extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50°C durante 60 minutos, como na metodologia desenvolvida por Sousa e colaboradores (2017) e Manzo e colaboradores (2013), com modificações. Para a reação colorimétrica, responsável pela quantificação de D-tagatose convertida, 250µL dessa mistura reacional, 50µL de cisteína 1,5% (m/v), 1,5 mL ácido sulfúrico 70% (v/v) e 50µL de carbazol em álcool absoluto 0,12% (m/v) ficaram sob reação durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560nm (DISCHE e BORENFREUND, 1951).

Para a quantificação da atividade catalítica obtida (U.mL^{-1}), utilizou-se a equação 4.1:

$$\text{Ativ } (\text{U}/\text{mL}) = \frac{[\text{TAG}](\text{mM}) \cdot V_r (\mu\text{L}) \cdot D}{V_e (\mu\text{L}) \cdot t(\text{min})} \quad (4.1)$$

Sendo:

[TAG]: concentração de tagatose convertida na reação. Valor definido pela curva padrão;

Vr: Volume reacional;

Ve: Volume de solução enzimática;

D: Diluição

t: Tempo de reação do ensaio enzimático (60min).

A curva de calibração de D- tagatose foi preparada a partir de uma faixa de solução de tagatose (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA), com concentrações entre 0,015 a 0,5 mM, lidos em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22), a 560nm.

A atividade enzimática (U) da L-AI foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar e formar 1 μmol de D-tagatose por minuto, nas condições do ensaio.

4.2.5 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteína das preparações enzimáticas foi determinada através do método desenvolvido por Bradford (1976), com curva de calibração padrão (0 a 1 mg.mL^{-1}), utilizando albumina de soro bovino, com grau de pureza superior a 98% (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA) como referência.

4.2.6 Determinação da Massa Molar (SDS-PAGE)

Para determinar os níveis de expressão da proteína de interesse nos diferentes tempos de cultivo e identificar as frações enzimáticas obtidas, os ensaios de eletroforese foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Schagger e Jagow (1987).

Para os precipitados de células (*pellet*), pesavam-se 0,1g para cada 1mL de solução de amostra e para as soluções de extrato enzimático, a proporção adotada foi de (1:1) de tampão de amostras, contendo SDS e β -mercaptoetanol, submetidos a 100°C durante 10 minutos. Alíquotas contendo 15 μ L de solução foram distribuídas nos poços do gel de empilhamento. Aplicou-se uma corrente de 10mA inicialmente, seguida de um aumento para 20mA, quando as amostras atingiram o gel espaçador.

Em seguida, os géis foram expostos a solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10% e água Milli-Q 40%), por 60 minutos, lavados com água Milli-Q e transferidos para a solução corante *Coomassie Brilhante Blue G- 250* (50mg de *coommasic brilliant blue G-250* dissolvidos em 200mL de ácido acético 10%, agitados por 30 minutos, seguido de filtração) por aproximadamente 16h. Logo após, o gel foi transferido para solução descorante, composta por ácido acético 1% (v/v), realizando lavagens a cada 30 minutos, até se observar as bandas formadas. Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare Life Sciences) utilizados eram compreendidos entre 10 – 245 kDa.

No final do processo, os géis foram fotografados e as imagens avaliadas utilizando o programa de análise ImageJ, que identificou a quantidade de proteínas/ áreas das bandas formadas.

4.2.7 Estudos Preliminares de Purificação dos Extratos Enzimáticos

A purificação dos extratos enzimáticos obtidos foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Hearthcare Life Sciences, EUA) em bancada.

A coluna (1,5 cm de altura por 1,5 cm de largura; coluna de volume: 3 mL) foi equilibrada, adicionando no mínimo cinco vezes o volume correspondente ao tamanho da coluna, com tampão Tris HCl 50mM pH 8,0 e NaCl 150mM, a uma taxa de fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, mantida constante ao longo do estudo. Em seguida, as amostras (extrato de proteína recombinante) foram adicionadas na coluna. Coletou-se o pico não retido (proteínas que não apresentam afinidade pelo metal ou que não se ligaram à coluna). A coluna foi lavada com tampão de lavagem (50mM de Tris HCl pH 8,0, 150mM NaCl e 6mM imidazol), para garantir a remoção das proteínas fracamente ligadas. Adicionou-se, no mínimo, 5 vezes o volume da coluna de tampão de eluição (50mM Tris HCl pH 8,0, 500mM NaCl e 250mM de imidazol). Nesse momento, os extratos proteicos purificados foram coletados. A coluna foi então lavada com solução de 500mM de imidazol e a proteína purificada foi dialisada por 24h, contra tampão

Tris HCl 50mM, pH 8,0, totalizando 5 lavagens (trocas de tampão). O desempenho da purificação foi avaliado pelos ensaios de SDS-PAGE.

O Fator de Purificação (FP) foi calculado como a atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) dos extratos purificados em relação à atividade específica dos extratos livres de células (lisados).

4.2.8 Quantificação das fontes de carbono

As concentrações de glicose, glicerol e lactose (comercial ou soro de leite), presentes no meio de cultivo por autoindução (ZYM-5052), foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA). Avaliar a dinâmica de consumo das fontes de carbono e do indutor durante esse processo é relevante, uma vez que é determinante para a promoção da fase exponencial de crescimento celular, manutenção dessa fase e indução da proteína de interesse.

Durante a produção da enzima L-AI, foram retiradas alíquotas referentes ao cultivo. Depois de filtradas, as amostras foram injetadas (20 μL) e as leituras realizadas com uso da coluna HPX-87H na vazão de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a 65°C e 5 mM de ácido sulfúrico como fase móvel.

4.2.9 Caracterização do extrato enzimático de L-AI

4.2.9.1 Efeito do pH no ensaio de Atividade Enzimática da L-AI

Tendo em vista que a L-AI pode ser produzida por uma ampla gama de microrganismos de diferentes fontes e essas podem exibir perfis distintos para pHs, avaliou-se a atividade catalítica da enzima L-arabinose isomerase em diferentes faixas de pH's. Foram utilizados tampão acetato de sódio 50mM a pH 4,0, pH 5,0 e pH 5,6, tampão fosfato de sódio 50mM a pH 7,0 e pH 8,0 e tampão bicarbonato de sódio 50mM a pH 10,0. Todos os tampões foram suplementados com 1mM de MnCl_2 .

4.2.9.2 Efeito da Temperatura no ensaio de Atividade Enzimática da L-AI

A L-AI purificada foi submetida a diferentes temperaturas (40°C , 50°C , 55°C , 60°C e 65°C) para a determinação da melhor atividade enzimática. Todos os ensaios ocorreram durante 60 min, mantendo a proporção reacional de 0,4mL de solução com concentração final de 500mM de D-galactose e 0,1mL de solução enzimática ($1,8 \mu\text{M}$).

4.2.10 Estudo da Bioconversão de D-tagatose usando a enzima purificada L-AI

A bioconversão corresponde à razão entre a concentração de D- tagatose, produzida com uso da enzima L-arabinose isomerase, e a concentração de D-galactose oferecida no início do processo. Soluções contendo 0,1mL de extrato enzimático (L-AI) purificado (1,8 µM) e 0,4mL de 500mM de D-galactose (concentração final), preparada em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,6 suplementados com 1mM MnCl₂, ambos incubados 55°C, foram submetidas a duas diferentes concentrações de D-galactose: 164 mM e 500 mM. Essas concentrações foram definidas com base em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (OLIVEIRA, 2019). Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, durante 52h, e a quantificação da D-tagatose produzida foi realizada através do método colorimétrico cisteína-ácido sulfúrico-carbazol, como descrito no tópico 4.2.4.

4.2.11 Análise do custo do meio de produção para a obtenção da L-AI

Para se determinar qual a estratégia de expressão da L-AI apresentou menor custo de processo, os valores dos componentes dos meios de cultivo, incluindo os indutores escolhidos, foram mensurados através de uma pesquisa de preço de mercado. Fatores como condições de pré-inóculo, quantidade de pré- inóculo adicionada ao processo, condições reacionais (agitação, tempo, temperatura), não foram considerados nesse trabalho. Limitou-se apenas ao custo dos meios e às possíveis expressões alcançadas nas respectivas condições.

Todos os experimentos foram realizados com produtos de grau laboratorial. Contudo, visando a uma maior dimensão (aumento de escala) frente à expressão da enzima de interesse, as estimativas de custos foram consideradas com base em valores de mercado, utilizando a plataforma www.alibaba.com.br. Os valores de mercado variavam em uma faixa de preços, podendo levar a componentes com melhor grau de pureza ou quantidade de nutrientes. Contudo, os valores que serão apresentados foram os de menor custo frente às exigências nutricionais para uma boa condução dos processos, visando maiores expressões da L-AI.

Os custos dos componentes dos meios de cultivo foram calculados através da concentração de componente no meio e seus respectivos preços, como na equação 4.2.

$$CCM = \sum_1^n(CM \cdot P_c) \quad (4.2)$$

Em que CCM : Custo dos componentes do meio para expressão da L-AI ($\text{¢\$}. \text{L}^{-1}$); CM : Concentração de componentes utilizados nas estratégias (g.L^{-1}); Pc : Preço do componente ($\text{U\$}. \text{kg}^{-1}$), disponível na plataforma de venda.

O custo do meio para a expressão da L-AI, em centavos de dólar por litro de meio, foi calculado como na equação 4.3, sendo At a atividade dos extratos de L-AI (U.L^{-1}).

$$Cp = \frac{CCM (\text{¢\$}/\text{L})}{At (\frac{\text{U}}{\text{L}})} \quad (4.3)$$

Em que Cp equivale ao custo da produção ($\text{¢\$}. \text{U}^{-1}$).

A Tabela 5 apresenta as concentrações dos componentes utilizados em relação aos métodos de expressão adotados e seus custos ($\text{U\$}/\text{kg}$), com base na plataforma <https://www.alibaba.com>.

Tabela 5- Componentes das formulações dos meios de cultivo, indução ou autoindução, com os respectivos valores de mercado.

Componentes do meio de cultivo	Valor ($\text{U\$}/\text{kg}$)	Unidades	Concentração dos componentes/ Estratégias		
			Indução (IPTG)	AI	AI (soro)
Triptona	10,0	g.L^{-1}	10	10	10
Extrato de levedura	6,0	g.L^{-1}	5	5	5
Fosfato de sódio	0,46	g.L^{-1}	-	4,44	4,44
Fosfato de potássio	1,0	g.L^{-1}	-	3,4	3,4
Cloreto de amônia	0,1	g.L^{-1}	-	2,65	2,65
Sulfato de sódio	0,08	g.L^{-1}	-	0,71	0,71
Sulfato de Magnésio	5,0	g.L^{-1}	-	0,28	0,28
Cloreto de sódio	0,2	g.L^{-1}	5	-	-
Glicose	1,0	g.L^{-1}	-	0,5	0,5
Glicerol	1,0	g.L^{-1}	-	1,96	1,96
Lactose	2,5	g.L^{-1}	-	2	-
Lactose (soro de leite)	0,38	g.L^{-1}	-	-	4
IPTG	500	mmol. L^{-1}	0,5	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção, serão abordados os potenciais resultados alcançados frente às expressões da proteína L-arabinose isomerase, destacando os métodos avaliados, visando alcançar cultivos com maiores rendimentos da enzima, tornando o processo mais eficiente e de menor custo em relação aos estudos desenvolvidos a nível laboratorial.

As condições para a produção da L-AI, pelo método de autoindução, seja utilizando lactose comercial ou lactose derivada do soro de leite, como agente de indução, foram investigadas, e promissoras melhorias para o processo também serão explanadas. Um outro tópico apresentará as caracterizações dos extratos obtidos, bem como sua aplicação em reações de isomerização para conversão de D-galactose em D-tagatose.

5.1 Expressão, Purificação da recombinante L-AI e Quantificação das fontes de energia e indutor

5.1.1 Expressão da proteína L-AI e estudo do tempo de cultivo

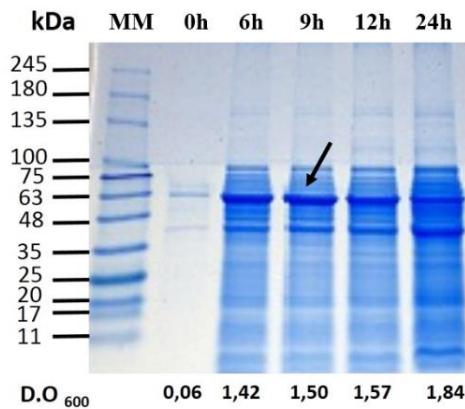
Esse tópico apresentará o perfil da expressão da proteína recombinante L-AI, a caracterização dos extratos obtidos (atividade enzimática, concentração de proteínas e atividade específica), as etapas de purificação e os ensaios de quantificação das fontes de carbono e do indutor (lactose) disponíveis no meio.

Inicialmente, foram realizados ensaios com uso do protocolo desenvolvido nos estudos de Studier (2005), com emprego da lactose como indutor. Os benefícios da aplicação da lactose em sistemas de expressão de proteínas heterólogas incluem maiores rendimentos das proteínas produzidas, não sendo necessário o controle do processo para a adição do indutor, uma vez que utilizando o método de autoindução, o indutor se encontra disponível no meio e as bactérias realizam a seleção das fontes de energia e indução (CROWLEY e RAFFERTY, 2019).

Os ensaios foram iniciados com o estudo do melhor tempo de cultivo, para se determinar o melhor momento para a expressão da enzima L-AI.

A Figura 8 exibe o perfil de expressão da proteína recombinante durante 24h de ensaio, pelo método de autoindução.

Figura 8- Perfil eletroforético dos precipitados celulares (*pellets*) obtidos após expressão da L-AI de *E. faecium* em *E. coli* BL21 (DE3), durante 24h. A proteína recombinante está indicada por uma seta.



Fonte: Elaborada pela autora.

A expressão da proteína de interesse pode ser observada a partir de 6h de cultivo, como mostra a Figura 8. A proteína indicada pela seta identifica o melhor tempo para a expressão da L-AI, com a banda em torno de 56 kDa. Com 12h de ensaio, ainda há expressão da enzima de interesse. A última fração do gel corresponde às bandas expressas com 24h de estudo. Contudo, observamos que, para esse período, não há expressão efetiva quando comparados aos demais tempos de cultivo, além de uma maior disposição de proteínas contaminantes, tornando-se inviável para a obtenção da L-AI. As frações formadas foram ainda avaliadas com uso do software ImageJ, apontando as áreas das bandas e a porcentagem relativa à amostra, como na Tabela 6.

Tabela 6- Área das frações de L-arabinose isomerase e percentual calculados em relação à produção com uso do meio de autoindução.

Tempo de amostragem (h)	Áreas das frações	Percentual Relativo (%)
0	1.004.820	16,2
6	4.950.832	79,4
9	6.232.024	100
12	3.969.926	63,7
24	1.330.598	21,4

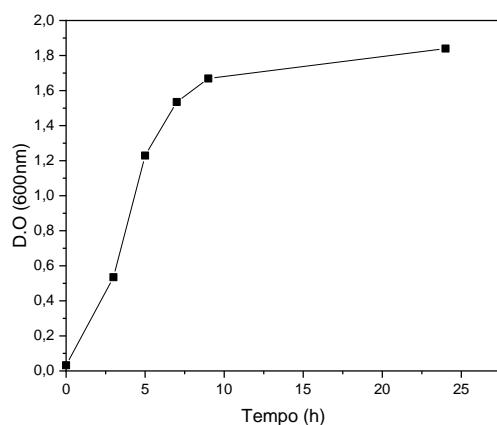
Fonte: Elaborada pela autora.

Com base na Tabela 6, os melhores tempos para a expressão da proteína de interesse se deram com 6 e 9h, o que correspondeu ao final da fase log e a fase estacionária,

respectivamente. Se avaliarmos, ainda, o percentual relativo as áreas geradas equivalentes a L-AI, houve uma diferença, de aproximadamente, 20% entre os tempos. Contudo, os extratos enzimáticos mais enriquecidos da proteína de interesse foram os avaliados após 9h de cultivo.

A Figura 9 apresenta o perfil de crescimento celular, acompanhado pela densidade ótica (DO) a 600nm, durante a produção da enzima L-AI por AI.

Figura 9- Cinética de crescimento da L-arabinose isomerase com uso do meio de autoindução.



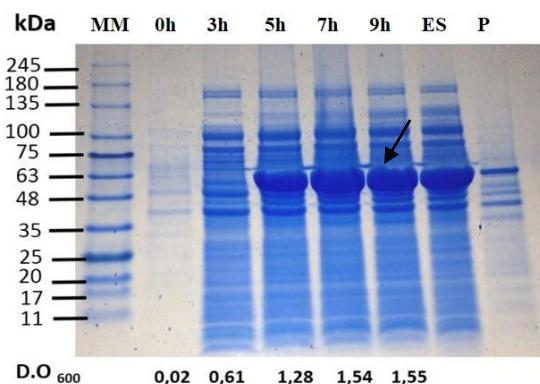
Fonte: Elaborada pela autora.

Durante 24h de ensaio, alíquotas foram retiradas em tempos definidos e o crescimento celular foi mensurado por espectrofotômetro a 600nm. Como o período de 9h foi o que resultou na maior expressão da proteína de interesse, as análises realizadas nas amostras foram avaliadas até esse momento.

Após leitura, por densidade ótica, as amostras foram centrifugadas e os precipitados (*pellet*) estimados através dos ensaios de eletroforese (SDS-PAGE Tricina), visando a ratificar as frações formadas da proteína recombinante. O sobrenadante coletado após centrifugação foi quantificado através dos ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar o consumo das fontes de carbono e indutor (glicose, glicerol e lactose) disponíveis no meio.

O perfil da expressão da proteína recombinante L-AI, obtido pelo protocolo de autoindução, pode ser visualizado na Figura 10.

Figura 10- Expressão da L-AI pelo método de autoindução. Frações dos precipitados gerados durante o cultivo, fração da enzima solúvel e fração do *pellet* (pós rompimento). ES: Extrato solúvel (pós lise); P: *Pellet* (pós rompimento).



Fonte: Elaborada pela autora

Observou-se que a expressão da proteína recombinante foi iniciada, com base nos tempos avaliados, com 5h de cultivo, coincidindo com o final da fase log (Figura 9). A fase log é caracterizada pelo metabolismo da glicose no meio. Portanto, nesse momento, a indução da proteína, caso aconteça, ocorre de forma muito pequena, uma vez que a presença da glicose no meio impede a indução pela lactose. Dessa forma, se correlacionarmos os gráficos de crescimento de células, lidas por densidade ótica (D.O) (Figura 9) em relação aos perfis de expressão (Figura 10), entre 3 e 5h, o consumo de glicose foi acentuado, com esgotamento dessa fonte de carbono e o início do processo de indução. No extrato enzimático (extrato solúvel após a lise), apesar de haver frações indicando a presença de outras proteínas, prevalece a proteína com massa molecular de aproximadamente 56kDa, como previsto, correspondendo à L-AI. A fração relativa ao *pellet* foi mensurada a fim de identificar se o rompimento das células seguia protocolos consideráveis ou se havia perda de proteína no processo ou falha durante a lise. Como o gel apresentou uma fração em torno da massa da proteína recombinante em estudo, os protocolos de extração da proteína foram readaptados, tendo o rompimento da célula sido realizado 3 vezes, ao invés de 1, como aconteceu com o gel apresentado. Extratos enzimáticos de L-AI produzidos nos estudos realizados por Kim *et al.*, (2009); Li *et al.*, (2011); Hung *et al.*, (2014); Van Holsbeeck *et al.*, (2014); Men *et al.*, (2014) e Sousa (2015) também confirmam uma massa molecular entre 50 a 66 kDa.

A produção da proteína recombinante também foi realizada nesse trabalho, através do protocolo de indução, com emprego de 0,5 mM de IPTG. A expressão da proteína através do uso do IPTG é bem conhecida e eficiente para sistemas de expressão baseados no *operon lac*. O indutor foi adicionado ao meio reacional entre 4 a 5h de ensaio, correspondendo à fase

exponencial de crescimento, confirmada através da D.O_{600nm} em torno de 0,8. Após adição do IPTG, realizou-se o cultivo por mais 4h.

Os extratos proteicos obtidos nesse estudo foram comparados com outras produções, avaliando-se atividade catalítica, concentração de proteínas e atividade específica, como explanados na Tabela 7.

Tabela 7 – Produção enzimática da L-arabinose isomerase em diferentes métodos.

Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)	Concentração de Proteínas (mg. mL ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Referências
1,67±0,14	2,68±0,00	0,62	Este estudo (AI)
0,7±0,04	7,4±0,18	0,10	Este estudo (IPTG)
2,63±0,01	74,3±0,28	0,04	Felix (2017) (IPTG)
0,13	6,73	0,01	Gomes (2018) - IPTG
5,29	145,00	0,04	Sousa (2017) - IPTG
3,01	30,90	0,10	Sousa (2015) - IPTG

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos estudos realizados por Sousa (2015), a atividade específica (U.mg⁻¹) dos extratos produzidos com emprego da cepa *E. coli* BL21, induzidos com 1mM de IPTG, foi de 0,1. Se equipararmos com os resultados alcançamos neste estudo, a atividade específica foi a mesma, porém utilizando uma concentração menor de indutor (0,5 mM) para as expressões. Estudos prévios confirmam que a concentração de 0,5 mM de IPTG é eficiente para a obtenção de boas expressões da proteína de interesse. Concentrações menores que as utilizadas nesse estudo não resultaram em boas expressões da proteína. Contudo, quando foram utilizadas altas concentrações, como 1mM, a indução seguiu de forma semelhante à encontrada com aplicação de 0,5 mM de IPTG, como comprovado por Manzo *et al.*, (2019).

Felix (2017) produziu extratos que apresentaram atividades específicas de 0,04 U.mg⁻¹ com 3% de pré-inóculo e 0,3 mM de IPTG, corroborando que baixas concentrações de indutor podem levar a uma diminuição da produção da proteína. Sousa e colaboradores (2017) avaliaram, ainda, a produção da L-AI em *E. coli* BL21 com uso do meio Terric Broth, ao invés do Luria Bertani (LB), visando um aumento da atividade específica e, consequentemente, uma melhor produção da enzima de interesse. Porém, a atividade atingida foi de 0,04 U.mg⁻¹. Nos estudos de Gomes (2018), a atividade específica para a L-AI LSLt foi de 0,01 U.mg⁻¹, ou seja, quase não houve expressão da proteína recombinante.

Outra observação interessante é que tanto a atividade catalítica como a atividade específica para os extratos enzimáticos produzidos por autoindução foram superiores ao ensaio com uso do IPTG (dados referentes a esse estudo disponíveis na Tabela 7), indicando que houve uma melhor expressão quando o indutor foi a lactose. A atividade específica para o extrato lisado, produzido por autoindução, foi aproximadamente 6 vezes maior quando relacionamos com o extrato enzimático produzido com IPTG. Ambos os extratos obtidos foram purificados e caracterizados (atividade enzimática, concentração de proteínas e atividade específica).

Considerando, ainda, o alto custo associado ao uso do IPTG como indutor e os riscos de toxicidade nas células (DVORAK *et al.*, 2015), assim como a necessidade de monitoramento do processo para adição no tempo ideal (LU *et al.*, 2020), reforçamos os estudos para a produção da enzima L-arabinose isomerase pelo método de autoindução, visando a sua aplicação em condições a nível industrial.

Dessa forma, diante dos resultados explanados acima, a expressão da enzima por autoindução foi promissora e surge como uma alternativa para a substituição do indutor convencional, sendo o atual estudo o primeiro a verificar a produção de L-AI através do emprego do meio de autoindução.

5.1.2 Purificação dos extratos celulares

A purificação da enzima solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade com uso de suportes carregados com níquel (Ni^{2+}). Inicialmente, as proteínas foram retidas nas matrizes do metal. Os resíduos de histidina (His) da L-AI atuaram como doadores de elétrons e os íons metálicos existentes na coluna, como aceptores de elétrons (PESSELA, 2002), promovendo a purificação das proteínas. Os extratos enzimáticos foram, então, purificados com uso da coluna Ni-Sepharose 6 Fast Flow e as eluições realizadas com 250mM de imidazol. A concentração da eluição foi a mesma utilizada nos estudos de Manzo *et al.*, (2019) para a enzima L-AI.

A Tabela 8 exibe as frações obtidas em todas as etapas do processo de purificação.

Tabela 8- Frações resultantes das etapas de purificação da enzima solúvel (L-AI). Os extratos enzimáticos foram obtidos pelos métodos de indução (IPTG) e autoindução (lactose). A enzima encontrava-se em solução tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0 suplementada com 150 mM de NaCl.

Frações	Atividade Enzimática (U. mL ⁻¹)	Concentração de Proteínas (mg. mL ⁻¹)	Atividade Específica (U. mg ⁻¹)	Fator de Purificação	Área das Frações	Percentual Relativo (%)
AUTOINDUÇÃO						
Pico não retido	0,52±0,01	1,51±0,03	-	-	5.729.125	41,3
Lavagem	0,01±0,00	0,02±0,01	-	-	1.782.598	12,9
Enzima Purificada	0,75±0,01	0,50±0,01	1,5	2,42	13.858.075	100
IPTG						
Pico não retido	0,73±0,00	6,78±0,06	-	-	5.550.610	35,8
Lavagem	0,18±0,00	1,32±0,05	-	-	4.495.619	29,0
Enzima Purificada	1,62±0,01	4,85±0,06	0,33	3,3	15.524.714	100

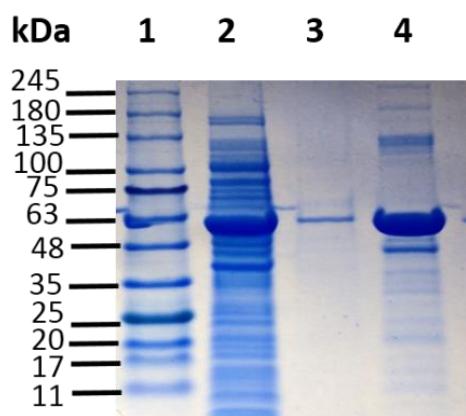
Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nos dados da Tabela 8, se avaliarmos, inicialmente, apenas as atividades específicas geradas nos extratos de L-AI purificados, observamos que houve um aumento expressivo das atividades específicas para os dois métodos, quando comparados aos extratos enzimáticos depois de lisados (Tabela 7). Como esperado, o extrato total após a lise contém, além das proteínas de interesse, proteínas inespecíficas. Quando os extratos brutos são submetidos às etapas de purificação, restam, em sua maioria, extratos ricos com a proteína recombinante, elevando, dessa forma, a atividade específica após a purificação. Isso também pode ser confirmado avaliando a concentração de proteínas identificadas antes e após a purificação.

O fator de purificação para a L-AI, obtida por indução, foi ainda maior quando comparado ao fator determinado pelo processo de autoindução. A atividade catalítica referente ao pico não retido ($0,52 \pm 0,01$ U.mL⁻¹), para o extrato produzido pelo método de autoindução, foi elevada. Isso sugere que parte da proteína de interesse não se ligou aos íons de níquel

disponíveis na coluna ou houve uma maior quantidade de proteínas oferecidas em relação à quantidade de metais disponíveis para as ligações, justificando, dessa forma, as altas concentrações de proteínas no pico não retido. Esses resultados corroboraram com o perfil eletroforético do pico não retido (raia 2) apresentado na Figura 11.

Figura 11- SDS-PAGE das frações referentes ao protocolo de purificação dos extratos enzimáticos produzidos por autoindução. **1.** Marcador de massa molecular. **2.** Pico não retido. **3.** Lavagem. **4.** Enzima purificada.

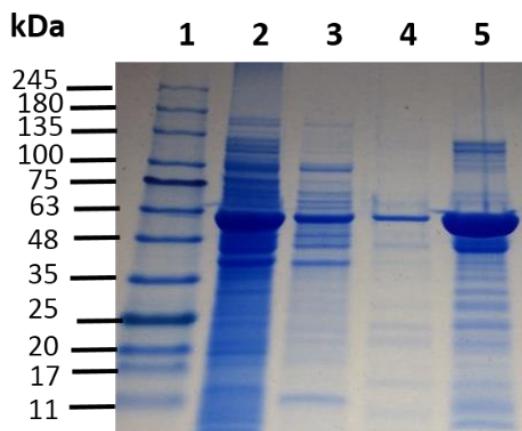


Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar (Figura 11) frações dominantes inerentes à proteína recombinante, em aproximadamente 56 kDa. A raia 2 mostra as frações disponíveis no pico não retido, e a Tabela 8 ratifica a presença da L-AI na amostra, apresentando em torno de 41% em relação à raia 4, relativa à fração mais expressiva, referente à amostra purificada. Para que não haja perda da proteína de interesse nessa etapa, os testes para a purificação dos extratos ainda necessitam ser otimizados, aumentando, por exemplo, a disponibilidade de íons metálicos na coluna.

As frações de L-AI produzidas com o uso do indutor convencional (IPTG), correspondentes às etapas de purificação, podem ser visualizadas na Figura 12, em que se observa sucesso na obtenção da proteína parcialmente purificada. Houve também perda de parte da proteína de interesse no pico não retido (raia 2).

Figura 12- SDS- PAGE das frações referentes ao protocolo de purificação dos extratos enzimáticos produzidos com adição de IPTG. **1.** Padrões de massa molecular. **2.** Pico não retido **3.** Lavagem 01 **4.** Lavagem 02 **5.** Enzima purificada.



Fonte: Elaborada pela autora.

As frações correspondentes ao perfil eletroforético da purificação das amostras produzidas com IPTG mostraram bandas dominantes em torno de 56 kDa. A raia 2, relativa ao pico não retido, também apresentou a enzima de interesse, assim como nos extratos produzidos pelo método de autoindução, confirmado pelo percentual relativo ao disponível na Tabela 8. As raias 3 e 4 correspondem às lavagens sucessivas realizadas na coluna, e a raia 5 corresponde à fração de maior área, como esperado, a proteína purificada. Em todas as raias, frações com massa molecular menores, em aproximadamente 48 kDa, que a L-AI também foram formadas.

Manzo *et al.* (2019) produziram e purificaram a enzima L-AI BL21 com atividade específica de $0,75 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$. Sousa (2015) purificou LAI- BL21 em suportes quelato de níquel, obtendo uma atividade específica de $0,092 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$. Felix (2017) purificou a proteína a partir do protocolo de adsorção em agarose e dessorção com lactose, atingindo uma atividade específica do extrato purificado de $0,090 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$. A produção da L-AI nesse estudo, pelo método de autoindução, foi a que apresentou a maior atividade específica, $1,5 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$, sendo uma alternativa promitente para produção heteróloga da proteína de interesse, visando a sua disponibilidade a nível industrial.

5.1.3 Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor nas etapas de expressão celular

O meio de cultivo, pelo protocolo de autoindução (ZYM-5052), é composto por três fontes de carbono e energia, incluindo o indutor. O emprego desse meio para a expressão

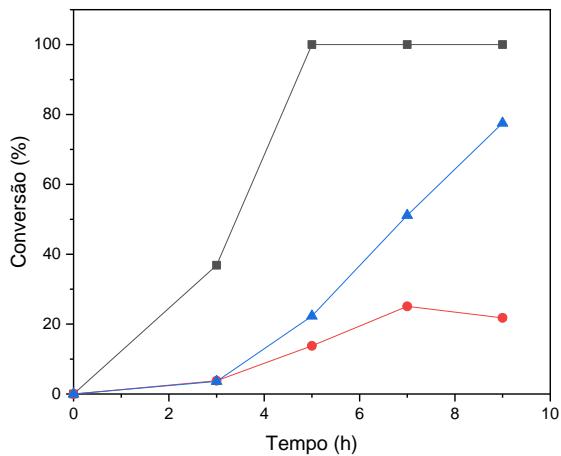
de proteínas heterólogas e o estudo das variáveis que o compõem foram descritas por Studier (2005).

O meio de cultura apresenta, dentre outros compostos, glicose, glicerol e lactose. O metabolismo das células bacterianas seleciona as fontes disponíveis, elevando a taxa de crescimento e a reprodução dos plasmídeos de expressão, resultando na produção da proteína recombinante.

Inicialmente, a fonte de carbono e de energia preferencial é encontrada na glicose. Dessa forma, há o aumento da densidade celular. Essa fonte de energia inibe a indução pela lactose (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; XU *et al.*, 2012). Quando a glicose é esgotada no meio, o glicerol passa a ser consumido. Essa fonte de energia não inibi a autoindução pela lactose e colabora com o crescimento na fase exponencial, atingindo altas densidades de células. A lactose atua então como fonte de carbono, energia e, como indutor, pela β -galactosidase, que converte a lactose em alolactose, indutor natural (STUDIER, 2005). Avaliar o comportamento e, consequentemente, o consumo dessas fontes, pode sugerir possíveis adaptações à metodologia, o que será relevante quando se almeja o aumento da expressão da L-AI e a redução dos custos do processo. Dessa forma, as concentrações de glicose, glicerol e lactose (indutor) foram estimadas durante todo o processo de expressão da enzima L-AI. Os sobrenadantes dos cultivos foram filtrados e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os tempos de retenção para glicose, glicerol e lactose foram identificados em 11,6 minutos, 16,6 minutos e 9,9 minutos, respectivamente.

A Figura 13 apresenta o perfil de consumo de glicose, glicerol e lactose durante a produção da L-AI. As concentrações iniciais de glicose, glicerol e lactose, foram respectivamente, 0,05%, 0,5% e 0,2%.

Figura 13- Perfil do consumo de (■) glicose, (●) glicerol e (▲) lactose analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 mostra o delineamento das fontes de carbono e do indutor, consumidos à medida que houve o crescimento celular e a expressão da enzima L-AI.

A concentração de glicose (■) se esgota entre 3 e 4h de cultivo, reafirmando ser essa a fonte de carbono preferencial. Quando avaliamos a Figuras 9, observamos que a fase exponencial teve início nas primeiras 3h. À medida que a glicose atinge o esgotamento, pequenas concentrações de lactose são consumidas. Se avaliarmos ainda a Figura 10 (raia 03), confirmaremos que, nas primeiras três horas de ensaio, não houve indução da proteína, uma vez que a glicose inibe o ciclo de adenosina monofosfato, impedindo que o *operon lac* seja induzido, ou seja, a glicose impediu a indução pela lactose, por um mecanismo conhecido por repressão catabólica (CROWLEY e RAFFERTY, 2019; GÖRKE e STÜLKE, 2008). Assim, na raia 3 da Figura 10, ainda não há expressão da enzima com 3h de cultivo, pois nesse tempo ainda é identificada a presença da glicose (Figura 13). Contudo, a partir da raia 4, com 5h de cultivo, observamos expressão da proteína recombinante correspondendo também ao início do consumo da lactose, notado na Figura 13.

A concentração de glicerol (●) foi minimamente alterada nas primeiras 3h de ensaio, sendo, então, a fonte de carbono secundária ou tardia. Notamos ainda que as concentrações de glicerol começam a decrescer mais expressivamente a partir de 3h de ensaio e chegam ao seu máximo em 7h de ensaio, apresentando uma diminuição de, aproximadamente, 25% em relação ao que foi oferecido inicialmente. Se avaliarmos o perfil do cultivo, na Figura 8, iremos observar que o aumento das taxas de crescimento celular se deu a partir de 3h de ensaio, chegando ao seu máximo em 7h e mantendo essa densidade de células até o final (9h),

atingindo a fase estacionária. Ao contrário da glicose, o glicerol não inibe a indução por lactose (STUDIER, 2005) e atua como a fonte de carbono que irá manter o sistema em condições propícias à indução. Contudo, com base nesse estudo, ao final do processo, restaram altas concentrações de glicerol no meio, sugerindo uma reavaliação da concentração de glicerol ofertada para a expressão por autoindução, em sistemas anaeróbios.

O glicerol é utilizado por ser uma fonte de carbono acessível, de baixo custo e muito empregada em cultivos sob condições aeróbias e anaeróbias (JUNIOR, 2013; HU e WOOD, 2010). Porém, em anaerobiose, a taxa de crescimento é mais baixa, quando comparada a ambientes aeróbios (HU e WOOD, 2010).

Um outro fator que, inicialmente, acreditava-se colaborar com o baixo consumo do glicerol, era o pH do meio de cultivo, uma vez que a fermentação do glicerol era favorecida apenas nas condições ácidas. Contudo, mesmo em ambientes alcalinos, é possível que o ocorra metabolismo dessa fonte de energia. Segundo Murarka *et al.*, 2008, a melhor condição para a fermentação do glicerol se dá em pH 6,3.

Nos cultivos para obtenção da L-AI, o pH final do meio de autoindução é 7,0. Contudo, a medida em que as fontes de carbono e energia são metabolizadas, o pH do sistema fica em torno de 6,5 (dados não apresentados), não prejudicando a produção da proteína de interesse e, favorecendo a faixa de pH considerada ideal para o metabolismo do glicerol.

Estudos sugerem, ainda, que em condições de anaerobiose, o glicerol só é metabolizado na presença de aceptores. Porém, com base nos estudos de Clomburg e Gonzalez (2013), mesmo na ausência de aceptores de elétrons, o glicerol é capaz de ser fermentado, pela *E. coli*, em condições anaeróbias. Dessa forma, podemos destacar que, o metabolismo do glicerol nas condições desenvolvidas em mesa agitadora (shaker), levou a um baixo consumo dessa fonte de carbono, quando comparamos o comportamento frente aos cultivos em condições aeróbias (Figura 18). Apesar da fermentação dessa fonte de energia ser possível em condições anaeróbias, as taxas de consumo são reduzidas.

Em relação ao consumo do indutor (\blacktriangle), nas primeiras 3h, deu-se o início do metabolismo da lactose. Pequenas frações do indutor podem ser metabolizadas mesma na presença do repressor (glicose). À medida que a glicose chega ao seu esgotamento, maiores concentrações de lactose passam a ser metabolizadas, o que permitiu a síntese da proteína de interesse, pelo processo de autoindução. No final do cultivo, cerca de 77% de lactose havia sido metabolizada.

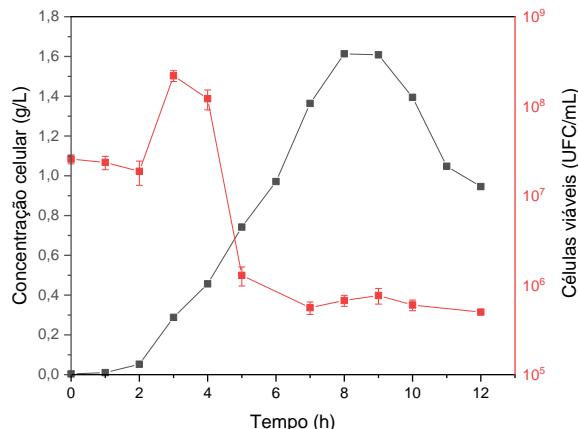
5.2 Produção da enzima em reator de bancada

5.2.1 Expressão, Purificação e Quantificação dos extratos de L-AI, alcançados pelo método de autoindução em biorreactor de bancada

Os estudos em biorreactor foram desenvolvidos a fim de avaliar condições favoráveis para o aumento da produção da enzima L-AI recombinante. Os ensaios foram desenvolvidos em biorreactor de 5L, com volume inicial de trabalho de 3L. O cultivo foi realizado pelo método de autoindução com uso da lactose comercial.

Na Figura 14, estão elucidadas as curvas de crescimento microbiano e a quantificação de células viáveis, representadas pelo logaritmo na base 10.

Figura 14 – Cinética de crescimento da proteína recombinante L-arabinose isomerase em biorreactor. Delineamento equivalente aos dados coletados em relação à concentração de células geradas (■) e ao número de células viáveis (■), durante 12h.



Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando, inicialmente, a concentração de células formadas (■) durante o cultivo, a primeira hora correspondeu à fase lag, observada pela ausência imediata de crescimento. Entre 1 e 2h, destacamos a fase de transição. Contudo, a partir de 2h, iniciou-se a fase exponencial, chegando ao seu fim em 8h. Entre 8 e 9h, foi atingida a fase estacionária e, a partir de 9h, o perfil foi caracterizado como a fase de declínio ou morte celular.

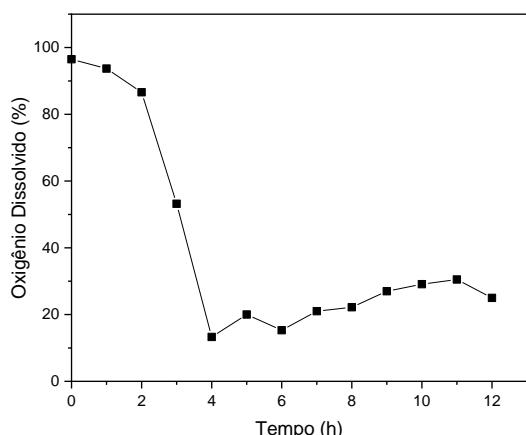
Se avaliarmos o número de células viáveis geradas durante a produção (■), nas primeiras 2h não há perfil de crescimento, como confirmada pela concentração celular. Em 3h, atingiu-se a fase de máxima produção de células viáveis ($2,2 \times 10^8$). Esse momento condiz com o consumo da fonte de carbono preferencial: glicose. Em 4h, houve uma diminuição da produção de células viáveis. Esse tempo correspondeu ao esgotamento da fonte de carbono

preferencial (dados apresentados em tópicos posteriores), justificando a queda na geração de novas células. Esse também foi o início da indução da proteína recombinante. Ainda em relação ao perfil formado pela quantidade de células viáveis, a partir de 5h, houve uma tendência ao equilíbrio, não havendo mais formação de células, permanecendo assim até o final do estudo (12h).

Para compreendermos o comportamento descrito pela quantificação de células viáveis formadas, e justificarmos o declínio e instabilidade, apresentadas entre 4-5h (■), sugerimos uma reavaliação do processo de análise. Além da contagem em placa, seria considerável a busca por metodologias que esclareçam e colaborem para uma melhor interpretação do perfil formado. Nesse momento, quando há o esgotamento da fonte de carbono preferencial e, início da fase exponencial de crescimento celular (■), pode ter acontecido perda da estabilidade do plasmídeo ou perda da viabilidade, quando se deu o início da expressão da proteína de interesse.

Em relação à demanda de oxigênio durante o cultivo, observamos, com base na Figura 15, que houve um decaimento nas primeiras 4h de ensaio, chegando a 13% de saturação. Isso significa que quase todo o fornecimento de oxigênio foi consumido e tornou-se insuficiente, levando ao esgotamento ainda durante o início da fase exponencial de crescimento celular, como apresentado na Figura 14 (■), correspondendo ao tempo de consumo da fonte de carbono preferencial: glicose. A partir de 4h, a taxa de aeração foi mantida estática (automático), visando ao suprimento de oxigênio, em torno de 20%, considerado suficiente para a manutenção do metabolismo celular (CHAN *et al.*, 2016). A vazão utilizada nos ensaios foi de $0,6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figura 15- Demanda de oxigênio dissolvido durante a produção da L-arabinose isomerase.

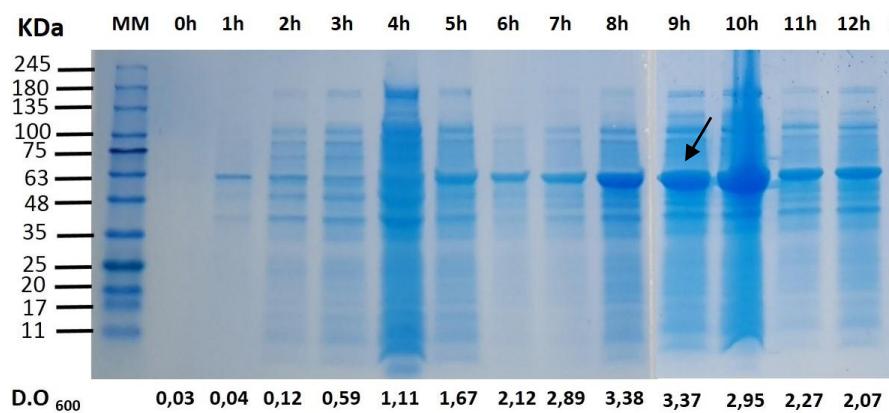


Fonte: Elaborada pela autora.

Nos estudos realizados por Studier (2005), foi mencionada a importância de cultivos na presença da aeração, uma vez que as taxas de oxigenação têm relevância com as altas taxas de crescimento celular, sobretudo na fase exponencial, sugerindo que culturas aeradas promovem elevadas expressões da proteína de interesse e, portanto, sua manutenção durante a produção é indispensável.

A Figura 16 mostra as frações correspondentes aos precipitados (*pellets*) coletados durante o cultivo da L-arabinose isomerase em biorreator.

Figura 16 – Produção da L-AI por *E. coli* em biorreator de bancada.



Fonte: Elaborada pela autora.

Com base no gel de eletroforese representado pela Figura 16, a expressão da enzima L-AI se deu a partir da primeira hora de cultivo. Apesar da fonte de carbono preferencial ser a glicose e está inibir o consumo da lactose e, portanto, impedir a indução, baixas concentrações de lactose podem ainda ser consumidas e, consequentemente, à medida que a glicose é esgotada no meio, há um intenso consumo da lactose, promovendo de forma efetiva a indução da proteína de interesse. Portanto, a partir de 1h, houve expressão da proteína em todas as amostragens avaliadas. A proteína de interesse está indicada por uma seta.

A Tabela 9 mostra as áreas equivalentes às frações e aos seus respectivos percentuais frente à expressão da L-AI.

Tabela 9 - Área das frações de L-arabinose isomerase e percentual correspondentes à produção com uso do meio de autoindução em biorreator.

Tempos de amostragem (h)	Área das Frações	Percentual Relativo (%)
0	0	0
1	1619477	16,3
2	2128569	21,4
3	2099497	21,1
5	3560347	35,8
6	3751690	37,7
7	5462368	54,9
8	7845966	78,8
9	9956007	100
10	5797953	58,2
11	5684430	57,1
12	5760459	57,9

Fonte: Elaborada pela autora.

Os melhores tempos de produção da L-AI, em biorreator, foram com 8 e 9h, confirmados através do percentual relativo, com uso do software ImageJ, como na Tabela 9. Os tempos entre 10 e 12h mantiveram o percentual acima de 57%. Com isso, as amostras referentes aos pontos 8, 10 e 12h foram lisadas, caracterizadas e, em seguida, purificadas por Cromatografia de Afinidade com uso de Ni^{2+} . Os extratos enzimáticos foram mensurados quanto à atividade enzimática (U. mL^{-1}), concentração de proteínas (mg. mL^{-1}) e atividade específica (U. mg^{-1}), como apresentados na Tabela 10.

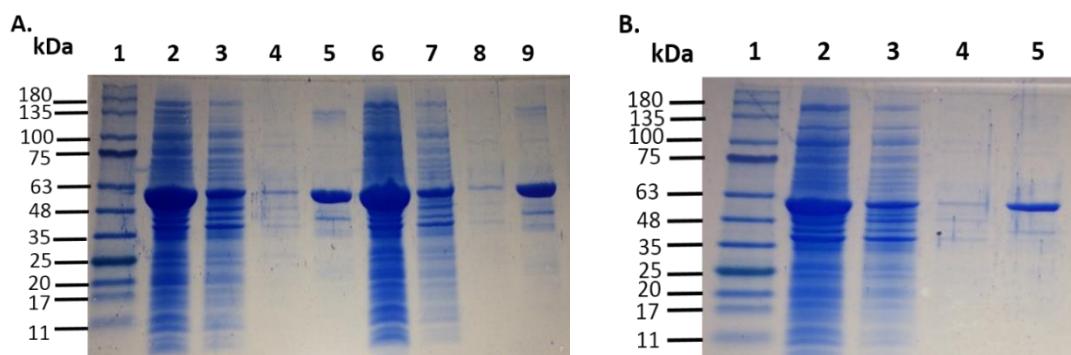
Tabela 10- Atividade dos extratos lisados de L-arabinose isomerase produzidos por *E. coli* BL21 (DE3) em biorreator.

Extratos de L-AI em relação ao tempo de expressão (h)	Atividade Enzimática (U.mL^{-1})	Concentração de Proteínas (mg. mL^{-1})	Atividade Específica (U.mg^{-1})
8	$3,0 \pm 0,04$	$1,6 \pm 0,10$	1,90
10	$2,0 \pm 0,04$	$4,6 \pm 0,14$	0,43
12	$1,7 \pm 0,03$	$4,9 \pm 0,05$	0,35

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 10 mostra os valores das atividades específicas dos extratos de L-arabinose isomerase. Pode-se concluir que, a maior atividade específica, ou seja, o extrato que apresentou a maior concentração da proteína de interesse, foi o obtido com 8h de produção. Os valores das atividades específicas para os extratos com 10 e 12 horas foram aproximados. As amostras foram ainda purificadas e os perfis proteicos das etapas de purificação representados pela Figura 17.

Figura 17- Purificação dos extratos de L-AI a partir de Cromatografia de Afinidade. **A.** **1.** Marcador de massa molecular **2.** Extrato enzimático com 8h cultivo **3.** Pico não retido na coluna (8h) **4.** Etapa de Lavagem (8h) **5.** Enzima purificada (8h) **6.** Extrato enzimático com 10h de cultivo **7.** Pico não retido na coluna (10h) **8.** Etapa de lavagem (10h) **9.** Enzima purificada (10h) **B.** **1.** Marcador de massa molecular **2.** Extrato enzimático com 12h de cultivo **3.** Pico não retido na coluna (12h) **4.** Etapa de lavagem (12h) **5.** Enzima purificada com 12h de cultivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

As raias 2 e 6 A. e 2 B. mostram que houve expressão efetiva da proteína recombinante L-AI, correspondendo aos extratos lisados. As raias 3 e 7 A. e 3 B. revelam que parte da enzima de interesse não ficou retida na coluna, sendo então coletadas e investigadas as

atividades e o percentual relativo (%). As raias apresentaram, ainda, frações que correspondem a outras proteínas de diferentes massas moleculares. Raias 5 e 9 A. e 5 B. mostram frações relativas às enzimas purificadas nos tempos de 8, 10 e 12h, respectivamente.

Se equipararmos as raias 2 e 5A, 6 e 9A e 2 e 5B, a purificação dos extratos enzimáticos foi efetiva, uma vez que observamos uma redução da presença de proteínas contaminantes, e destacamos as frações identificadas em torno de 56kDa. Uma fração menos intensa é constatada em torno de 48kDa, para todos os casos.

Os extratos purificados foram caracterizados e seus resultados se encontram na Tabela 11. A proteína de interesse possui massa molecular em torno de 56 kDa (Figura 17).

Tabela 11- Análise das frações coletadas durante a purificação dos extratos de L-arabinose isomerase. As frações correspondem as amostras analisadas nos tempos de 8, 10 e 12h.

Frações	Atividade Enzimática ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentração de Proteínas ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Atividade Específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Fator de Purificação
8h				
Pico não retido	$0,1 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,00$	0,13	-
Lavagem	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	0,0	-
Enzima Purificada	$0,5 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,02$	1,3	0,7
10h				
Pico não retido	$0,1 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,01$	0,08	-
Lavagem	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	0,0	-
Enzima Purificada	$0,5 \pm 0,00$	$0,5 \pm 0,05$	1,0	2,3
12h				
Pico não retido	$0,1 \pm 0,00$	$1,5 \pm 0,05$	0,06	-
Lavagem	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	0,0	-
Enzima Purificada	$0,4 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,01$	1,0	2,8

Fonte: Elaborada pela autora.

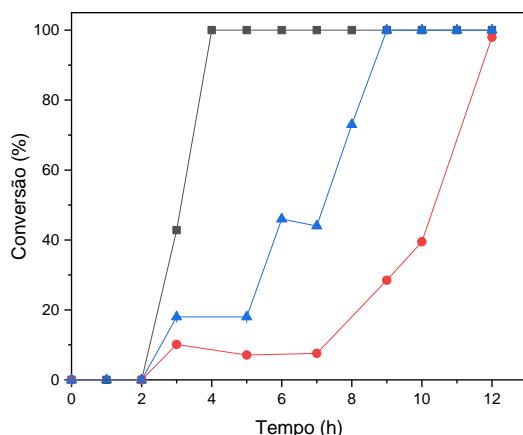
O extrato purificado referente à amostra de 8h apresentou a maior atividade específica quando equiparado com as demais amostras do estudo. Contudo, na etapa que corresponde ao pico não retido, parte da proteína alvo, presente no extrato lisado, não ficou retida na coluna. Apesar desse comportamento ter sido identificado nas demais amostras (10 e 12h), o extrato produzido com 8h era o que mais possuía a proteína de interesse e foi o que menos reteve a L-AI. Portanto, grande parte da proteína foi coletada no pico não retido. A atividade específica do pico não retido foi, para a amostra avaliada com 8h, aproximadamente, 1,6 vezes maior que a fração coletada para a amostra correspondente ao tempo de 10h e 2,16 vezes maior que a amostra referente ao tempo de 12h.

Em relação ao fator de purificação, que corresponde ao aumento da atividade específica após a etapa de purificação, as amostras analisadas nos tempos de 10 e 12h foram as que alcançaram os maiores valores, indicando que houve uma eficiente purificação dos extratos.

As fontes de carbono e o indutor, disponíveis na composição do meio de cultivo, estão correlacionadas com o comportamento relativo do metabolismo das células, crescimento e expressão da proteína de interesse. Portanto, é importante a realização de um estudo que possa mensurar o consumo desses compostos em relação ao tempo de cultivo, identificando se o processo necessita da adição de nutrientes em concentrações maiores ou, se ao finalizar o ensaio, há um excesso de componentes não metabolizados no meio.

Os resultados relativos ao consumo de glicose, glicerol e lactose, mensurados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, são mostrados na Figura 18.

Figura 18- Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor, disponíveis para a produção de L-arabinose isomerase em biorreator de bancada. A glicose, o glicerol e a lactose estão representadas, respectivamente por (■), (●) e (▲).



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação ao perfil de consumo das fontes de carbono e do indutor, confirmamos que a glicose é a fonte prioritária. Nas primeiras 2h, há um consumo mínimo de glicose, apresentando uma depleção acentuada, de 57,2%, entre duas e três horas. Esse composto inibe o consumo de lactose, confirmado pelo perfil em azul (▲). Logo, nas primeiras 3h, não há a produção relevante da enzima. Com 4h de experimento, observa-se o esgotamento total da glicose (■). Nesse momento, o glicerol (●), fonte de carbono secundária, tem seu consumo em torno de 10%, permanecendo até 7h. No final da produção, 98% do glicerol oferecido no meio havia sido consumido.

A lactose (▲), que atua como indutor para a expressão da proteína alvo, passa a ser metabolizada a partir de 3h, quando mais de 50% de glicose havia sido metabolizada. Mesmo a glicose promovendo a repressão catabólica da lactose, pequenas concentrações de lactose podem ser utilizadas, não promovendo a expressão em níveis desejáveis. Com 8h de análise, 73% de lactose havia sido utilizada. A partir de 9h de cultivo, a lactose foi esgotada.

Se realizarmos um comparativo da produção em frascos agitados com os ensaios em biorreator, quando o parâmetro da aeração foi adicionado, os perfis de consumo da fonte de carbono secundária foram semelhantes, considerando até o período de 9h. Nas duas condições, o metabolismo do glicerol, presente no meio (reator), foi em torno de 71%, em relação ao oferecido no início do ensaio, e em shaker, 76%. A lactose foi esgotada, no mesmo período, nos ensaios em reator e em mesa agitadora.

Como relatado nos estudos de Studier (2005), quanto maior for a taxa de aeração nas reações, mais lactose é necessária para a indução da proteína recombinante. Assim, estudos posteriores deverão ser realizados para uma análise da melhor condição fornecida de oxigênio, possível alimentação de indutor (batelada alimentada) e redução de glicerol, para as produções da enzima L-arabinose isomerase, visto que, quando a aeração foi adicionada ao processo, a fonte de indução foi esgotada antes do final do cultivo.

5.3 Avaliação do emprego de soro de leite para expressão da recombinante L-AI por autoindução em frascos agitados

Esse tópico tem como fim avaliar os estudos da produção dos extratos enzimáticos de L-arabinose isomerase, utilizando a lactose presente no soro de leite como componente indutor para o meio de autoindução ZYM-5052.

A proposta para a substituição do IPTG por lactose comercial e, agora, o emprego da lactose presente no soro de leite como indutor para a expressão de proteínas heterólogas

mostra-se como um avanço em relação aos métodos anteriormente adotados e otimizados, sobretudo, quando se avalia os possíveis tratamentos necessários para o descarte responsável desse resíduo, ou como uma nova alternativa de aplicação, agregando valor à produção, destacando sua eficiência como indutor para a expressão de proteínas.

Serão abordados, ainda, a influência das concentrações de lactose, o melhor tempo para a expressão da L-AI, a purificação dos extratos de L-AI e a quantificação das fontes de carbono e do indutor durante o cultivo.

5.3.1 Estudo da concentração de lactose do soro do leite para a expressão de L-AI recombinante em frascos agitados

O soro de leite é considerado um subproduto da indústria de laticínios. Quando descartados de forma indevida, por ser rico em matéria orgânica, podem gerar grandes prejuízos ao ambiente, resultando em altos níveis de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de oxigênio (DQB) (FERNANDEZ-GUTIERREZ, 2017). Contudo, visando à diminuição dos custos associados aos tratamentos adequados para o descarte, outras formas de aproveitar esse resíduo têm se dado, como através da simbiose industrial, permitindo que subprodutos de um setor possam ser utilizados como matéria-prima em outros setores.

O soro de leite apresenta em sua composição grandes concentrações de proteínas, vitaminas, minerais e lactose. O primeiro trimestre de 2020 contou com a produção de 6.300.048L de leite industrializados (IBGE, 2020). Diante do volume de leite industrializado e dos possíveis subprodutos relacionados à produção, torna-se ainda mais relevante o aproveitamento dessa fonte de carbono e de indutor barato, capaz de diminuir os custos associados aos processos (SABO *et al.*, 2019).

Dessa forma, investigou-se a aplicação do soro de leite como indutor alternativo para expressão da enzima L-arabinose isomerase. Essa alteração na formulação dos meios de autoindução não apenas colaborou com a inovação nos processos biotecnológicos, para a produção de enzimas heterólogas, reduzindo custos operacionais, bem como acrescentou soluções aos problemas relacionados aos transtornos ambientais gerados quando eliminados de forma errônea.

Inicialmente, para utilizarmos o soro de leite como indutor no *open lac*, foram necessários analisar maiores concentrações de lactose, avaliando a que melhor expressaria a proteína de interesse. Por não termos empregado um permeado de soro, além da lactose, o soro de leite apresenta em sua composição outros componentes que poderiam interferir na expressão

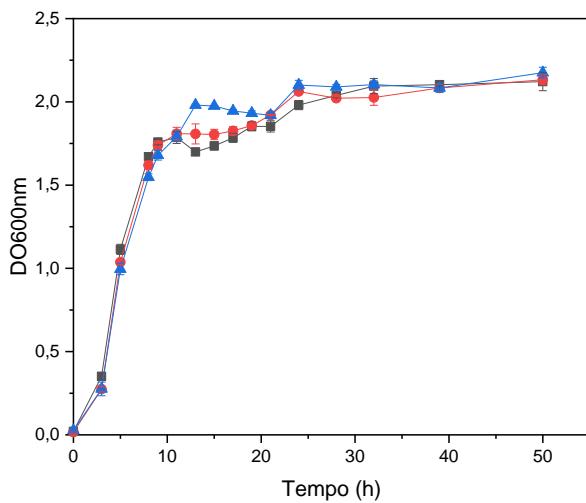
da proteína de interesse. Dessa forma, esse estudo conta com duas novas concentrações de indutor, 4 e 8g.L⁻¹.

O soro de leite, passou inicialmente por um tratamento com uso de ácido láctico (ALBUQUERQUE, 2018; LIMA *et al.*, 2013), uma vez que o substrato é rico em proteínas e essas tendem a formar precipitados, interferindo na mistura reacional e nas leituras das amostras.

O soro, depois de pré-tratado, foi filtrado, e a quantificação de lactose foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com uso da coluna HPX-87H, apresentando a concentração de 12g.L⁻¹ de lactose. A partir dessa informação, foram realizados ensaios com 3 diferentes concentrações de lactose (2g.L⁻¹, 4g.L⁻¹ e 8g.L⁻¹), a partir do soro do leite como suplemento para o meio ZYM- 5052.

A Figura 19 mostra a cinética de crescimento em função do tempo de cultivo, utilizando a *E. coli* BL21 (DE3). Os ensaios foram analisados durante 50h.

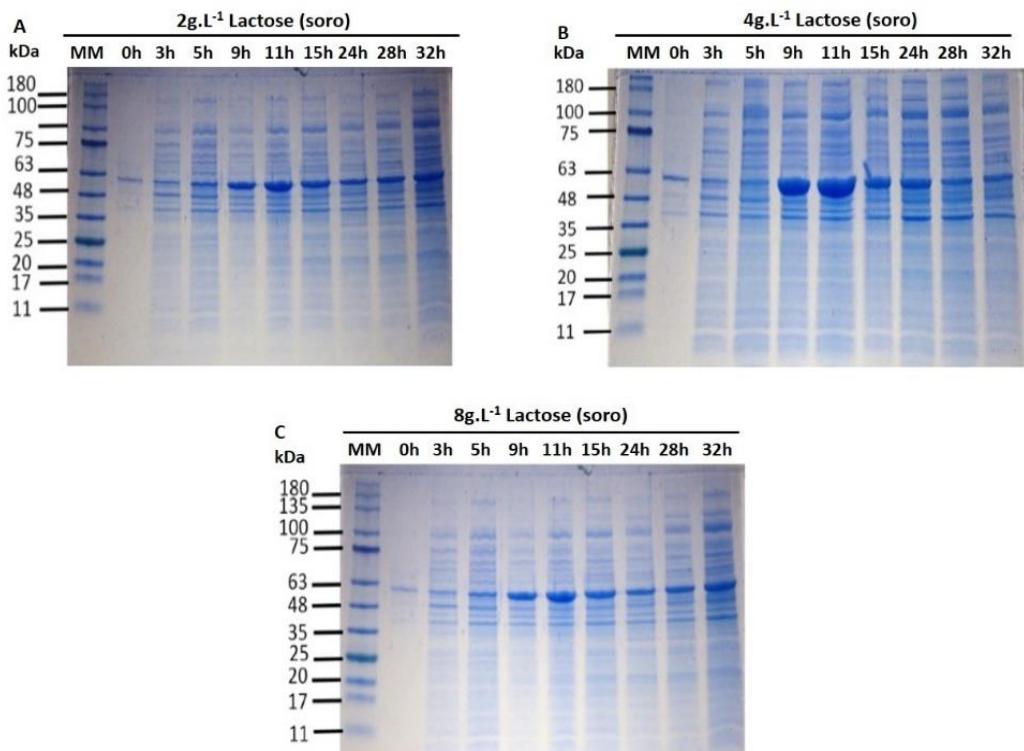
Figura 19- Perfil de crescimento celular da cepa BL21(DE3) em diferentes concentrações de indutor para expressão da proteína L-arabinose isomerase. (■) 2g.L⁻¹, (●) 4 g.L⁻¹ e (▲) 8 g.L⁻¹ de lactose.



Fonte: Elaborada pela autora.

A cinética de crescimento celular, para as 3 condições em estudo, exibiu perfis semelhantes durante a fase log e na fase estacionária. Amostras foram coletadas, durante o crescimento celular, e analisadas por eletroforese, como mostra a Figura 20 (A, B e C).

Figura 20- Perfis de expressão da L-arabinose isomerase produzidos pelo método de autoindução usando lactose derivada do soro de leite. A, B e C correspondem às concentrações de 2, 4 e 8g.L⁻¹ de lactose, respectivamente.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nas três condições apresentadas pela Figura 20, podem ser observadas frações de proteínas em torno de 56kDa, correspondendo à expressão da L-arabinose isomerase.

As frações que melhor expressaram a proteína alvo foram identificadas nos tempos de 9h e 11h, similares à produção em frascos agitados com o meio de autoindução ZYM - 5052, utilizando lactose comercial como indutor. As áreas e o percentual relativo referentes às bandas formadas foram calculadas com uso do software ImageJ e encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12- Áreas correspondentes as bandas de L-AI e percentual relativo à produção da proteína, nas concentrações de 2, 4 e 8g.L⁻¹ de lactose (soro), avaliadas com o emprego do software ImageJ.

Tempos de amostragem (h)	2 g.L⁻¹ Lactose (soro)		4 g.L⁻¹ Lactose (soro)		8 g.L⁻¹ Lactose (soro)	
	Área	Percentual (%)	Área	Percentual (%)	Área	Percentual (%)
3	1.380.698	32	1.280.870	18	1.201.577	23
5	1.825.941	43	1.281.234	18	1.938.012	38
9	4.006.891	93	6.767.125	96	4.360.184	85
11	4.295.154	100	7.017.196	100	5.113.690	100
15	3.693.719	86	2.636.790	38	3.664.548	72
24	2.517.941	59	2.787.033	40	2.217.577	43

Fonte: Elaborada pela autora.

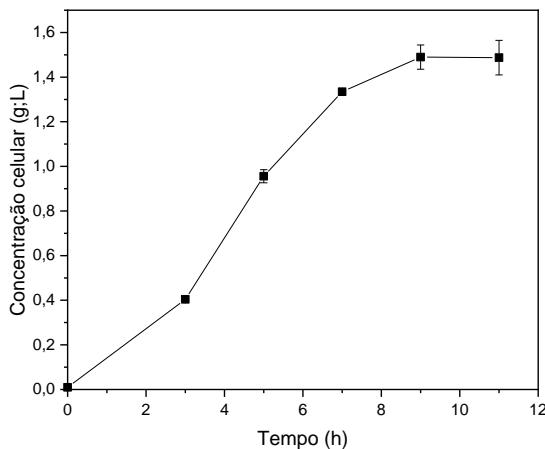
Com base nos ensaios iniciais, o melhor tempo para a expressão da L-AI, utilizando soro de leite como fonte de indução (lactose), foi após 11h de cultivo, empregando uma concentração de 4g.L⁻¹.

5.3.2 Expressão da L-AI por autoindução com soro de leite contendo 4g.L⁻¹ de lactose

Com as condições de cultivo definidas para a expressão da L-AI, a produção com uso do soro pré-tratado foi caracterizada em relação à concentração de proteínas, atividade catalítica e perfil eletroforético (SDS-PAGE Tricina). A metodologia de rompimento das células foi otimizada, visando a uma maior extração das proteínas formadas. Com isso, cada amostra foi rompida, em banho de gelo, 3 vezes ao invés de 1, como nos processos anteriores. Essa alteração resultou em extratos mais enriquecidos de L-AI.

A Figura 21 mostra o perfil de crescimento celular acompanhado durante 11h.

Figura 21- Perfil de crescimento das células para expressão da enzima L-AI em meio de autoindução com soro de leite com concentração de lactose equivalente a 4g.L^{-1} .



Fonte: Elaborada pela autora.

A fase exponencial de crescimento do microrganismo (fase log) foi identificada nas primeiras 7h. Em 9h, atingiu seu nível máximo de crescimento, estabilizando em 11h.

Para confirmarmos a produção da proteína alvo, os ensaios de atividade catalítica, concentração de proteínas e atividade específica foram investigados (Tabela 13).

Tabela 13- Caracterização dos extratos produzidos com uso do meio ZYM- 5052, suplementados com soro de leite na concentração de 4g.L^{-1} de lactose, com 11h de ensaio.

Amostras (h) (lactose - soro)	Atividade Enzimática (U.mL^{-1})	Concentração de Proteínas (mg. mL^{-1})	Atividade Específica (U.mg^{-1})
11	$3,8 \pm 0,00$	$7,08 \pm 0,06$	0,53

Fonte: Elaborado pela autora.

Os extratos enzimáticos exibiram atividades, catalítica e específica, superiores quando confrontadas com as atividades alcançadas na produção com o uso do IPTG ($0,1\text{ U.mg}^{-1}$) e próxima à atividade específica quando a lactose comercial foi inserida como indutor ($0,62\text{ U.mg}^{-1}$). O extrato enriquecido de L-AI apresentou, aproximadamente, 5 vezes mais a enzima de interesse quando comparado ao extrato produzido com a adição do IPTG no cultivo.

Estudos envolvendo a produção biotecnológica de extratos enzimáticos com uso de soro de leite foram desenvolvidos em inúmeras pesquisas. Lima *et al.*, (2013) avaliaram a produção da enzima β - galactosidase a partir do uso do soro de leite. Albuquerque (2018) utilizou soro de leite pré-tratado com ácido láctico para a produção enzimática de lactulose.

Panesar *et al.*, (2007) avaliaram diferentes técnicas para obtenção de ácido lático a partir do emprego de soro de leite.

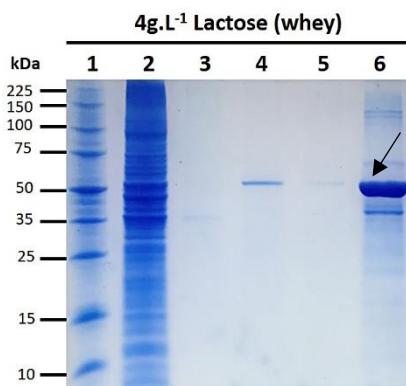
Apesar do aproveitamento do soro de leite, em processos biotecnológicos, não ser considerado uma etapa inédita, o emprego da lactose, disponível no soro de leite e utilizada como agente indutor para a expressão heteróloga da enzima L-arabinose isomerase, foi inovador.

Se correlacionarmos as 3 estratégias para a expressão da L-AI (IPTG, AI e AI com soro de leite), podemos afirmar que as metodologias desenvolvidas pelo método de autoindução apresentaram atividades específicas superiores às encontradas quando o IPTG foi o indutor, indicando que a substituição do IPTG por lactose, seja comercial ou beneficiada de soro de leite, foi bem-sucedida.

5.3.3 Purificação dos extratos de L-arabinose isomerase obtidos com uso do soro de leite como agente de indução

Os extratos de L-AI, induzidos com 4g.L^{-1} de lactose (soro), foram submetidos a etapa de purificação por cromatografia de afinidade, com uso da coluna Ni-Sepharose 6 Fast Flow. As etapas inerentes à purificação estão representadas pela Figura 22 por SDS-PAGE Tricina e foram analisadas pelo software ImageJ (Tabela 15).

Figura 22- Eletroforese em gel de Tricina das amostras coletadas durante a purificação dos extratos de L-AI (11h). **1.** Marcador de massa molecular **2.** Pico não retido na coluna **3.** Solução de lavagem **4.** Pós eluição **5.** Solução de limpeza (500mM imidazol) **6.** Enzima purificada.



Fonte: Elaborada pela autora.

A raia 2 revela a fração correspondente ao pico não retido na coluna, ou seja, proteínas que apresentam diferentes massas moleculares, não equivalendo, com relevância, à

L-AI. A raia 3 corresponde à solução de lavagem. Como esperado, não há presença da enzima de interesse nesse ponto da purificação. Na raia 4, é identificada uma fração em torno de 56kDa, equivalente a possíveis traços da proteína L-AI presentes na solução pós eluição, ou seja, nas amostras subsequentes à coleta da enzima purificada. Em 5, a solução de 500 mM de imizadol é analisada e, em 6, a enzima purificada pode ser observada (indicada pela seta). As atividades relativas às etapas de purificação podem ser visualizadas na Tabela 14.

Tabela 14- Análise das etapas de purificação dos extratos de L-AI obtidos por cultivos, usando lactose derivada do soro de leite como indutor no *operon lac*.

Frações	Atividade Catalítica (U.mL ⁻¹)	Concentração de Proteínas (mg. mL ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação
Extrato Enzimático	3,8 ±0,00	7,08 ±0,06	0,54	1
Pico não retido	0,08 ±0,00	1,96 ±0,06	0,040	-
Lavagem	0,00 ±0,00	0,02 ±0,00	0,00	-
Enzima Purificada	2,08 ±0,01	0,87 ±0,02	2,39	4,42

Fonte: Elaborada pela autora.

A atividade específica da enzima purificada foi 4,42 vezes maior que a do extrato enzimática após a lise. De todos os estudos confrontados nessa investigação, esse foi o extrato que apresentou a maior quantidade da proteína de interesse.

Nos estudos alcançados por Felix (2017), os extratos de LSLt- L-AI foram purificados por dessorção em lactose, alcançando um fator de purificação de 2,57. Sousa (2015), purificou a L-AI BL21 em Ag-IDA-Ni, atingindo um fator de purificação de 2,63.

A Tabela 15 mostra as áreas das frações de L-AI, identificadas pelo software ImageJ, e seus respectivos percentuais.

Tabela 15- Áreas das frações de L-AI identificadas nas etapas de purificação usando soro de leite como agente de indução.

4g.L⁻¹ Lactose (soro de leite)		
Frações coletadas - Purificação	Áreas	Percentual Relativo (%)
Enzima Purificada	15570974	100
Pico não retido	1175477	7,55
Solução de limpeza (500mM imidazol)	196021	1,26
Pós eluição	1413406	9,08

Fonte: Elaborada pela autora.

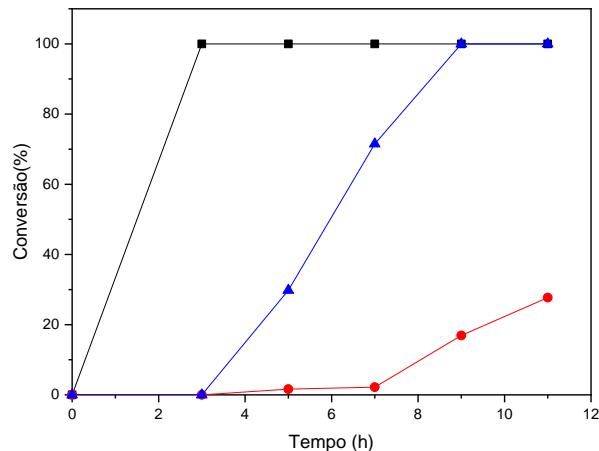
Na Tabela 15, os extratos de L-AI, na sua condição purificada, alcançaram as maiores áreas, como esperado, uma vez que a solução contém as maiores concentrações da enzima de interesse. Diferente dos dados lidos de pico não retidos nas outras amostras avaliadas nesse estudo, para as purificações dos extratos obtidos quando a lactose do soro de leite foi utilizada, as soluções apresentaram pouca proteína de interesse, o que pode ter levado a um aumento da obtenção de proteína purificada em relação aos ensaios anteriores, quando parte da proteína alvo era encontrada nas amostras não retidas na coluna.

5.3.4 Perfil do consumo das fontes de carbono e indutor (lactose presente no soro de leite) nas etapas de expressão celular

As produções utilizando soro de leite como fonte de lactose, para a indução das proteínas alvo, promoveram boas expressões com 11h de ensaio, atingindo elevadas atividades catalíticas. Contudo, apesar das boas condições alcançadas nas investigações, foi necessária uma avaliação em relação ao consumo das fontes de carbono e do indutor, disponíveis no meio de cultivo. Apesar de a concentração do indutor ter sido definida inicialmente, nesse tópico, a investigação dos demais componentes revelará se serão necessárias maiores concentrações dessas fontes durante o cultivo, aspirando à obtenção de extratos mais ricos de L-AI.

A Figura 23 mostra o perfil do consumo da glicose, glicerol e lactose, disponíveis no meio de cultivo, pela *E. coli* BL21 (DE3) de *Enterococcus faecium*.

Figura 23- Consumo de glicose, glicerol e lactose em relação ao tempo de cultivo para a expressão de L-arabinose isomerase. A glicose, o glicerol e a lactose estão representadas, respectivamente por (■), (●) e (▲).



Fonte: Elaborada pela autora.

A glicose, como fonte de carbono preferencial, é consumida inicialmente e esgotada nas primeiras 3h de ensaio (■). Essa fonte de carbono é responsável pelo início da fase exponencial de crescimento das células (Figura 21). Quando essa é esgotada, as concentrações de lactose (indutor) passam a ser metabolizadas mais intensamente. É interessante avaliar maiores concentrações de glicose no meio, visando à extensão da fase exponencial e geração de maiores concentrações de células, com o objetivo de maximizar o rendimento no final do cultivo. Contudo, quando são adicionadas altas concentrações de glicose no meio, essas podem levar à formação de ácidos, gerados pelo metabolismo da glicose. Se a cultura se tornar ácida o suficiente para ultrapassar a capacidade de tamponamento do meio, o pH do cultivo diminui a ponto de cessar o crescimento. Portanto, devem ser realizados estudos com gradientes de concentrações de glicose não ultrapassando 1% no meio, visto que essa concentração é alta o suficiente para impedir o crescimento e interferir na indução da proteína de interesse (STUDIER, 2005). O pH de todos os ensaios realizados nessa tese foram lidos (registrados), não sendo necessário o controle (adição de base) no meio (dados não apresentados).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono secundária ou tardia e sustentará a fase exponencial, mantendo a concentração das células. Essa fonte de carbono não inibe o metabolismo da lactose, podendo ambas serem metabolizadas concomitantemente.

O consumo do glicerol só foi observado a partir de 5h de cultivo, em baixas concentrações (1,66%). Com 9h, apenas 16,9% havia sido metabolizado, e, em 11h, final do

estudo, as concentrações de glicerol presentes no meio foram de 72,3%, ou seja, apenas 23,7% dessa fonte de carbono foi metabolizada. Isso indica que menores concentrações de glicerol devem ser testadas, uma vez que mais da metade do componente ainda se encontra presente no final do processo, de forma que essa concentração, para cultivos em condições anaeróbias, foi desnecessária.

É válido mencionar que, quando há aeração forçada no sistema, há também um maior consumo dos nutrientes disponíveis. Logo, para este caso, em que os ensaios foram realizados em mesa agitadora, a concentração de glicerol oferecida poderia ter sido menor quando relacionada à concentração de glicerol presente nos cultivos em biorreator, onde houve controle da aeração.

Em relação ao metabolismo da lactose, o consumo pode ser percebido com 5h de ensaio (29,8%). Em 7h de cultivo, 71,6% da lactose disponível havia sido consumida, esgotando nas horas seguintes.

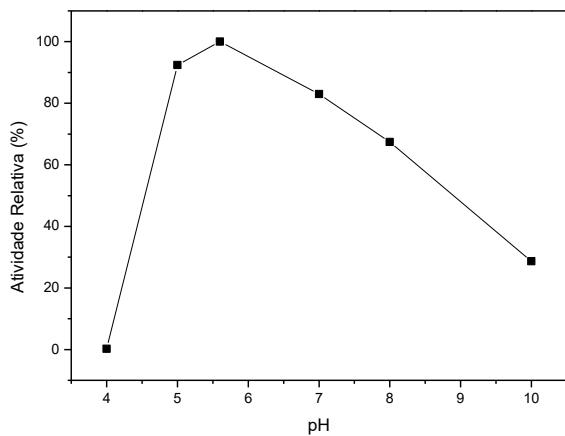
Para esse estudo, mesmo o meio dispondo de maiores concentrações de lactose em relação aos estudos desenvolvidos por Studier (2005), houve o esgotamento do indutor durante o processo. Uma sugestão, caso maiores concentrações de glicose sejam oferecidas ao processo, é que maiores concentrações de indutor (lactose do soro de leite) devem estar disponíveis no meio ou adicionadas durante a produção, garantindo a presença de indutor suficiente para ser metabolizado, gerando maiores rendimentos na produção.

5.4 Caracterização da enzima L-AI purificada

5.4.1 Efeito do pH na atividade catalítica

O pH ótimo foi determinado a partir da reação enzimática, com um volume constante de enzima nos meios reacionais e pHs nas faixas 4,0, 5,0, 5,6, 7,0, 8,0, e 10, todos preparados na presença de 1 mM de MnCl₂. As atividades foram explanadas por atividade relativa, considerando 100% a de maior atividade catalítica. O perfil resultante da relação pH e atividade enzimática pode ser avaliado na Figura 24.

Figura 24- Efeito do pH na atividade catalítica dos extratos de L-AI produzidos pelo método de autoindução. Ensaio realizado nas condições padrão (50°C , 60 minutos).



Fonte: Elaborada pela autora.

A L-AI apresentou maior atividade enzimática nos pHs 5,6 e 5,0, seguido do pH 7,0, com atividades relativas de 100%, 92,4% e 83%, respectivamente. A atividade no pH ótimo, definida como 100%, foi de $3,5 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$.

Nos estudos de Sousa (2015), a enzima L-AI recombinante expressa em *E. coli* apresentou um perfil semelhante, com decréscimo da atividade em relação ao aumento do pH no tampão reacional. Cheng, Mu e Jiang (2010) e Xu *et al.*, (2011) destacaram em seus estudos a importância de se utilizar pHs levemente ácidos a nível industrial, uma vez que reduzem efeitos indesejáveis aos produtos, como o escurecimento e a formação de subprodutos, e, com isso, geram menos custos ao processo. Esses autores também identificaram que a L-AI isolada de *Bacillus stearothermophilus* IAM 1100, expressa em *E. coli* BL21, se apresentou mais estável em perfis de pH mais ácido.

Zhang, Jiang e Pan (2006) submeteram a enzima L-arabinose isomerase em reações com pHs variando entre 3 a 10. A máxima atividade foi encontrada a pH 7,0, e quase não havia atividade catalítica em pH 3 ou pHs acima de 10. Nos ensaios realizados por Rhimi *et al.*, (2010), as melhores conversões em D-tagatose com emprego da L-arabinose isomerase ocorreram quando se utilizou faixas de pH variando entre 5 a 7.

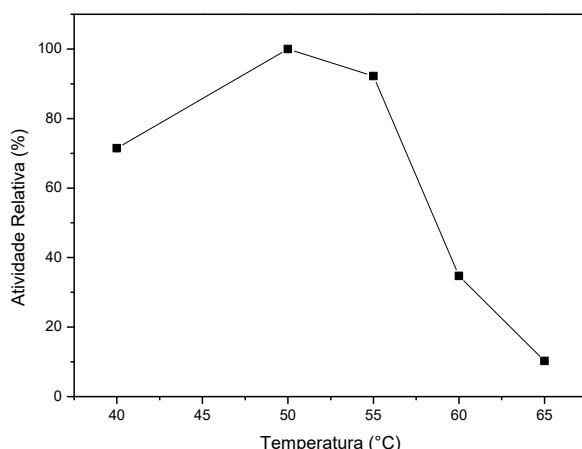
As alterações na atividade em relação ao pH, como na Figura 24, podem estar relacionadas ao comportamento do arranjo referente à posição dos resíduos de histidina em relação ao organismo hospedeiro (SOUZA, 2015). Podem, ainda, estar associadas às pequenas distorções na conformação da enzima que provocam modificações nas características da mesma (SANTOS, 2015).

5.4.2. Efeito da temperatura (°C) na atividade catalítica

Os estudos para identificação da melhor temperatura para a reação de conversão de D-galactose em D-tagatose foram realizados a partir dos ensaios padrão para as atividades catalíticas.

A estabilidade da enzima L-arabinose isomerase purificada foi avaliada nas temperaturas entre 40°C a 65°C, durante 60 minutos. A Figura 25 mostra o efeito da temperatura na atividade enzimática da L-AI.

Figura 25- Efeito da temperatura na atividade catalítica dos extratos de L-AI produzidos pelo método de autoindução.



Fonte: Elaborada pela autora.

A máxima atividade foi alcançada na temperatura a 50°C ($3.0 \pm 0,00 \text{ U.mL}^{-1}$). A 55 °C, a enzima manteve 92% da sua atividade. A 60°C, houve perda da estabilidade, com retenção de 32% da atividade. Zhou e Wu (2012) observaram que a L-AI de *Bacillus coagulans* apresentava 100% da sua atividade a 50°C e que, à medida que se aumentava a temperatura, observava-se um decaimento da atividade, significando um declínio da estabilidade.

A temperatura ótima para a L-AI de *Lactobacillus plantarum* também foi a 50°C (ZHANG *et al.*, 2006). Nos estudos de Torres *et al.*, (2014), a maior atividade também foi identificada a 50°C.

Dependendo da origem do microrganismo, a enzima L-arabinose isomerase pode apresentar temperatura variável. Para alguns estudos, a maior atividade é encontrada nos ensaios com temperaturas superiores 60°C (LI, *et al.*, 2011; HUNG *et al.*, 2014).

5.5 Conversão da D-galactose em D-tagatose por L-arabinose isomerase (L-AI)

Após os estudos para a identificação da estratégia mais adequada para expressão e caracterização da enzima L-AI, uma etapa importante foi a sua aplicação nas reações de bioconversão para a quantificação de D-tagatose, produzida a partir da isomerização da D-galactose, empregando a L-arabinose isomerase.

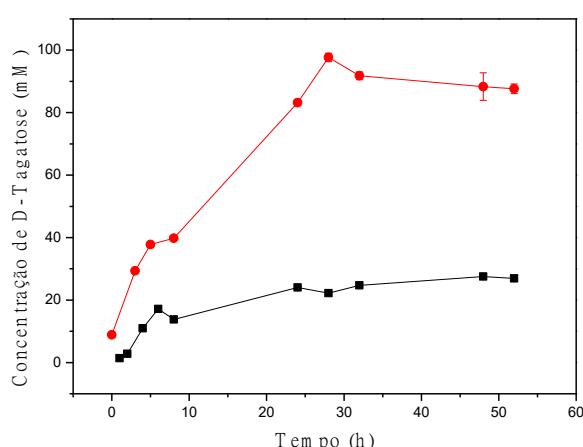
As reações de conversão foram desenvolvidas a partir de duas diferentes concentrações de D-galactose: 164 mM e 500 mM, durante 52h de ensaio, usando 0,114 U.mL⁻¹ (1,8μM).

Salonen *et al.*, (2012) e Xu *et al.*, (2016) justificam que a taxa de produção de D-tagatose aumenta com o aumento da temperatura, uma vez que a isomerização é uma reação de equilíbrio, e que temperaturas mais elevadas favorecem o equilíbrio durante a reação enzimática. Apesar das maiores atividades catalíticas para a L-AI terem sido encontradas a 50 °C (tópico 5.4.2), para os ensaios de bioconversão da D-galactose em D-tagatose, a temperatura utilizada na reação foi a de 55 °C

As reações a 55 °C também resultaram em altas atividades catalíticas e podem colaborar, significativamente, com o equilíbrio das reações de bioconversão.

Os extratos de L-arabinose isomerase utilizados nesse estudo foram expressos através do protocolo de autoindução, com uso da lactose comercial (STUDIER, 2005), seguida de purificação. A Figura 26 mostra o perfil de D-tagatose produzida a partir das concentrações de D-galactose oferecidas.

Figura 26- Concentração de D-tagatose produzida em relação ao tempo de reação usando (●) 500 mM de D-galactose e (■) 164 mM de D-galactose.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como esperado, a concentração de D-tagatose formada foi superior para a condição de maior substrato oferecido (500 mM de D-galactose). Também é possível analisar que a concentração de D-tagatose aumenta com o tempo até o equilíbrio ser estabelecido. Quando a concentração inicial de D-galactose é de 164 mM, o equilíbrio foi estabelecido em 6h de reação, atingindo uma concentração de D-tagatose de 13,8 mM e uma conversão em torno de 8,4%.

Quando foi oferecida uma maior concentração de D-galactose (500 mM), mantendo a mesma quantidade de enzima ($0,114 \text{ U.mL}^{-1}$), o equilíbrio foi estabelecido em 28h, atingindo uma concentração de D-tagatose de 97,7 mM e uma conversão em torno de 20%, superior ao obtido quando foram oferecidas menores concentrações de D-galactose em um maior tempo de processo.

Sousa (2015) aplicou a enzima L-arabinose isomerase (BL21) em reações de bioconversão com 0,4M de D-galactose, a 50°C, resultando em uma concentração de D-tagatose (mM) de 46 e um rendimento de conversão de 11% durante 48h de ensaio.

Hung *et al.*, (2014) aplicaram a enzima L-AI, termofílica de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1, nas reações de conversão de D-galactose em D-tagatose, atingindo uma conversão de 20%, em 10h de reação.

De acordo com Kim e Oh (2005), as L-AIs mesófilas apresentam baixos rendimento de conversão devido a uma mudança de equilíbrio em direção a D-galactose em reações que ocorram a temperaturas mais baixas.

Manzo *et al.*, (2019) obtiveram resultados de conversão de D-galactose em D-tagatose superiores aos encontrados neste trabalho, utilizando a L-AI de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36. Contudo, a quantidade de enzima oferecida no processo foi, aproximadamente, 8,3 vezes superior quando comparada à concentração de L-AI utilizada na reação de conversão descrita nesse estudo.

Dessa forma, é interessante o aprofundamento desses estudos com cargas enzimáticas superiores às oferecidas inicialmente, avaliando ainda, diferentes concentrações de substrato e temperaturas, para se atingir uma melhor produção de D-tagatose, a partir do emprego da L-arabinose isomerase.

5.6 Análise do custo de produção em relação às estratégias de cultivo avaliadas

Quando se pretende mensurar os custos da expressão de proteínas, são considerados alguns fatores que podem influenciar, diretamente, em uma maior demanda do processo, ou ainda, atingir a estratégia otimizada, visando a elevadas expressões da proteína de interesse,

menor tempo de processo e menor energia demandada para sua obtenção. Alguns fatores como a temperatura, agitação, tempo de expressão, concentração de indutor, tipos de indutores, rendimento de proteínas expressas e estratégias de cultivo, podem ser avaliados. Contudo, para esse estudo, foram investigados os custos referentes aos meios de cultivo (composição), incluindo os tipos de indutores (IPTG, lactose comercial e lactose derivada do soro de leite).

A Tabela 16 mostra as estratégias analisadas nesse estudo, o custo dos componentes dos meios de cultivo, indutores e as quantidades utilizadas nas culturas.

Tabela 16- Análise dos custos de produção da enzima L-AI. Os custos dos componentes dos meios de cultivo (CMM) foram expressos em centavos de dólar por litro de cultivo e o custo da produção (Cp) em centavos de dólar por unidade de enzima produzida.

Estratégia para Expressão	CMM (¢\$. L ⁻¹)	At (U.L ⁻¹)	Cp (¢\$.U ⁻¹)
Indução (IPTG)	18,70	78,7	0,24
AI (Lactose)	14,46	94,41	0,15
AI (Soro de leite)	14,11	151,0	0,09

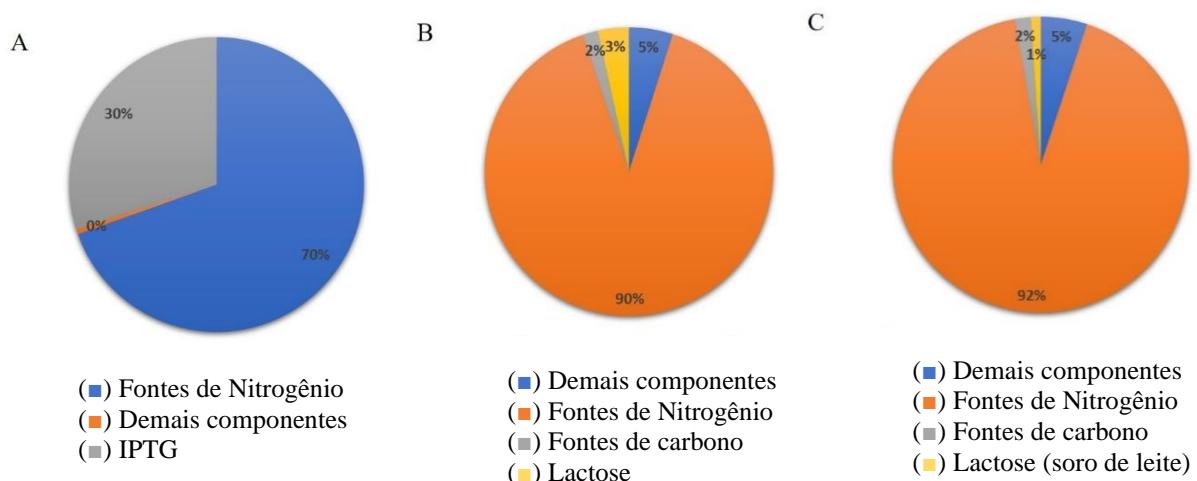
Fonte: Elaborada pela autora.

Além do custo dos componentes do meio exibidos na Tabela 16, elementos traços foram adicionados em todos os ensaios realizados em mesa agitadora (shaker), e estes somam ¢\$/L 2,81 aos custos, independente das estratégias de cultivo adotadas nesse estudo.

Quando equiparamos os custos dos meios de cultivo frente às estratégias de expressão da L-AI, constatamos que o meio de indução, com o uso do IPTG, eleva o custo em torno de 1,3 vezes, em relação ao emprego do meio de autoindução.

Como esperado, o IPTG torna o processo dispendioso quando se visa a um aumento de escala, não sendo promissora sua utilização em um cenário industrial. O custo do IPTG foi de 5,6 ¢\$. L⁻¹. Já a lactose comercial e a lactose derivada do soro de leite foram, respectivamente, 0,5 e 0,4 ¢\$. L⁻¹. Ou seja, se considerarmos apenas os valores dos indutores para os processos, o IPTG foi, aproximadamente, 11 vezes mais caro. Contudo, se avaliarmos de forma ampla a composição dos meios de cultivo, destacamos que, além do indutor, outros componentes tornaram o processo de alto custo. As fontes de nitrogênio, como o extrato de levedura e a triptona, elevaram o custo total do meio. A Figura 27 (A, B e C) mostra a composição dos meios em relação ao custo dos componentes.

Figura 27- Disposição dos componentes dos meios de cultivo em relação aos custos de cada constituinte. A. Meio de indução (IPTG); B. Método de autoindução com lactose C. Método de autoindução com lactose derivada do soro de leite.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em todas as estratégias, as fontes de nitrogênio superaram os valores do meio. Uma alternativa para a redução no custo total do meio seria substituir as fontes de nitrogênio por componentes mais acessíveis, que não influenciassem na produtividade da enzima, ou ainda proporcionassem melhores expressões. Nos estudos de Cardoso *et al.*, (2020), as fontes de nitrogênio também superaram grande parte do custo do meio de cultivo, sugerindo mais estudos visando à substituição dessas fontes por outras que não agreguem prejuízo à produção e que diminuam o custo final.

A Tabela 16 corrobora que os métodos que melhor expressaram a proteína e resultaram nos menores custos de processos foram os de autoindução. Apesar das fontes de nitrogênio resultarem em um aumento relevante no custo do processo, quando avaliamos o emprego dos indutores, o IPTG tornou o processo mais caro. Correlacionando apenas as produções por autoindução (ZYM 5052), destacamos que o uso do soro de leite como agente indutor viabilizou uma maior produção da proteína de interesse, além de tornar o custo do processo mais acessível, sendo 2,6 vezes menor que o custo quando o IPTG foi o agente indutor e 1,6 mais baixo que as produções em que a lactose comercial foi utilizada, reafirmando ainda o emprego de um subproduto como indutor alternativo. A cotação realizada foi para o soro de leite desproteinizado, anulando a etapa realizada nos estudos em laboratório, como apresentados

6 CONCLUSÃO

Os estudos apresentados nessa tese foram promissores e inovadores, em relação aos métodos já estabelecidos para a expressão da proteína recombinante L-arabinose isomerase, destacando o emprego do soro de leite, como fonte de lactose, atuando como indutor alternativo e eficiente para a produção da proteína de interesse.

O efeito da aeração (biorreator) foi favorável para a expressão da enzima L-arabinose isomerase, resultando em um aumento da atividade catalítica e do consumo das fontes de carbono e do indutor em um menor período.

A L-AI expressa através dos métodos de autoindução (lactose comercial e lactose derivada do soro de leite) apresentou atividades catalíticas superiores às encontradas quando empregado o indutor químico IPTG, além de promover a diminuição dos custos associados ao processo.

Dessa forma, esse estudo apresentou protocolos alternativos aos atuais para produção efetiva e promissora da enzima L-arabinose isomerase (L-AI), sendo o atual estudo o primeiro a verificar a produção de L-AI em meio de autoindução, com uso do soro de leite.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As etapas descritas abaixo são sugestões de estudos que podem contribuir para a obtenção de extratos com maiores concentrações de L-arabinose isomerase.

- Uso do soro de leite como indutor nas expressões em biorreator de bancada;
- Influência da agitação e aeração para a expressão da enzima L-AI em biorreator, pelo método de autoindução;
- Maiores concentração das fontes de carbono (glicose) e do indutor (lactose do soro de leite) para a expressão da enzima L-AI em biorreator, seja por batelada ou batelada alimentada;
- Citometria de fluxo, para avaliação das células geradas durante o cultivo;
- Determinação dos parâmetros cinéticos;
- Avaliação dos possíveis produtos formados durante a expressão da proteína de interesse: etanol, galactose, ácido acético;
- Produção da proteína de interesse, pelo método de indução (IPTG), em biorreator, como controle de processo;
- Dicroísmo circular;
- Bioconversão: Análise dos parâmetros tempo, concentração de D-galactose e concentração de L-AI;
- Estabilidade à estocagem.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Tiago Lima de; GOMES, Sandy Danielle Lucindo; D'ALMEIDA, Alan Portal; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 73, p. 65-73, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>.
- ALVES, Maura Pinheiro; MOREIRA, Renam de Oliveira; RODRIGUES Júnior, PAULO Henrique; MARTINS, Mayra Carla de Freitas; PERRONE, Ítalo Tuler; CARVALHO, Antônio Fernandes de. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 69, n. 3, p. 212, 2 jul. 2014. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v69i3.341>.
- AMARO, Tiago M. M. M.; ROSA, Davide; COMI, Giuseppe; IACUMIN, Lucilla. Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. **Frontiers In Microbiology**, [S.l.], v. 10, p. 1-12, 9 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992>.
- ARLA FOODS- New soft drink from Pepsi means breakthrough for Tagatose. 2003. Disponível em: link. <https://www.arla.com/company/news-andpress/2003/pressrelease/new-soft-drink-from-pepsi-means-breakthrough-for-tagatose-759953/>. Acesso em: 03 jul. 2020.
- BAJPAI, Pratima; VERMA, Neelam; NEER, Jasjeet; BAJPAI, Pramod K. Utilization of cheese whey for production of α -amylase enzyme. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 18, p. 265-270, 1991.
- BLOMMEL, Paul G.; BECKER, Katie J.; DUVNJAK, Petar; FOX, Brian G. Enhanced Bacterial Protein Expression During Auto-Induction Obtained by Alteration of *Lac* Repressor Dosage and Medium Composition. **Biotechnology Progress**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 585-598, 5 set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp070011x>.
- BOSSO, Alessandra; SETTI, Ana Caroline Iglesias; TOMAL, Adriana Bosso; GUEMRA, Samuel; MORIOKA, Luiz Rodrigo Ito; SUGUIMOTO, HÉLIO Hiroshi. Substrate consumption and β -galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S.l.], v. 21, p. 101335, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101335>.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], p.248-254, 1976.
- BRIAND, L.; MARCION, G.; KRIZNIK, A.; HEYDEL, J. M.; ARTUR, Y.; GARRIDO, C.; SEIGNEURIC, R.; NEIERS, F. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 9 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33037>.

BEADLE, J. R.; ROCKVILLE, J. P. S.; JR, T. J. W. PROCESS FOR MANUFACTURING TAGATOSE. Biospherics Incorporated, Beltsville, Md. N° patente: 5,078,796. 1992.

CARDOSO, Valdemir M.; CAMPANI, Gilson; SANTOS, Maurício P.; SILVA, Gabriel G.; PIRES, Manuella C.; GONÇALVES, Viviane M.; GIORDANO, Roberto de C.; SARGO, Cíntia R.; HORTA, Antônio C.l.; ZANGIROLAMI, Teresa C. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Biotechnology Reports**, [S.I.], v. 26, p. 00441, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00441>.

CHAN, Zhuhua et al. Enhanced cold active lipase production by metagenomic library recombinant clone CALIP3 with a step-wise temperature and dissolved oxygen level control strategy. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [S.I.], v. 24, n. 9, p.1263-1269, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjche.2016.04.033>.

CHEETHAM, P. S. J.; WOOTTON, A. N. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. **Enzyme Microb. Technol.** [S.I.], p. 105-108. fev. 1993.

CHENG, Lifang; MU, Wanmeng; JIANG, Bo. Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. **Journal Of The Science of Food And Agriculture**, [S.I.], v. 90, n. 8, p. 1327-1333, 29 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3938>.

CLOMBURG, James M.; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Trends In Biotechnology**, [S.I.], v. 31, n. 1, p. 20-28, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.006>.

CROWLEY, Erika L.; RAFFERTY, Steven P. Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. **Protein Expression and Purification**, [S.I.], v. 157, p. 70-85, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007>.

DISCHE, Zacharias; BORENFREUND, Ellen. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **J. Biol. Chem.**, [S.I.], p.583-587, 1951.

DONNER, Thomas W.; MAGDER, Laurence S.; ZARBALIAN, Kiarash. Dietary supplementation with D-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol. **Nutrition Research**, [S.I.], v. 30, n. 12, p.801-806, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2010.09.007>.

DUBENDORFFT, John W.; STUDIER, -F. William. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Zac Repressor. **J. Mol. Biol.**, [S.I.], p. 45-59, nov. 1991.

DVORAK, Pavel et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, [S.I.], v. 14, n. 1, p.1-15, dez. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>.

EINSFELDT, Karen; SEVERO JÚNIOR, João Baptista; ARGONDIZZO, Ana Paula Corrêa; MEDEIROS, Marco Alberto; ALVES, Tito Lívio Moitinho; ALMEIDA, Rodrigo Volcan; LARENTIS, Ariane Leites. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, [S.I.], v. 29, n. 41, p. 7136-7143, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.073>.

ENSOR, Mark et al. Safety and Efficacy of D-Tagatose in Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes. **J Endocrinol Diabetes Obes.** [S.I.], p. 1-24, 2016.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira. **IMOBILIZAÇÃO DIRECIONADA E REVERSÍVEL DA L-ARABINOSE ISOMERASE DE *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 EM AGAROSE ATRAVÉS DO DOMÍNIO LECTINA β -TREBOL (LSLt)**. 2017. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, David; VEILLETTE, Marc; GIROIR-FENDLER, Anne; RAMIREZ, Antonio Avalos; FAUCHEUX, Nathalie; HEITZ, Michèle. Biovalorization of Saccharides derived from industrial wastes such as whey: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [S.I.], v. 16, n. 1, p. 147-174, 11 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-016-9417-7>.

FERREIRA, Sara Sofia Costa. **Biotechnological processes for D-tagatose production**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade do Minho, Braga (Portugal), 2019.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, [S.I.], v. 10, p. 43-46, set. 2001.

GOMES, Cristiane Rodrigues; VISSOTTO, Fernanda Zaratini; FADINI, Ana Lúcia; FARIA, Eliete Vaz de; LUIZ, Alexandra Motta. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates diet em sacarose e light em calorias. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas (SP), p. 614-623, jul. 2007.

GOMES, Davi de Castro. PRODUÇÃO DE L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE DE *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 VISANDO A OBTENÇÃO DE D-TAGATOSE. 2018. XXXVII Encontro de Iniciação Científica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

GÖRKE, Boris; STÜLKE, Jörg. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, [S.I.], v. 6, n. 8, p. 613-624, ago. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1932>.

GRANSTRÖM, Tom Birger; TAKATA, Goro; TOKUDA, Masaaki; IZUMORI, Ken. Izumoring: A Novel and Complete Strategy for Bioproduction of Rare Sugars. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, [S.I.], v. 97, n. 2, p. 89-94, nov. 2003.

GUERRERO-WYSS, Marion; AGÜERO, Samuel Durán; DÁVILA, Lisse Angarita. D-Tagatose is a promising sweetener to control glycaemia: a new functional food. **Biomed Research International**, [S.I.], v. 2018, p. 1-7, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8718053>.

GUISAN, Jose M. New Opportunities for Immobilization of Enzymes. Methods in Molecular Biology, [S.I.], p.1-13, 2013. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1.

GYNNÅ, Arvid Hedén. Induction kinetics of the *lac operon*. **Molecular Biotechnology Programme**, [S.I.] p.1-33, 2014.

HU, Hongbo; WOOD, Thomas K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.I.], v. 391, n. 1, p. 1033-1038, jan. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.013>.

HUNG, Xing-Guang; TSENG, Wen-Chi; LIU, Shiu-Mei; TZOU, Wen-Shyong; FANG, Tsuei-Yun. Characterization of a thermophilic L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Biochemical Engineering Journal**, [S.I.], v. 83, p. 121-128, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.026>.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Quantidade de leite cru adquirido e industrializado no mês e no trimestre (Mil Litros), 1º trimestre 2020. 2020. Disponível em: link. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=destaques>. Acesso em: 08 jun. 2020.

ILLANES, Andres. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S.I.], v. 14, n. 6, p. 1-28, 14 nov. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-11>.

ISRANI, Neetu; VENKATACHALAM, Prerana; GAJARAJ, Bharath; VARALAKSHMI, Kilingar Nadumane; SHIVAKUMAR, Srividya. Whey valorization for sustainable polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus megaterium*: production, characterization and in vitro biocompatibility evaluation. **Journal of Environmental Management**, [S.I.], v. 255, p. 109884, fev. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109884>.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; GAUTAM, P. D - Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, [S.I.], v. 235, p. 250-255, jul. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.123>.

JELEN, P. WHEY PROCESSING | Utilization and Products. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, [S.I.], p. 731-737, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00495-7>.

JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v. 64, n. 6, p. 816-822, 1 jun. 2004. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1578-6>.

JUNIOR, Clério Valentin. **Produção de biomoléculas por fermentação de glicerol utilizando micro-organismos isolados de rúmen bovino**. 2013. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia, Bioenergia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/Paraná, 2013.

KHUWIJTJARU, Pramote; MILASING, Neeranuch; ADACHI, Shuji. Production of D-tagatose: A review with emphasis on subcritical fluid treatment. *Engineering and Health Studies*, [S.I.], p.159-167, 2018.

KIM, Hye-jung; OH, Deok-kun. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. **Journal of Biotechnology**, [S.I.], v. 120, n. 2, p.162-173, nov. 2005. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.004>.

KIM, Jin-Ha; PRABHU, Ponnandy; JEYA, Marimuthu; TIWARI, Manish Kumar; MOON, Hee-Jung; SINGH, Raushan Kumar; LEE, Jung-Kul. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v. 85, n. 6, p. 1839-1847, 2 set. 2009. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2210-6>.

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

LAKSMI, Fina Amreta; ARAI, Shigeki; ARAKAWA, Tsutomu; TSURUMARU, Hirohito; NAKAMURA, Yoshitaka; SAKSONO, Budi; TOKUNAGA, Masao; ISHIBASHI, Matsuiro. Expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* for improved activity under acidic condition. **Protein Expression And Purification**, [S.I.], v. 175, p. 105692, nov. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2020.105692>.

LEE, Dong-woo et al. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.I.], v. 434, n. 2, p.333-343, fev. 2005. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.004>.

LEVIN, Gilbert V. Tagatose, the New GRAS Sweetener and Health Product. **Journal Of Medicinal Food**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 23-36, 2002.

LI, Yanjun et al. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production. *Extremophiles*, [S.I.], v. 15, n. 3, p.441-450, 23 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-011-0375-2>.

LI, Zijie; GAO, Yahui; NAKANISHI, Hideki; GAO, Xiaodong; CAI, Li. Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [S.I.], v. 9, p. 2434-2445, 12 nov. 2013. Beilstein Institut.
<http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.9.281>.

LIANG, Min; CHEN, Min; LIU, Xinying; ZHAI, Yafei; LIU, Xian-Wei; ZHANG, Houcheng; XIAO, Min; WANG, Peng. Bioconversion of D-galactose to D-tagatose: continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable L-arabinose isomerase and efficient purification by selective microbial degradation. **Appl Microbiol Biotechnol**, [S.I.], v. 2013, p. 1469-1474, 2012.

LIMA, Ariosvana Fernandes et al. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 48, n. 3, p.443-452, mar. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>.

LU, Jing; ZHANG, Chong; LEONG, Hui Yi; SHOW, Pau Loke; LU, Fengxia; LU, Zhaoxin. Overproduction of lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* by auto-induction expression and its application in triphenylmethane dyes degradation. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.I.], v. 129, n. 3, p. 327-332, mar. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.006>.

LU, Y.; LEVIN, G. V.; DONNER, T. W. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. **Journal Compilation**, [S.I.], p.109-134, 2008.

MACHADO, Raul et al. High level expression and facile purification of recombinant silk-elastin-like polymers in autoinduction shake flask cultures. **MB Express**. p. 1-15. fev. 2013.

MALAKAR, Pushkar; VENKATESH, K. V. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.I.], v. 93, n. 6, p. 2543-2549, 27 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3642-3>.

MALDONADO, Rafael Resende. **PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* OBTIDA A PARTIR DE MEIOS INDUSTRIAIS**. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MANO, Mario Cezar Rodrigues; PAULINO, Bruno Nicolau; PASTORE, Gláucia Maria. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food Research International**, [S.I.], v. 124, p. 78-85, out. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>.

MANHANI, Tatiana Monique; CAMPOS, Maria Valéria M.; DONATI, Fulviane Pimentel. SACAROSE, SUAS PROPRIEDADES E OS NOVOS EDULCORANTES. **Revista Uniara**. [S.I.], p. 113-125. jul. 2014.

MANZO, R. M.; SIMONETTA, A. C.; RUBIOLO, A. C.; MAMMARELLA, E. J. SCREENING AND SELECTION OF WILD STRAINS FOR L-ARABINOSE ISOMERASE PRODUCTION. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [S.I.], v. 30, n. 4, p. 711-720, out. 2013.

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

MARBACH, Anja; BETTENBROCK, Katja. *Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA.* **Journal of Biotechnology**, [S.I.], v. 157, n. 1, p.82-88, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotec.2011.10.009>.

MEN, Yan; ZHU, Yueming; ZHANG, Lili; KANG, Zhenkui; IZUMORI, Ken; SUN, Yuanxia; MA, Yanhe. Enzymatic conversion of d-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. **Microbiological Research**, [S.I.], v. 169, n. 2-3, p. 171-178, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.001>.

MOGHA, K.V.; CHAUDHAR, A.R.; APARNATHI, K.D. Tagatose: A low calorie multifunctional sweetener. **Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology**, [S.I.], v. 5, n. 3, p. 29-35, 2016

MOORADIAN, Arshag D.; SMITH, Meridith; TOKUDA, Masaaki. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: a narrative review. **Clinical Nutrition Espen**, [S.I.], v. 18, p. 1-8, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>.

MURARKA, Abhishek; DHARMADI, Yandi; YAZDANI, Syed Shams; GONZALEZ, Ramon. Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 74, n. 04, p. 1124-1135, fev. 2008.

OLIVEIRA, Ravana. C. ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OVERTON, Tim W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, [S.I.], v. 19, n. 5, p. 590-601, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.

PANDEY, Manisha; VERMA, Rohit K; A SARAF, Shubhini. Nutraceuticals: new era of medicine and health. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S.I.], v. 3, n. 1, p.11-15, 2010.

PANESAR, P; KENNEDY, J; GANDHI, D; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PATRA, F.; TOMAR, S.k.; ARORA, S. Technological and Functional Applications of Low-Calorie Sweeteners from Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Science**, [S.I.], v. 74, n. 1, p.16-23, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01005.x>.

PESSELA, Benevides Costa Chitunda. INGENIERÍA DE BIOCATALIZADORES Y BIOPROCESOS β -GALACTOSIDASA DE *Thermus* sp., cepa T2. 2002. 140 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Ciências Químicas, Departamento de Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 2002.

R. BEADLE COS, James *et al.* **PROCESS FOR MANUFACTURING TAGATOSE.**
Titular: James R Beadlecos. 5,078,796. Depósito: 25 mar. 1991. Concessão: 7 jan. 1992.

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

REGHELIM, Mariane; RIGHI, Eléia. Reaproveitamento de Resíduo: Alternativas para o Soro do Queijo. In: **6º CONGRESSO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS PARA O MEIO AMBIENTE**, 2018, Bento Gonçalves – RS. Anais, 2018. p. 1 - 8.

RENGE, V. C.; KHEDKAR, S. V.; NANDURKAR, Nikita R. ENZYME SYNTHESIS BY FERMENTATION METHOD: A REVIEW. **Sci. Revs. Chem. Commun.**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 585-590, out. 2012.

RHIMI, Moez *et al.* The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23K is an attractive d-tagatose producer. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 101, n. 23, p.9171-9177, dez. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.036>.

RHIMI, Moez; CHOUAYEKH, Hichem; GOUILLOUARD, Isabelle; MAGUIN, Emmanuelle; BEJAR, Samir. Production of D-tagatose, a low caloric sweetener during milk fermentation using L-arabinose isomerase. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 102, n. 3, p. 3309-3315, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.078>.

ROH, Hoe J. *et al.* Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, [S.l.], p.1-4, 2000.

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

RYU, S. Continuous D-Tagatose Production by Immobilized Thermostable L-arabinose isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. **Biotechnology Progress**, [S.l.], v. 19, n. 6, p.1643-1647, 5 dez. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp0340739>.

SABO, Sabrina S. *et al.* Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 102, n. 1, p.87-99, jan. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-14881>.

SALONEN, Noora *et al.* D-tagatose production in the presence of borate by resting *Lactococcus lactis* cells harboring *Bifidobacterium longum* L-arabinose isomerase.

Bioprocess and Biosystems Engineering, [S.l.], v. 36, n. 4, p.489-497, 18 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-012-0805-2>.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas.** 2015. 333 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANTOS, Glauber Oliveira. **EDULCORANTES: TENDÊNCIAS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS NA REDUÇÃO DE AÇÚCAR – REVISÃO DE LITERATURA.** 2018. 56 f. Monografia - Curso de Tecnólogo de Alimentos, Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SARGO, Cíntia Regina. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de rE. coli utilizando glicerol como fonte de carbono.** 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2011.

SCHAGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, [S.l.], p.368-379, 1987.

SILVA, Flavia Martins da; LACERDA, Paulo Sérgio Bergo de; JONES JUNIOR, Joel. **DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E QUÍMICA VERDE. Quim. Nova.** [S.l.], p. 103-110. maio 2005.

SILVA, Rosana de Oliveira Pithan e; BUENO, Carlos Roberto Ferreira; SÁ, Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues. **ASPECTOS RELATIVOS À PRODUÇÃO DE SORO DE LEITE NO BRASIL, 2007-2016. Informações Econômicas**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 5-17, abr. 2017.

SISO, M. I. Gonzfilez. **THE BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF CHEESE WHEY: A REVIEW. Bioresource Technolog**, Great Britain, v. 57, p. 1-11, 1996.

SOUSA, Marylane de et al. Engineering the L-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* for D-tagatose Synthesis. *Molecules*, [S.l.], v. 22, n. 12, p.1-13, 6 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22122164>.

SOUSA, Marylane de. **OBTENÇÃO DE UM CATALISADOR INSOLÚVEL PARA A PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE POR L-ARABINOSE ISOMERASE.** 2015. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SOUZA, T, C; Hissa, D. C; Melo, V. M.M; Gonçalves, L. R. B. Evaluation of Different Culture Medium for the Heterologous Expression of L-arabinose isomerase. **XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. Florianópolis/ SC. 2018.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, [S.l.], v. 41, n. 1, p.207-234, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

TORRES, Pedro R.; MANZO, Ricardo M.; RUBIOLO, Amelia C.; BATISTA-VIERA, Francisco D.; MAMMARELLA, Enrique J. Purification of an L-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S.l.], v. 102, p. 99-105, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.023>.

VAN HOLSBEECK, Monika; TSAKAL, Efstathia; SYRYN, Evelien; AERTS, Guido; VAN IMPE, Jan; VOORDE, Ilse van de. Overexpression of L-arabinose isomerase for Production of the Low-Calorie Bulk Sweetener D-Tagatose. *Enzyme Engineering*, [S.l.], v. 04, n. 01, p. 1-6, 2014. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6674.1000125>.

VASCONCELOS, Luan Tales Costa de Paiva. **ESTRATÉGIAS DE INDUÇÃO DO ANTÍGENO 503 RECOMBINANTE DE *Leishmania i. chagasi* EXPRESSO EM *Escherichia coli* M15.** 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

VAZ, Michelle Rossana Ferreira. **INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmaniai. chagasi* UTILIZANDO *Escherichia coli* M15 CULTIVADA EM INCUBADOR ROTATIVO E BIORREATOR.** 2011. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte/ RN, 2011.

VIEIRA, Danielle Cristina. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2009.

VIITANEN, Mikko I; VASALA, Antti; NEUBAUER, Peter; ALATOSSAVA, Tapani. Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], p. 1-10, 9 abr. 2003.

WANG, Jian et al. Microbial production of value-added nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, [S.l.], p.97-104, 2016.

WOYSKI, Denice; CUPP-VICKERY, Jill R. Enhanced Expression of Cytochrome P450s from *lac*-Based Plasmids Using Lactose as the Inducer. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.l.], v. 388, n. 2, p. 276-280, abr. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2306>.

XU, Jianlin et al. Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. **Protein Expression and Purification**, [S.l.], v. 83, n. 1, p.30-36, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.014>.

XU, Wei et al. Cloning, Expression, and Characterization of a Novel L-arabinose isomerase from the Psychrotolerant Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Molecular Biotechnology**, [S.l.], v. 58, n. 11, p.695-706, 1 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-016-9969-3>.

XU, Wei; ZHANG, Wenli; ZHANG, Tao; JIANG, Bo; MU, Wanmeng. L -arabinose isomerases: characteristics, modification, and application. **Trends In Food Science & Technology**, [S.l.], v. 78, p. 25-33, ago. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.016>.

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

XU, Zheng; QING, Yujia; LI, Sha; FENG, Xiaohai; XU, Hong; OUYANG, Pingkai. A novel L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 70, n. 1-2, p. 1-7, jun. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.01.010>.

ZHANG, Hong-Bin; WANG, Ya-Jie; HU, Xue-Qin; ZHU, Hui-Xia; WEI, Zhao- Jun. Effect of different culture conditions for dextranase production in *Escherichia coli* using lactose as inducer. **African Journal of Biotechnology**. [S.l.], p. 1577-1582. 20 abr. 2009.

ZHANG, Hua; JIANG, Bo; PAN, Beilei. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 23, n. 5, p.641-646, 4 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9274-6>.

ZHANG, Hua; JIANG, Bo; PAN, Beilei. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 23, n. 5, p. 641-646, 4 out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9274-6>.

ZHANG, Wenli; ZHANG, Tao; JIANG, Bo; MU, Wanmeng. Enzymatic approaches to rare sugar production. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 35, n. 2, p. 267-274, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.004>

ZHOU, Xingding; WU, Jin Chuan. Heterologous expression and characterization of *Bacillus coagulans* L-arabinose isomerase. World Journal of Microbiology and Biotechnology, [S.l.], v. 28, n. 5, p.2205-2212, 19 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-012-1026-1>.

ANEXO A- TRABALHOS APRESENTADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- Souza, T, C; Hissa, D. C; Melo, V. M.M; Gonçalves, L. R. B. Evaluation of Different Culture Medium for the Heterologous Expression of L-Arabinose Isomerase. XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Florianópolis/ SC. 2018.
- Souza, T, C; Sales, L. A. C; Gomes, D. C; Silva, G. R. S; Pessela, B. C; Hissa, D. C; Gonçalves, L. R. B. Effect of Temperature on L-arabinose isomerase production by a recombinant strain. XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Florianópolis/ SC. 2018.
- Souza, T, C; Manzo, R. M; Mammarella, E. J; Hissa, D. C; Gonçalves, L. R. B. Avaliação de Diferentes Estratégias para a Expressão Heteróloga de L-arabinose isomerase (L-AI). Renorbio 2019: II Encontro de Biotecnologia do Nordeste. Fortaleza/ Ceará. 2019.

ANEXO B- DEPÓSITO DE PATENTE

Como um dos produtos desse estudo, a redação de uma patente intitulada “Método para obtenção da enzima L-arabinose isomerase (L-AI) recombinante por expressão heteróloga em *Escherichia coli* utilizando soro de leite como indutor no *Operon lac*”, foi submetida a Coordenadoria de Inovação Tecnológica (CIT) e teve a notificação de requerimento de pedido divulgada pela Revista da Propriedade Industrial, em junho de 2020.

ANEXO C - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM PERIÓDICO

Os estudos desenvolvidos durante o curso de doutorado também resultaram na publicação de um artigo científico, na Molecular Biotechnology, em janeiro de 2021, com acesso através do endereço: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00301-2>.

Alternative Heterologous Expression of L-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 By Residual Whey Lactose Induction

Ticiane C. de Souza^a, Ravenna Casemiro Oliveira^a, Saulo Gonçalves de Santiago Bezerra^b, Ricardo M. Manzo^c, Enrique J. Mammarella^c, Denise Cavalcante Hissa^{b*}, Luciana R. B. Gonçalves^{a*}

Abstract

This study reports an alternative strategy for the expression of a recombinant L-AI from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 by auto-induction using glucose and glycerol as carbon sources and residual whey lactose as inducer agent. Commercial lactose and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) were also evaluated as inducers for comparison of enzyme expression levels. The enzymatic extracts were purified by affinity chromatography, characterized, and applied in the bioconversion of D-galactose into D-tagatose. L-AI presented a catalytic activity of 1.67 ± 0.14 , 1.52 ± 0.01 , and 0.7 ± 0.04 U/mL, when expressed using commercial lactose, lactose from whey, and IPTG, respectively. Higher activities could be obtained by changing the protocol of enzyme extraction and, for instance, the enzymatic extract produced with whey presented a catalytic activity of 3.8 U/mL. The specific activity of the enzyme extracts produced using lactose (commercial or residual whey) after enzyme purification was also higher when compared to the enzyme expressed with IPTG. Best results were achieved when enzyme expression was conducted using 4 g/L of residual whey lactose

for 11 h. These results proved the efficacy of an alternative and economic protocol for the effective expression of a recombinant L-AI aiming its high-scale production.

Keywords: Cheese whey · L-Arabinose isomerase · *Escherichia coli* expression · D-Tagatose

· Auto-induction