



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

**ANA CAROLINA PINTO DE ALMEIDA**

**PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A PARTIR DE LACTOSE ATRAVÉS  
DA CO-IMOBILIZAÇÃO DE L-ARABINOSE ISOMERASE E B-GALACTOSIDASE  
EM AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS RETICULADOS**

**FORTALEZA**

**2023**

ANA CAROLINA PINTO DE ALMEIDA

PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A PARTIR DE LACTOSE ATRAVÉS DA  
CO-IMOBILIZAÇÃO DE L-ARABINOSE ISOMERASE E B-GALACTOSIDASE EM  
AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS RETICULADOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França.

FORTALEZA

2023

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

- 
- A1p Almeida, Ana Carolina Pinto de.  
Produção integrada de D-tagatose a partir de lactose através da Co- imobilização de L-arabinose isomerase e  $\beta$ -galactosidase em agregados enzimáticos magnéticos reticulados / Ana Carolina Pinto de Almeida. – 2023.  
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.  
Coorientação: Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França.
1. Galactose. 2. L-AI. 3. Imobilização Enzimática. 4. CLEA. 5. Combi-CLEA. I. Título.

CDD 660

---

ANA CAROLINA PINTO DE ALMEIDA

PRODUÇÃO INTEGRADA DE D-TAGATOSE A PARTIR DE LACTOSE ATRAVÉS DA  
CO-IMOBILIZAÇÃO DE L-ARABINOSE ISOMERASE E B-GALACTOSIDASE EM  
AGREGADOS ENZIMÁTICOS MAGNÉTICOS RETICULADOS

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Ticiane Cavalcante de Souza  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

A Deus e a Nossa Senhora.

Aos meus pais, Antonio e Silvanha.

A minha irmã, Ana Cristina.

## AGRADECIMENTOS

Tudo é passageiro, nada é para sempre. Um clichê e uma redundância que nos lembra que a vida é composta de fases, momentos e circunstâncias, regadas às vezes de dor, mas também de alegrias, com pessoas e relacionamentos que vem e vão. Por isso é importante sempre aproveitar e viver bem, com sabedoria e entrega, como diria Charlie Chaplin, cada parte desse palco sem teatro que não admite ensaios.

Algumas vezes, temos medo do futuro, tentamos fazê-lo valer a pena no presente, não repetindo os mesmos erros do passado. Mas como diz Santo Agostinho, o passado é memória, o futuro é esperança e o presente é a atenção do agora.

Só Deus e minha Mãe do céu sabem o qual difícil foi chegar até aqui, as incertezas e inseguranças, os anseios e medos, a grande variedade de sentimentos que rondaram o meu coração, contudo, Deus é fiel e em tudo Ele me sustentou, em tudo Ele cuidou. Por isso, sigo acreditando nos Seus sonhos em minha vida, e a Ele sou grata, junto com Nossa Senhora, por essa jornada, porque Ele me conduziu até aqui e assim continua, sendo minha fortaleza e minha esperança de que estou trilhando um caminho de muitas estrelas.

Por seguinte, agradeço a minha família. A minha irmã Ana Cristina, que intercede por mim junto aos anjos no céu, a quem dedico mais essa conquista. Aos meus pais, Antonio e Silvanha que, mesmo diante da distância que hoje vivemos, estão sempre junto comigo, rezando por mim, cuidando, e me incentivando para que eu possa ir sempre mais longe. Vocês são meu exemplo de esforço e dedicação, obrigada por sempre me ouvirem, pelos conselhos e acreditarem em mim, até mesmo quando me enfraqueci na fé, por me motivarem e me criarem tão bem! Obrigada a minha prima Marta que foi minha companheira ao longo desse caminho acadêmico e a todos os meus parentes, tios, primos e avós que me cercaram e me cercam de carinho, cuidado e pílulas de sabedoria.

E se, de fato, um amigo fiel é proteção poderosa, e quem o encontrar terá encontrado um tesouro sem preço e de valor incalculável, mais do que nunca posso testemunhar que encontrei esses presentes que são a manifestação do amor de Deus em minha vida. Assim sendo, sou grata a minha amiga Júlia, que a muito caminha comigo, que sempre torce por mim e comemora as minhas vitórias. A Sarah pela companhia, disponibilidade, ensinamentos -esclarecendo, muitas vezes, as minhas dúvidas- e escuta atenta, por me aconselhar, me alimentar e ser meu puxão de orelha para o autoconhecimento e menos autocobranças. Ao meu

amigo e irmão Sueslley, sempre tão disposto e de grande coração, que foi meu suporte aos longos desses dois anos em idas e vindas da UFC, a quem muito “perturbei” e não tenho nem como retribuir tamanho zelo e cumplicidade. Aos meus amigos, Rafaela, Juliana, Mariana, Davi, Demartone, Luca, a quem compartilho tantos momentos e acúmulo as graças da vivência comunitária, pois sei que não caminho sozinha, o meu muito obrigada.

Obrigada a Universidade Federal do Ceará, a professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves que me acolheu e juntamente com o professor Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França me ajudaram a trilhar essa jornada. Obrigada pela paciência, por acreditarem em mim e pela disponibilidade de enfrentarem junto comigo os desafios dessa estrada.

Obrigada aos colegas de laboratório, Laiza, Ravena, Edvan, Paula Jessica, Carla Luzia, Paula Maria, que partilharam comigo suas experiências e me agregaram valores. Obrigada a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - pelo financiamento ao longo desse período de pesquisa, ao Professor Dr. Tiago Lima de Albuquerque e a Dra. Ticiane Cavalcante de Souza por aceitarem contribuir com o meu trabalho e por somarem ao meu desenvolvimento acadêmico.

Por fim, a todos que fizeram e fazem parte da minha história, meu muito obrigada, desejo a todos a perseverança, a resiliência e a fé para continuar lutando e acreditando nos seus ideais, pois como disse Chaplin, mais uma vez, enquanto você sonha, você está fazendo o rascunho do seu futuro!!!

Eu sonho minha pintura, e então eu pinto o meu sonho. Os pescadores sabem que o mar é perigoso e a tempestade terrível. Mas este conhecimento não os impede de fazer-se ao mar. Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações.

Vincent van Gogh.



## RESUMO

A D-tagatose é um edulcorante que apresenta 90% de doçura e baixo valor calórico, em comparação a sacarose, não elevando as taxas de açúcar no sangue detendo características antidiabéticas, probióticas e antioxidantes. A D-tagatose pode ser obtida pelo método enzimático, utilizando como biocatalizador a L-arabinose isomerase (L-AI), a partir da isomerização da D-galactose, um monossacarídeo que pode ser obtido pela da hidrólise da lactose usando a enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL). Contudo, para manter uma maior estabilidade térmica e operacional, mantendo um melhor desempenho dos biocatalisadores em condições adversas de operação, viabilizando a recuperação e reutilização de enzimas, pode-se aplicar métodos de imobilização enzimática, no qual destaca-se a reticulação por moléculas de proteína sem a presença de um suporte, a formação de CLEAs (*Cross-linked enzyme aggregates*), cuja metodologia permite combinar, em um único agregado, duas ou mais enzimas (Combi-CLEAs), apresentando altas produtividades e reduzindo o custo do biocatalisador e quando enriquecidos com características magnéticas (m-CLEAs), permitem a separação dos agregados com a utilização de ímãs. O objetivo desse trabalho, portanto, foi estudar a co-imobilização das enzimas  $\beta$ -GAL e L-AI em agregados enzimáticos magnéticos reticulados para a síntese do açúcar D-tagatose a partir da lactose comercial. Para tal, esse trabalho foi realizado em duas etapas principais: (I) produção da L-AI por cultivo submerso e (II) preparação dos m-CLEAs e m-Combi-CLEAs. O crescimento do microrganismo, para produção da enzima LA-I, foi avaliado em (a) frascos agitados (agitador orbital) e em (b) biorreator de bancada. O crescimento celular do microrganismo foi acompanhado em meio de cultivo contendo lactose do soro do leite como indutor para produção da enzima. Avaliou-se também a utilização de extrato de levedura em grau analítico e industrial para fins comparativos. Em (a) a triptona não foi adicionada ao meio, observando o impacto na produção da L-AI. Em (b) foram comparadas condições aeróbicas e anaeróbicas. Após 12h de cultivo a 37 °C e uma agitação de 200 RPM, foi realizado o rompimento celular para a obtenção do extrato enzimático, que foi caracterizado quanto a atividade enzimática, concentração de proteínas e síntese da D-tagatose. Para a produção de D-tagatose a partir de lactose, iniciou-se com a preparação dos m-CLEAs de  $\beta$ -GAL, usando a enzima de *Aspergillus oryzae*, disponível comercialmente. A capacidade de hidrólise do m-CLEA de  $\beta$ -GAL foi avaliada na presença de 500 mM de lactose. Em seguida, foram produzidos m-CLEAs de L-AI, obtida neste trabalho, bem como m-Combi-CLEAs contendo ambas as enzimas co-imobilizadas. Os resultados dos experimentos demonstraram que o extrato de

levedura industrial é um substituto em potencial do extrato de levedura grau analítico. Observou-se ainda que a não adição da triptona do prejudicou o crescimento do microrganismo contudo não atingiu a produção da enzima. Observou-se a influência positiva da aeração no crescimento e na produção da enzima de interesse, impactando na quantidade de D-tagatose produzida. Por fim, observou-se um rendimento de imobilização de 100% para os CLEAs produzidos, com uma conversão da lactose em torno de 99,9%, quando se utilizou o m-Combi-CLEA, e uma bioconversão de D-tagatose em torno de 16%.

**Palavras-chave:** galactose; L-AI; imobilização enzimática; CLEA; combi-CLEA.

## ABSTRACT

D-tagatose is a sweetener that has 90% sweetness and low caloric value, compared to sucrose, does not increase blood sugar levels and has antidiabetic, probiotic and antioxidant characteristics. D-tagatose can be obtained by the enzymatic method, using L-arabinose isomerase (L-AI) as a biocatalyst, from the isomerization of D-galactose, a monosaccharide that can be obtained through the hydrolysis of lactose using the enzyme  $\beta$  - galactosidase ( $\beta$  - GAL). However, to maintain greater thermal and operational stability, maintaining better performance of biocatalysts in adverse operating conditions, enabling the recovery and reuse of enzymes, enzymatic immobilization methods can be applied, in which cross-linking by molecules of protein without the presence of a support, the formation of CLEAs (Cross-linked enzyme aggregates), whose methodology allows combining, in a single aggregate, two or more enzymes (Combi-CLEAs), presenting high productivity and reducing the cost of the biocatalyst and when enriched with magnetic characteristics (m-CLEAs), they allow the separation of aggregates using magnets. The objective of this work, therefore, was to study the co-immobilization of the enzymes  $\beta$  -GAL and L-AI in cross-linked magnetic enzymatic aggregates for the synthesis of the sugar D-tagatose from commercial lactose. To this end, this work was carried out in two main stages: (I) production of L-AI by submerged cultivation and (II) preparation of m-CLEAs and m-Combi-CLEAs. The growth of the microorganism, for the production of the LA-I enzyme, was evaluated in (a) shaken flasks (orbital shaker) and in (b) a benchtop bioreactor. The cellular growth of the microorganism was monitored in a culture medium containing whey lactose as an inducer for enzyme production. The use of yeast extract in analytical and industrial grade was also evaluated for comparative purposes. In (a) tryptone was not added to the medium, observing the impact on L-AI production. In (b) aerobic and anaerobic conditions were compared. After 12 hours of cultivation at 37 °C and shaking at 200 RPM, cell disruption was carried out to obtain the enzymatic extract, which was characterized in terms of enzymatic activity, protein concentration and D-tagatose synthesis. For the production of D-tagatose from lactose, we started with the preparation of m-CLEAs from  $\beta$  -GAL, using the commercially available enzyme from *Aspergillus oryzae*. The hydrolysis capacity of m-CLEA from  $\beta$  -GAL was evaluated in the presence of 500 mM lactose. Then, m-CLEAs from L-AI, obtained in this work, were produced, as well as m-Combi-CLEAs containing both co-immobilized enzymes. The results of the experiments demonstrated that industrial yeast extract is a potential substitute for analytical grade yeast

extract. It was also observed that the non-addition of tryptone impaired the growth of the microorganism but did not affect the production of the enzyme. The positive influence of aeration on the growth and production of the enzyme of interest was observed, impacting the amount of D-tagatose produced. Finally, an immobilization yield of 100% was observed for the CLEAs produced, with a lactose conversion of around 99.9%, when m-Combi-CLEA was used, and a bioconversion of D-tagatose around 16%.

**Keywords:** galactose; L-AI; enzymatic immobilization; CLEA; combi-CLEA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparativo da rota química e da rota enzimática para produção de D-tagatose .....	23
Figura 2 – Processo de produção da D-tagatose a partir de lactose envolvendo a atuação de duas enzimas em uma reação em cascata, $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) e L-arabinose isomerase (L-AI) .....	24
Figura 3 – Reações de isomerização catalisadas pela enzima L-arabinose isomerase ..	25
Figura 4 – Representação estrutural da L-arabinose isomerase (L-AI) .....	26
Figura 5 – Árvore filogenética de L-AIs .....	27
Figura 6 – Preparação de agregado enzimático reticulado (CLEA) .....	31
Figura 7 – Preparação de CLEAs magnéticos .....	33
Figura 8 – Fluxograma das fases de produção de biocatalisadores heterogêneos (CLEAs magnéticos) visando a produção de D-tagatose a partir de lactose...	34
Figura 9 – Nanopartículas magnéticas de ferro na ausência (I) e presença de campo magnético (II) .....	39
Figura 10 – Perfil de crescimento da <i>Escherichia coli</i> , BL21, em meio de autoindução em agitador orbital no período de 12 horas, a 37°C, 200 rpm.....	43
Figura 11 – Perfil de concentração de D-tagatose após 8 horas de reação, a 50 °C, em substrato galactose 500 Mm, onde Mc1 corresponde ao meio de referência (detendo o extrato de levedura comercial), Mc2, Mc3 e Mc4 corresponde aos meios modificados cuja formulação detêm respectivamente: meio com extrato de levedura comercial sem adição de triptona; meio com extrato de levedura industrial e meio com extrato de levedura industrial sem adição de triptona .....	47

Figura 12	Cinética de crescimento da <i>E. coli</i> , BL21, em meio de autoindução, durante de 12 horas, a 37°C, 200 rpm. em biorreator de 1L. Mc1 sem aeração (■), Mc1 com aeração (1 L.min-1) (●); Mc3 com aeração (1 L.min-1) (▲), onde Mc1 corresponde ao meio de referência e Mc3 ao meio modificado que utiliza o extrato de levedura industrial ao invés do extrato de levedura comercial.....	48
Figura 13	– Síntese enzimática de D-galactose e D-glicose catalisada por 10 mg da enzima $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizada em m-CLEA e livre. Enzima livre (▲), m-CLEA-S0 =164mM (■), m-CLEA-S0 =500mM (●).....	52
Figura 14	– Massa de 0,3 g do m-Combi-CLEA magnético de L-AI e $\beta$ -GAL utilizado para o ensaio de bioconversão.....	53
Figura 15	– Dados experimentais do ensaio de hidrólise da lactose catalisada pela combinação de 0,3 g m-CLEA de $\beta$ -GAL e 0,3 g de m -CLEA de L-AI (●) comparados a catálise do m-Combi-CLEA de $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,3 g (◆) e do m-Combi-CLEA de $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,6 g (◆); registrando, no período de 24h, a concentração da D-glicose/D-galactose (A), a bioconversão da D-glicose/D-galactose (B) e os subsequente dados de concentração da D-tagatose (C) e bioconversão D-tagatose (D).....	54
Figura 16	– Comparativo da reação combinada de CLEA de L-AI e $\beta$ -GAL (A) com o fenômeno de tunelamento em reações em cascata do Combi-CLEA (B) .....	55
Figura 17	– Bioconversão de D-tagatose catalisadas pela combinação de 0,3 g m-CLEA de $\beta$ -GAL e 0,3 g de m -CLEA de L-AI (●), pelo m-Combi-CLEA de $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,3 g (◆) e pelo m-Combi-CLEA de $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,6 g (◆) no período de 24h, a partir da D-galactose formada.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio (m/v) .....	36
Tabela 2 – Dados de crescimento celular do meio de referência e dos meios modificados em cultivo em agitador orbital por 12h, a 37°C, 200rpm com resultados da atividade enzimática e concentração de proteínas dos extratos lisados de L-arabinose isomerase.....	45
Tabela 3 – Concentração de D-tagatose, atividade enzimática de L-AI e concentração de proteínas dos extratos lisados de L-arabinose isomerase dos cultivos em biorreator, utilizando o meio de referência(Mc1), em condições sem aeração e com aeração ( 1 L.min <sup>-1</sup> ) .....	49
Tabela 4 – Parâmetros de imobilização e atividade da $\beta$ -galactosidase e da L-arabinose isomerase imobilizada .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
IDF	Federação Internacional do Diabetes
GPBio	Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>
JECFA	<i>Expert Committee on Food Additives</i>
ISIR	Sociedade Internacional de Açúcares Raros
L-AI	L-arabinose isomerase
$\beta$ -GAL	$\beta$ -galactosidase
CLEA	Agregado enzimático reticulado
m-CLEAs	Agregado enzimático reticulado magnético
LB	Luria Bertani
LB <sub>amp</sub>	Meio de cultura Luria Bertani suplementado com 100 $\mu$ L.mL <sup>-1</sup> de ampicilina
mNP	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
pI	Ponto isoeletrico
oNPG	Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>D-tagatose: características, aplicações e produção .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>L-arabinose Isomerase: características e aplicações .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Imobilização de enzimas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) .....</i></b>	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Combi-CLEAs .....</i></b>	<b>32</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>CLEAs magnéticos .....</i></b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção e extração da enzima L-arabinose isomerase .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Microrganismo .....</i></b>	<b>35</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Conservação da cultura e preparo do pré-inóculo .....</i></b>	<b>35</b>
<b>4.1.3</b>	<b><i>Produção da enzima L-AI .....</i></b>	<b>35</b>
<b>4.1.4</b>	<b><i>Extração da proteína L-AI .....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização do extrato enzimático .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Quantificação de proteína .....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Atividade enzimática .....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Concentração do extrato enzimático .....</i></b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Formação de agregados enzimáticos reticulados magnéticos .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas .....</i></b>	<b>38</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>Produção de CLEA magnético de <math>\beta</math>-galactosidase .....</i></b>	<b>39</b>
<b>4.3.3</b>	<b><i>Produção de CLEA magnético de L- arabinose isomerase .....</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3.4</b>	<b><i>Produção do Combi-CLEA magnéticos de <math>\beta</math>-galactosidase e L-arabinose isomerase .....</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3.5</b>	<b><i>Determinação da atividade enzimática dos agregados enzimáticos reticulados .....</i></b>	<b>41</b>
<b>4.3.5.1</b>	<b><i>Para <math>\beta</math>-galactosidase .....</i></b>	<b>41</b>
<b>4.3.5.2</b>	<b><i>Para L-arabinose isomerase .....</i></b>	<b>41</b>

4.3.6	<i>Parâmetros de imobilização</i> .....	42
4.4	Estudo da reação em cascata para a produção de D-Tagatose a partir da lactose .....	42
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1	Cinética de crescimento da <i>Escherichia coli</i> em agitador orbital .....	44
5.2	Avaliação do uso alternativo de extrato de levedura industrial e influência da triptona no crescimento de <i>Escherichia coli</i> em frascos agitados (agitador orbital) .....	45
5.2.1	<i>Produção de D-tagatose catalisada pela L-AI obtida nos meios de cultivo modificados</i> .....	46
5.3	Cinética de crescimento da <i>Escherichia coli</i> em biorreator de bancada.....	47
5.4	Preparação de agregados enzimáticos reticulados magnéticos de L-arabinose isomerase e $\beta$ -galactosidase.....	50
5.4.1	<i>Influência da concentração de lactose na cinética de hidrólise catalisada por m-CLEA de <math>\beta</math>-galactosidase</i> .....	51
5.4.2	<i>Bioconversão da lactose</i> .....	53
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
7	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>APÊNDICE A – PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS VINCULADAS A ESTE TRABALHO</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório divulgado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (2022), mais de 1 milhão de pessoas no mundo são obesas. As taxas crescentes de obesidade, má alimentação, falta de atividade física entre outros fatores contribuem para o gradativo aumento dos casos de diabetes. Em 2021, cerca 6,7 milhões de pessoas no mundo, morreram vítimas da diabetes e de suas comorbidades. Segundo o Atlas do Diabetes, da Federação Internacional do Diabetes (IDF) (2021), a doença causou pelo menos US\$ 966 bilhões em gastos com saúde e, até 2045, estima-se que serão 783 milhões de adultos, entre 20 e 79 anos, convivendo com a diabetes.

Desse modo, com o aumento do número de doenças associadas ao consumo de açúcar e/ou gordura, observa-se a necessidade do mercado de realizar mudanças nos ingredientes e nas formulações de alimentos, medicamentos, entre outras substâncias, para proporcionar à população hábitos alimentares e cotidianos que beneficiem a saúde. Nesse âmbito, em virtude do seu baixo poder calórico, propriedades probióticas e baixa capacidade de absorção pelo organismo, não alterando as taxas de açúcar no sangue, (Jayamuthunagai et al., 2017; Bortone; Fidaleo, 2020; Souza, 2020), a D-tagatose pode ser aplicada no tratamento de doenças vinculadas a diabetes, a obesidade e outras doenças metabólicas (Ravikumar et al., 2021), além do tratamento da hemofilia e da anemia (Jayamuthunagai et al., 2017).

Contudo, a ocorrência deste açúcar na natureza é limitada a pequenas concentrações (Xu *et al.*, 2018). A D-tagatose pode ser obtida a partir da isomerização da D-galactose pelo método químico, através do uso de catalizadores de cálcio. Todavia, esta rota apresenta etapas desfavoráveis a uma química verde e de baixo custo, com a produção de resíduos e subprodutos que demandam a necessidade de tratamentos específicos e complexos para descarte (Oh, 2007; Ravikumar et al., 2021). Desse modo, visando a produção de D-tagatose em escala industrial, é possível aplicar a via enzimática para obtenção deste produto (Xu *et al.*, 2018). Entre os biocatalizadores requeridos, o mais utilizados é a L-arabinose isomerase (L-AI), cuja substrato é a D-galactose, a qual pode ser obtida pela síntese da lactose pela enzima de  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL)(Ravikumar et al., 2021).

Entretanto, a utilização de enzimas, no ponto de vista industrial, é desafiadora devido à falta de estabilidade a longo prazo e a possibilidade de recuperação e reutilização dessas enzimas, geralmente aplicadas em sua forma livre (Sheldon, 2019).

Para remediar essa problemática, uma alternativa é a imobilização enzimática, pois viabiliza a recuperação e reutilização de enzimas, conduzindo a um melhor desempenho

do biocatalisador em condições adversas de operação, favorecendo uma maior estabilidade térmica e operacional (RicardI, 2021). Entre os diversos métodos de imobilização, destaca-se a reticulação de agregados formados por moléculas de proteína, de modo que as enzimas são imobilizadas sem a presença de um suporte, apresentando altas produtividades e reduzindo o custo de um suporte (Sheldon, 2019; Rai; Kumar; Yadav, 2021). Além disso, a metodologia permite um processo de biocatálise multiuso, os Combi-CLEAs, no qual se pode associar em um único agregado duas ou mais enzimas que reagem em um sistema em cascata. Pode-se ainda adicionar propriedades magnéticas aos CLEAs (m-CLEAs), facilitando a separação dos agregados de outros sólidos com a utilização de ímãs (Sheldon, 2019).

Desse modo, dado o potencial tecnológico industrial para a preparação de agregados enzimáticos reticulados com propriedades magnéticas e sua utilização em processos de biocatálise, nosso grupo de pesquisa GPBio (Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) vem estudando a preparação de biocatalisadores utilizando a enzima L-arabinose isomerase, como apontado por Sousa (2015) e Souza (2020), e  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* por Freitas (2022) e Ribeiro (2023), buscando desenvolver metodologias eficazes e sustentáveis para a produção de D-tagatose visando a aplicação em processos de síntese em escala industrial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo a co-imobilização das enzimas L- arabinose isomerase e  $\beta$ -galactosidase em agregados enzimáticos magnéticos reticulados para a síntese integrada do açúcar D-tagatose a partir da lactose comercial.

### 2.2 Específicos

- Quantificar o crescimento celular do microrganismo *Escherichia coli*, BL21, e produção da enzima L-arabinose isomerase recombinante em agitador orbital;
- Avaliar o efeito da aeração na produção da enzima L-arabinose isomerase e no crescimento celular do microrganismo em biorreator de bancada;
- Investigar os efeitos sistemáticos, na produção da L-AI, da substituição do extrato de levedura de grau analítico por um extrato de levedura industrial, de menor grau de pureza, e a influência da triptona do meio de cultivo;
- Caracterizar o extrato enzimático de L-AI produzido por cultivo submerso quanto à atividade enzimática e concentração de proteínas;
- Produzir CLEAs magnéticos (m-CLEA) de  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) e L-AI;
- Avaliar o m-CLEA de  $\beta$ -galactosidase na produção de galactose na concentração a partir de 500 mM de substrato (lactose);
- Produzir m-Combi-CLEAs de L-AI e  $\beta$ -GAL e aplicar na reação em cascata para a produção de D-tagatose a partir de lactose.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 D-tagatose: características, aplicações e produção

A indústria nos mais diversos setores busca atender a demanda de seus consumidores. Para tal, é necessário, muitas vezes, realizar mudanças nos ingredientes das formulações de alimentos, medicamentos entre outras substâncias, que se volta para hábitos alimentares e cotidianos que beneficiem a saúde. Nesse contexto, a D-tagatose, segundo Oh (2007), tem se destacado dado seus benefícios a saúde e propriedades similares à sacarose, podendo, também ser utilizada como intermediário para síntese de compostos opticamente ativos e como aditivo nas formulações de detergentes, cosméticos e fármacos (Ibrahim; Spradlin, 2000).

A ocorrência da D-tagatose na natureza foi registrada a primeira vez na goma da *Sterculia setigera*, uma espécie de árvore encontrada comumente nas savanas do Sudão e da Guiné da África Tropical (Hirst; Hough; Jones, 1949). Pequenas quantidades de D-tagatose também foram observadas em diversos alimentos, como queijos, iogurtes, chocolate quente, leite em pó esterilizado e outros derivados de produtos lácteos (Mendoza; Olano; Villamiel, 2005; Richards; Chandrasekhara, 1960; Troyano; Martinezcastro; A Olano, 1992).

Em 2001, a D-tagatose recebeu o status de “Geralmente Reconhecida como Segura” (GRAS) pela *American Food and Drug Administration* (FDA) e é aprovada como segura pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) desde 2004 (Levin, 2002), sendo definida como um açúcar raro, pela Sociedade Internacional de Açúcares Raros (ISIR) de acordo com Guerrero-Wyss; Agüero; Dávila (2018), sendo utilizado como adoçante em iogurtes, chocolates, refrigerantes, cremes, balas dietéticas, gomas de mascar, cereais, barras saudáveis e bebidas à base de leite, nas indústrias de panificação e confeitaria (Buemann *et al.*, 2000; Guerrero-Wyss; Agüero; Dávila, 2018), além de deter o potencial como intensificador de sabor em alimentos (Jayamuthunagai *et al.*, 2017b).

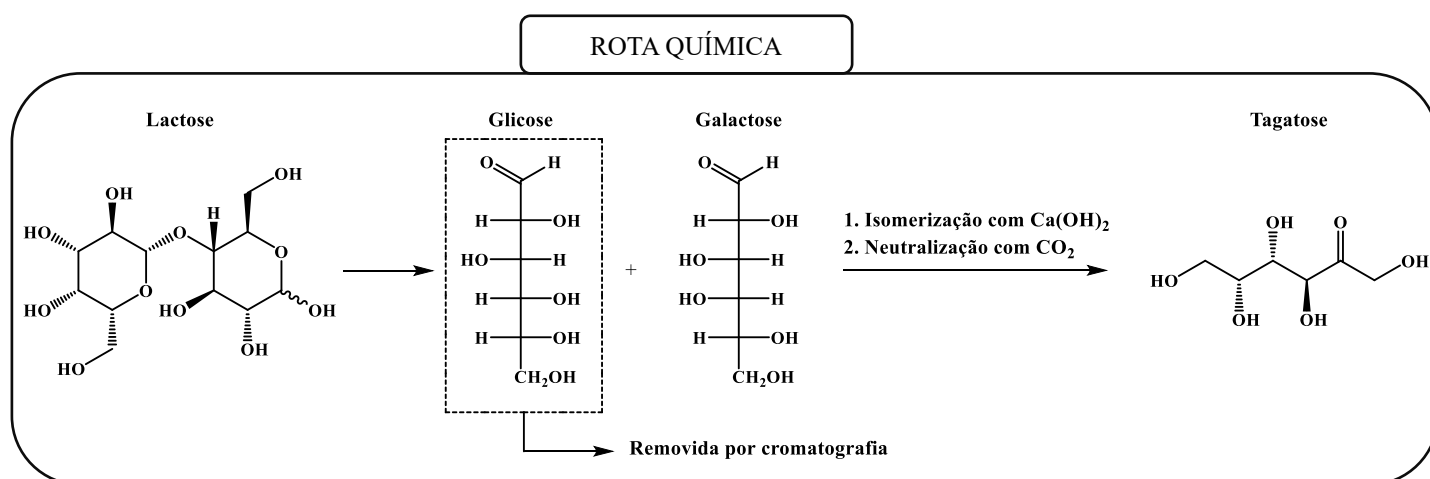
Esse monossacarídeo vem sendo amplamente pesquisado como um adoçante alternativo a sacarose (Jayamuthunagai *et al.*, 2017a), pois comparado, possui 30% do conteúdo energético e 92% de doçura (Jayamuthunagai *et al.*, 2017b). Em virtude do seu baixo poder calórico, propriedades prebióticas, anti-biofilme, anti-halitose, anti-placa, apresentando características, como: não cancerígeno, efeito hemolítico não genotóxico (Bertelsen; Jensen; Buemann, 1999; Cisar; Kolenbrander; McIntire, 1979; Lærke; Jensen; Højsgaard, 2000), promovendo a perda de peso (Buemann *et al.*, 2000) e não alterando as

taxas de açúcar no sangue (Donner; Wilber; Ostrowski, 1999; Seri *et al.*, 1993 ), a D-tagatose é apontada no tratamento de doenças associados ao diabetes tipo 2, obesidade, hiperglicemia, anemia, hemofilia e cárie dentária (Levin 2002 ; Moore 2006; Seri *et al.*, 1993), sendo também considerada por pesquisadores como antioxidante e crioprotetor (Donner; Wilber; Ostrowski, 1999; Levin, 2002 ).

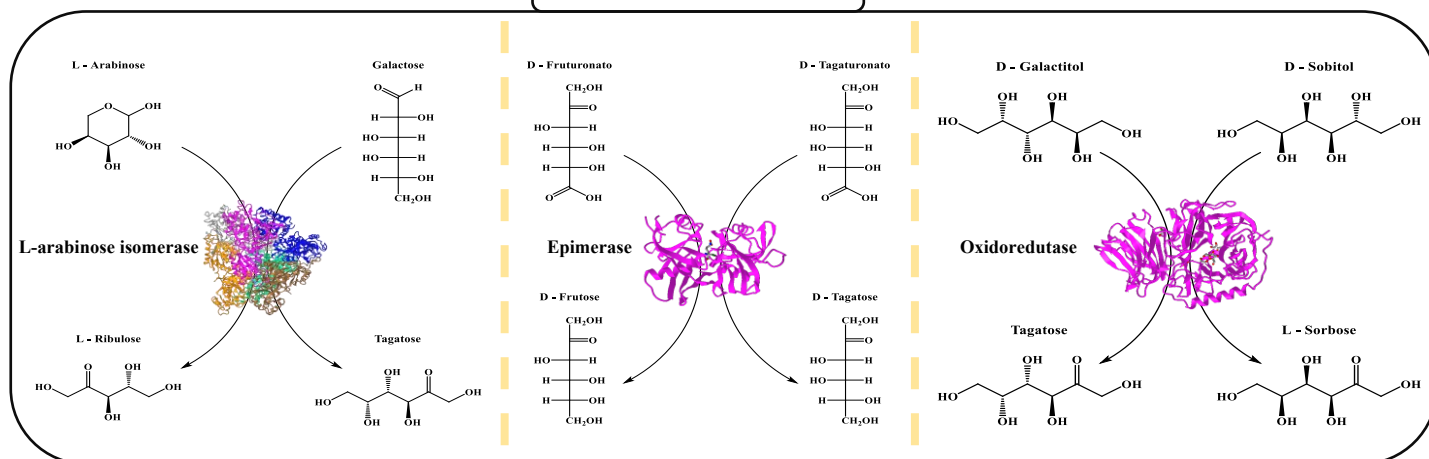
Todavia, apesar dos benefícios e da gama de aplicabilidades, a disponibilidade de D-tagatose, na natureza, é limitada a pequenas concentrações (Ravikumar *et al.*, 2021), de modo que a sua obtenção pode ser viabilizada pela rota química, no qual se utiliza a galactose como matéria prima em um processo de isomerização para formação do complexo-D-tagatose por meio de uma reação com cálcio ou hidróxido de sódio, utilizando cloreto de cálcio/sódio como catalisador ( Beadle, Saunders, & Wajda, 1992 ). Contudo, essa via apresenta etapas complexas de purificação, além da formação de resíduos químicos e subprodutos (Oh, 2007), envolvendo alto custo no tratamento de resíduos impedindo o uso extensivo de métodos químicos para a síntese D-tagatose ( Roy *et al.*, 2018 ).

Em contrapartida, a fim de superar os desafios que ocorrem na produção química, a rota biológica, com a utilização de enzimas, biocatalizadores, para converter D-galactose em D-tagatose, tem atraído pesquisadores a descobrir novas maneiras de sintetizá-la de modo mais barato e ecológico. (Ravikumar *et al.*, 2021).

Figura 1 – Comparativo da rota química e da rota enzimática para produção de D-tagatose



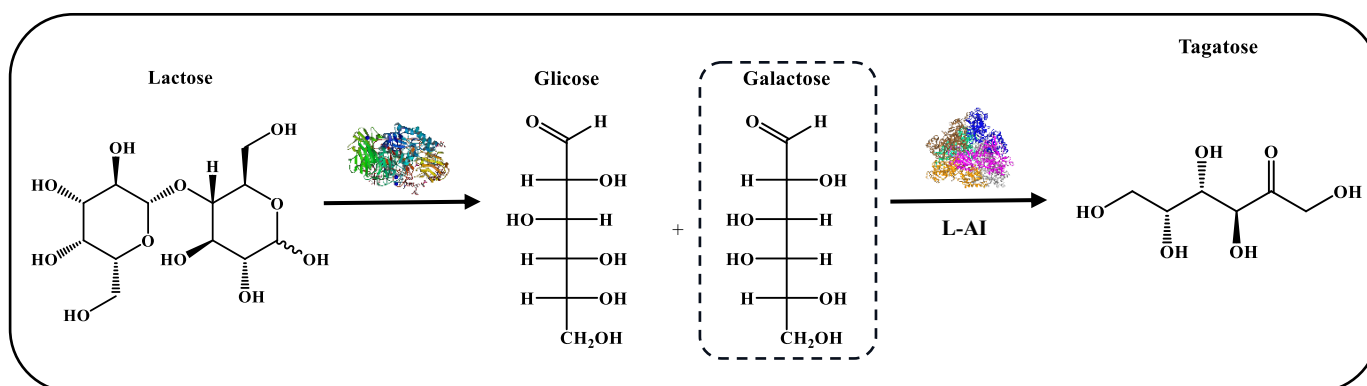
## ROTA ENZIMÁTICA



Fonte: Ravikumar *et al.*, (2021) com adaptação da autora.

A Figura 1 salienta a produção de D-tagatose pela rota da produção química e biológica, onde se pode observar, na rota enzimática, a produção de tagatose pelas enzimas: L- arabinose isomerase, epimerases e oxidoreductases. Entretanto, dentre os biocatalisadores, a L -arabinose isomerase (L-AI) tem sido a mais utilizada para a produção de D-tagatose, visto que o substrato requerido pelo L-AI é a D-galactose, que pode ser facilmente obtida a partir de matérias-primas contendo lactose (Oh, 2007), cuja método de produção, viabilizado pela lactose, é demonstrado na figura 2, onde pode-se observar a aplicação de  $\beta$ -galactosidases na quebra da lactose para formar uma fração D-glicose e uma D-galactose ( Freitas *et al.*, 2011; Guerrero; Vera; Illanes, 2017; Soupioni *et al.*, 2013 ), de modo que a galactose formada é isomerizada em D-tagatose pela L-arabinose isomerase.

Figura 2 – Processo de produção da D-tagatose a partir de lactose envolvendo a atuação de duas enzimas em uma reação em cascata,  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) e L-Arabinose Isomerase (L-AI)

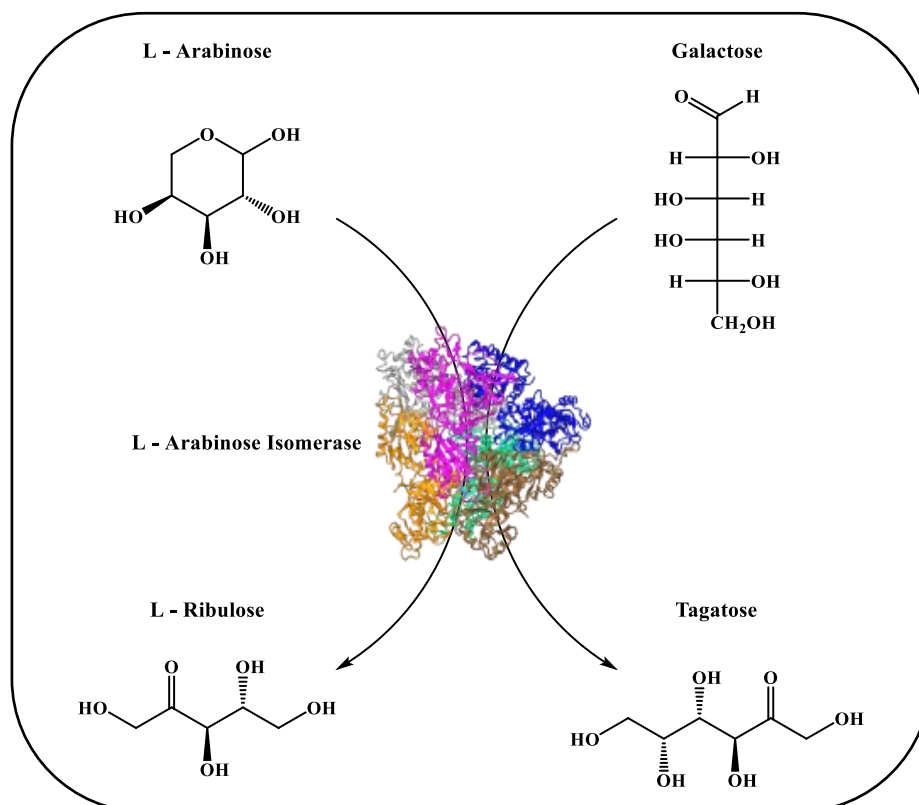


Fonte: Elaborado pela autora.



Dentre os três diferentes métodos de produção de D-tagatose, a utilização da l-arabinose isomerase, para isomerização da D-galactose, apresenta-se como a escolha mais viável e econômica para produção em larga escala. No entanto, devido a configurações de substrato semelhantes, L-AI também pode converter L-arabinose em L-ribulose (Heath, Hurwitz, Horecker, & Ginsburg, 1958 ; Roh *et al.*, 2000 ), Figura 3.

Figura 3 - Reações de isomerização catalisadas pela enzima L-arabinose isomerase



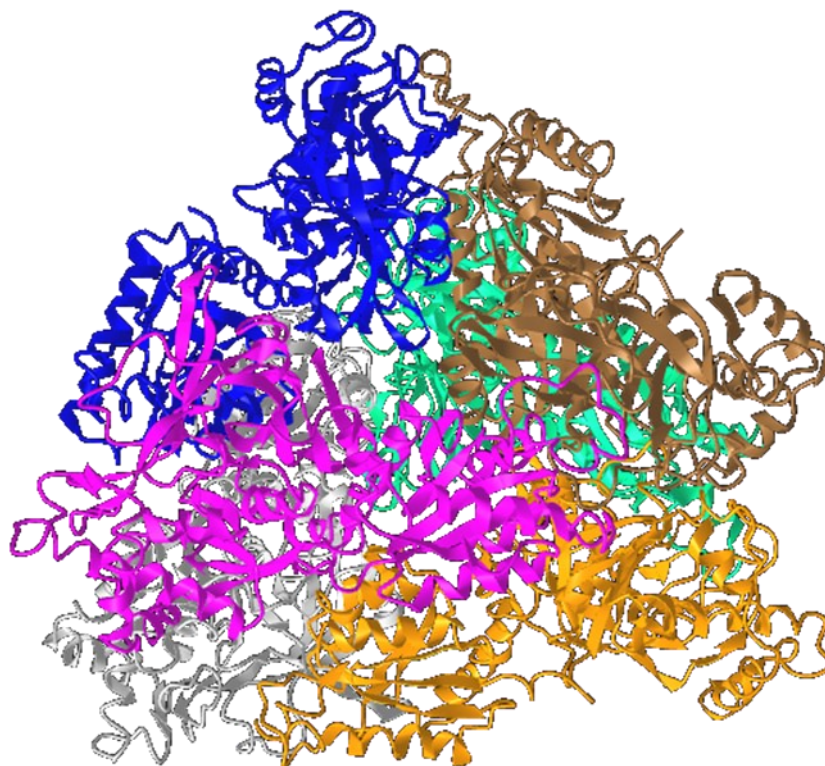
Fonte: Xu *et al.*, 2018, com adaptação da autora.

Atualmente, os pesquisadores estão caracterizando L-AI de diversas bactérias para melhorar a biossíntese da D-tagatose em escala industrial, de modo que se pode observar, de acordo com Ravikumar *et al.* (2021), o aumento do número de estudos acerca das estratégias de bioconversão ou biossíntese na produção de D-tagatose, além de pesquisas na manipulação de L-AIs, adequando-as para operação em pHs variados, temperaturas e possibilidades de modificação de células inteiras para aproveitar a lactose presente em resíduos agroindustriais para obtenção de um processo de produção mais barato .

### 3.2 L-arabinose Isomerase: características e aplicações

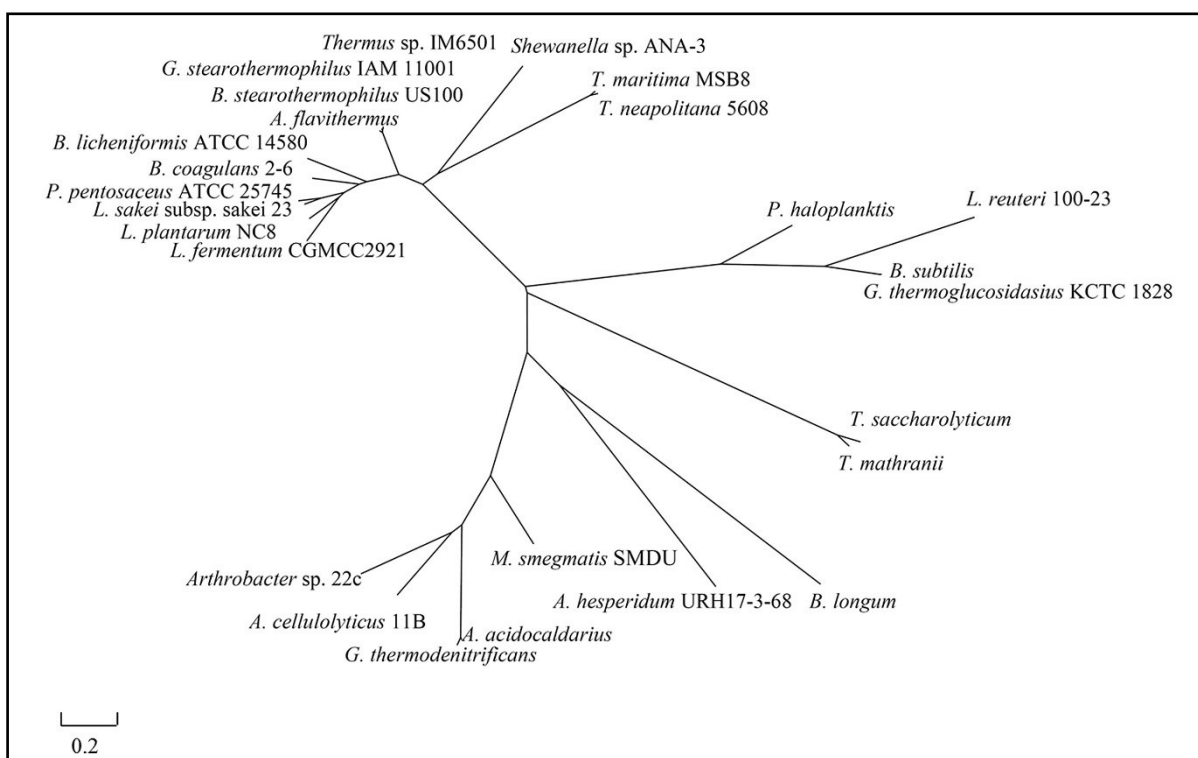
A L-arabinose isomerase, Figura 4, é um biocatalizador comumente requerido para a produção de D-tagatose *in vitro* utilizando a D-galactose como substrato (Roh et al., 2000), pode ter sua origem dos mais diversos microrganismos incluindo bactérias psicrotolerantes, mesófilas, termofílicas e hipertermófilas, detendo características particulares, como: a termoestabilidade, um pH ideal levemente ácido, tolerância ao frio, dependência de metais, exigência de uma fonte de qualidade alimentar para produção e especificidade do substrato (Xu *et al.*, 2018), entretanto, ainda é uma enzima não comercialmente disponível com aplicação potencial na produção de L-ribulose e D-tagatose (Jayamuthunagai *et al.*, 2017). Diante desse cenário, dado o potencial das L-AIs e a sede de aumentar suas propriedades catalíticas e de estabilidade para aplicações industriais, despertou-se o interesse em conhecer as funções mecanistas dessa enzima, de modo que, vários estudos foram realizados, até mesmo, para rastrear as melhores cepas produtoras de L-AI envolvendo a expressão recombinante de genes de L-AI em hospedeiros favoráveis (Choi *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2002, Kim; Oh, 2005).

Figura 4 – Representação estrutural da L-arabinose isomerase (L-AI)



A princípio, o conhecimento da engenharia enzimática foi aplicado para melhorar a atividade catalítica e alterar a regioseletividade, entretanto, pouco a pouco, o escopo dessa técnica foi ampliado para fixar a estabilidade de enzimas com base na temperatura, pH e solventes orgânicos (Badenhorst; Bornscheuer, 2018; Bornscheuer *et al.*, 2012 ). De acordo com Ravikumar *et al.* (2021), na última década, a caracterização de numerosas L-AIs de uma ampla gama de microrganismos e o extenso número de estudos de engenharia de proteínas permitiu que pesquisadores pudessem realizar alterações nas propriedades da enzima. Apesar de isso não garantir a aplicação das L-AIs em processos de grande escala, a possibilidades de descobrir L-AIs, com alta afinidade para D-galactose, levaram os pesquisadores a manipularem e verificarem a influência da temperatura nas reações, de modo que, até o momento, várias fontes enzimáticas de L-AIs foram relatadas e patenteadas (Ravikumar *et al.*, 2021. Na Figura 5, como explanado por Xu e seus colaboradores (2018) é possível observar a árvore filogenética de L-AIs relatados das mais variadas fontes, onde aproximadamente 30 L-AIs são caracterizadas por uma sequência de aminoácidos conhecida, revelando vários graus de homologia que variam de 40 a mais de 60% da identidade de sequência, exceto pelas L-AIs da espécie *Thermotoga*, que exibem menos de 30% de identidade de sequência com outros L-AIs.

Figura 5 - Árvore filogenética de L-AIs



Fonte: Xu *et al.* (2018).

Quase todas as L-AIs relatadas mostram especificidades para L-arabinose e D-galactose; de modo que a especificidades para L-arabinose são muito maiores do que aquelas para D-galactose. As L-AIs de *B. subtilis* str. 168 (Kim *et al.*, 2010) e *P. haloplanktis* ATCC 14393 (Xu *et al.*, 2016), por exemplo, mostram especificidade apenas para L-arabinose, de modo que não convertem D-galactose em D-tagatose. De acordo com Fan *et al.* (2014), reação de isomerização catalisada por L-AI, entre D-galactose e D-tagatose, é um processo de equilíbrio que é especialmente afetado pela temperatura, uma vez que o processo de isomerização da D-galactose requer uma alta energia livre de Gibbs ( $4,96 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), o que resulta na necessidade de uma alta temperatura de reação (Lee *et al.*, 2004, Hong *et al.*, 2007), visto que temperaturas de reação elevadas (acima de  $50^\circ\text{C}$ ) não apenas aumentam a solubilidade dos substratos, reduzem a viscosidade das misturas de reação e melhoram a taxa de reação, mas também tendem a deslocar o equilíbrio em direção aos produtos (Fan *et al.*, 2014).

Em contrapartida, condições alcalinas aumentam significativamente a possibilidade de reações químicas em temperaturas elevadas, especialmente o escurecimento de Maillard (Cardodo *et al.*, 2018). Desse modo, L-AIs termoestáveis com um pH ótimo ligeiramente ácido têm um grande potencial para aplicações industriais, tendo as vantagens de taxas de reação mais rápidas, mudanças de equilíbrio em direção a D-tagatose e formação reduzida de subprodutos indesejados. No entanto, a maioria dos L-AIs relatadas exibem atividade máxima em valores de pH neutros ou alcalinos (Xu *et al.*, 2018). Diante disso, pesquisas anteriores deflagram a influência do  $\text{Mn}^{2+}$  no aumento da estabilidade da enzima em altas temperaturas e pH extremo, frequentemente preferido em ambientes industriais (Robinson, 2015).

Embora as L-AIs hipertermófilas sejam altamente eficazes na produção comercial de tagatose, certas propriedades limitam sua aplicação, como a formação de cor em temperaturas mais altas, levando à reação de escurecimento (acima de  $70^\circ\text{C}$ ) e à necessidade de íons metálicos (especialmente  $\text{Co}^{2+}$ ) que não são permitidos em alimentos (Kim, 2004; Lee *et al.*, 2004) enquanto  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são cátions não tóxicos empregados preferencialmente por bactérias mesófilas e, portanto, mais viáveis para produção industrial D-tagatose (Rhimi *et al.*, 2010), desse modo, por meio da engenharia de proteínas, sondando um L-AI de um organismo residente em uma fonte termal, pode-se converter L-AI mesofílicas em enzima termofílicas. (Ravikumar *et al.*, 2021; Rhimi *et al.*, 2010)

A produção de um recombinante L-AI representa uma vantagem tecnológica, não só pelo alto rendimento de produção que pode ser obtido, mas também pela possibilidade de

modificar a enzima por técnicas de engenharia genética. Sousa *et al.* (2017), por exemplo, selecionaram o gene *araA* de *E. faecium* DBFIQ E36 para a produção de L-AI criando um novo gene *araA* sintético com códons otimizados para alcançar uma expressão ideal na heteróloga em *Escherichia coli* hospedeiro, visto que a produção de L-AI no hospedeiro nativo era baixa e não adequada para fins industriais e que a *Escherichia coli* (*E. coli*) pode usar L-arabinose como única fonte de carbono e energia porque possui um *operon* L-arabinose (também chamado de *operon araBAD*) que codifica proteínas necessárias para a captação e catabolismo de L-arabinose (Lee *et al.*, 2014; Schleif, 2000) além de ser um microrganismo de fácil cultivo com pH ótimo próximo a neutralidade e temperatura ideal entre 35 e 40 °C, apresentando rápido crescimento com fontes de energia de baixo custo e em condições tanto anaeróbicas como aeróbicas, sendo utilizada para produção dos principais medicamentos recombinantes como insulina, hormônio do crescimento e vacinas, bem como, potencial energético na produção de combustível renovável e no armazenamento de dados na área de bioinformática (Fonseca, 2017).

### 3.3 Imobilização de enzimas

A utilização de biocatalizadores vem sendo amplamente difundida nas indústrias farmacêuticas, químicas, de biocombustíveis e de alimentos (Toledo, 2023). Contudo, no ponto de vista das aplicações industriais, a reutilização de enzimas ou de células contendo biocatalizadores é desafiante uma vez que seu isolamento de sistemas de reação é complicado e caro (Homei *et al.*, 2013). Desse modo, uma alternativa a essa questão é a imobilização enzimática, pois viabiliza a recuperação e reutilização de enzimas em processos contínuos, deflagrando um melhor desempenho do biocatalisador em condições adversas de operação, apresentado uma maior estabilidade térmica e operacional (Ricardi, 2021).

Sheldon (2019) afirma que os métodos de imobilização podem ser divididos em três tipos: a imobilização em um suporte pré-fabricado, no qual se utiliza uma resina orgânica ou sílica; o aprisionamento em uma matriz polimérica que é gerada na presença da enzima e a ligação cruzada de moléculas enzimáticas. A ligação de enzimas a transportadores envolvem interações hidrofóbicas ou iônicas ou ligação covalente (Cao, 2005) contudo, uma desvantagem das enzimas ligadas a um suporte é a sua baixa produtividade, devido à grande quantidade de lastro não catalítico (geralmente em torno de 90 a 99% da massa total), além do custo do suporte que muitas vezes é substancialmente maior do que a da própria enzima (Cao; Van Langen; Sheldon, 2003). Em contraste, a imobilização por reticulação de moléculas

enzimáticas proporciona enzimas imobilizadas livres de carreadores com altas produtividades e evitando os custos de um suporte. Normalmente, alguma perda de atividade é observada na imobilização, mas o aumento da estabilidade juntamente com a reutilização, proporcionando reduções dramáticas de custo é compensatório, em comparação com a enzima solúvel (Dicosimo *et al.*, 2013). Do mesmo modo, uma vez que a maioria dos processos biocatalíticos é realizado aproximadamente nas mesmas condições de temperatura e pressão (ambiente), várias etapas biocatalíticas podem ser integradas em processos enzimáticos em cascata (Sheldon, 2019) e a co-imobilização de duas ou mais enzimas fornece catalisadores sólidos multifuncionais capazes de catalisar esses processos em cascata (Mateo *et al.*, 2006)

Nesse contexto, a produção de D-tagatose utilizando células/enzimas imobilizadas é uma abordagem com potencial para intensificar o processo de fermentação de acordo com Kim *et al.*, (2003), apresentando vantagens, como: uma maior tolerância a condições adversas, como a pressão osmótica, e intermediários tóxicos, aumento da produtividade volumétrica de D-tagatose, maior estabilidade e capacidade de reutilização e redução da complexidade da etapa de recuperação e purificação do produtos de interesse (Dicosimo *et al.*, 2013 ; Fernandez-Lafuente, 2019 ), de modo que a imobilização da L-AI e da  $\beta$ -GAL, enzimas que atuam no processo de produção da D-tagatose, em agregados enzimáticos reticulados é uma alternativa que permite manter todas as subunidades das enzimas ligadas entre si (Yadav, 2021).

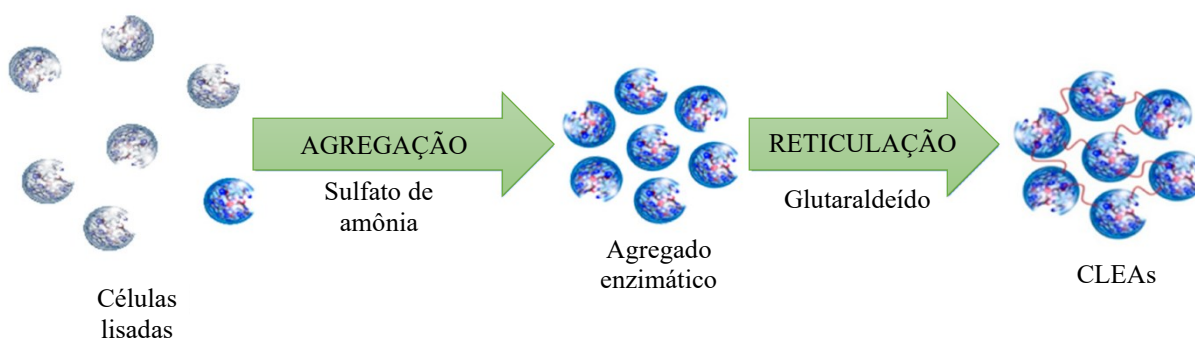
### **3.3.1 Agregados enzimáticos reticulados (CLEAs)**

O termo agregados enzimáticos reticulados, do inglês “*cross-linked enzyme aggregates*” (CLEAs), surgiu no ano 2000 e foi uma tecnologia comercializada pela empresa de biotecnologia industrial, CLEA Technologies BV. De acordo com Sheldon (2019), a metodologia CLEA combina purificação e imobilização de enzimas em uma única operação unitária, pois o CLEA pode ser produzido a partir do lisado celular bruto obtido do caldo de fermentação, sem a necessidade de processamento intermediário ou purificação, o que torna a sua produção mais econômica. Além disso, os CLEAs são recicláveis e sua aplicação registra um aumento significativo no armazenamento e na estabilidade operacional, uma vez que as moléculas de enzima em CLEAs são ligadas por ligações covalentes e não há lixiviação de enzima em meio aquoso, mesmo sob condições drásticas. A produção de CLEAs exibe altas produtividades de catalisador (kg de produto por kg de enzima) em comparação com enzimas ligadas ao transportador e os custos do lastro do transportador são evitados. Muitos estudos

comprovam o êxito dessa metodologia ao ser aplicadas nas mais diversas enzimas das cinco classes enzimáticas - hidrolases, oxidoredutases, liases, transferases e isomerases - utilizadas na fabricação de produtos químicos e outras aplicabilidades, todavia o protocolo deve ser otimizado para cada enzima (Sheldon, 2007, 2010, 2011; Yamaguchi; Kiyota; Miyazaki, 2018).

A preparação de CLEAs envolve a etapa de precipitação dos agregados físicos de uma solução em tampão aquoso e a etapa de reticulação desses agregados físicos com um agente de reticulação bifuncional, Figura 6. A etapa de precipitação é instantânea e muito mais rápida do que a etapa de reticulação (Sheldon, 2019). O agente precipitante pode ser um sal, como sulfato de amônio ou sulfato de sódio, um solvente orgânico miscível em água ou um polímero não iônico, como polietileno glicol (PEG). Entretanto, Como o sulfato de amônio é comumente utilizado para purificar enzimas e dado o seu bom desempenho com a maioria dos biocatalizadores, muitos pesquisadores optam por utilizar esse sal como precipitante enzimático, visto que solventes orgânicos miscíveis em água, por exemplo, não são aprazíveis ambientalmente (Sheldon, 2019).

Figura 6 - Preparação de agregado enzimático reticulado (CLEA)



Fonte: Sheldon (2019).

Quanto ao reticulante, opta-se, geralmente, pelo glutaraldeído, em virtude do seu baixo custo, alta eficiência e estabilidade e aplicabilidade na reticulação de proteínas detendo o status GRAS para uso, entre outras ações, no processamento de alimentos e bebidas (Kosseva, *et al.*, 2009; Sheldon, 2019), pois é uma substância hidrofílica, de biodegradação rápida, não bioacumulativa e com limitada persistência no ar, solo e água (São Paulo, 2007). Embora a química seja complexa e não totalmente compreendida, a reticulação envolve a reação de grupos amino livres na superfície de moléculas enzimáticas vizinhas, com

oligômeros ou polímeros de glutaraldeído, geralmente realizadas em pH 7,0 a 9,0 (Kosseva, *et al.*, 2009; Sheldon, 2019).

A proporção molar de reticulante para enzima influencia a atividade, estabilidade e tamanho de partícula do CLEA resultante. Se a proporção for muito baixa, não ocorre reticulação suficiente, proporcionando um CLEA muito flexível e instável em relação à lixiviação em água. Se for elevado, a reticulação excessiva pode causar uma perda completa da flexibilidade da enzima, resultando em uma baixa recuperação da atividade. O tempo de reticulação também influencia na recuperação da atividade, no tamanho de partícula e na morfologia dos CLEAs. O tamanho de partícula de um CLEA também pode aumentar com o envelhecimento inferindo que o processo de reticulação não foi completo (Li *et al.*, 2021; Pchelintsev; Youshko; I-Vedas, 2009; Sheldon, 2019).

### 3.3.2 *Combi-CLEAs*

O termo Combi-CLEA é aplicado para a co-imobilização de duas ou mais enzimas em um único CLEA, com o único propósito de realizar duas ou mais biotransformações sequenciais (Sheldon, 2019). Esses processos em cascata multienzimática (Muschiol *et al.*, 2015; Schrittwieser *et al.*, 2011; Xue, Woodley, 2012; Santacoloma, 2010), têm inúmeros benefícios potenciais no contexto da produção industrial (Bruggink; Schoevaart; Kieboom, 2003), como: menos operações unitárias, menos solvente e reator, tempos de ciclo mais curtos, maiores rendimentos volumétricos e de espaço-tempo e menos desperdícios. Além disso, ao acoplar as etapas, equilíbrios desfavoráveis podem ser direcionados para o produto de interesse, uma vez que essas etapas estão mais facilmente integradas em um único processos, de modo que, a co-imobilização de enzimas em combi-CLEAs, pode aumentar significativamente as taxas de cascatas biocatalíticas sequenciais, simulando a proximidade existente nas células microbianas, o que se tornou conhecido como canalização sequencial de substratos (Quin, *et al.*, 2017; Sheldon, 2011).

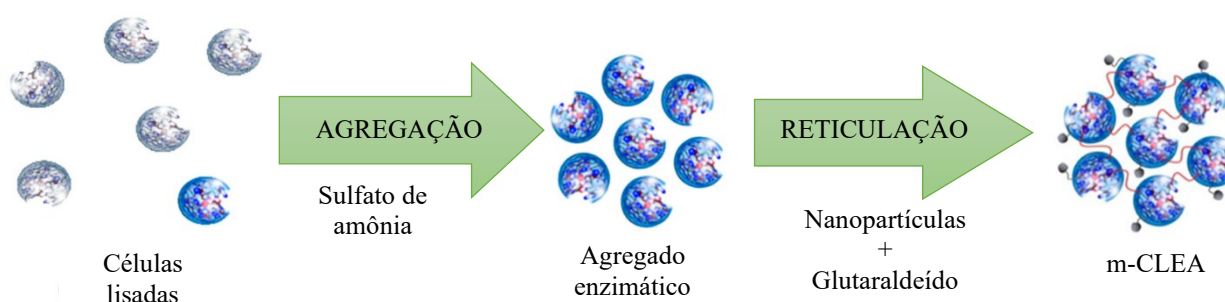
### 3.3.3 *CLEAs magnéticos*

Agregar a característica magnéticas em CLEAs utilizando nanopartículas (Figura 7), além de ser uma técnica de baixo custo (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2014; Hero *et al.*, 2020; Zucca; Sanjust, 2014), é um recurso que surgiu para superar as limitações acerca da recuperação do biocatalisador do meio reacional, como consequência da baixa resistência



mecânica do CLEA. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (mNP) facilitam a reutilização e a preservação da estabilidade da enzima, em comparação com os sistemas convencionais, nos quais a centrifugação/filtração é a única opção para separar a enzima do produto, podendo levar à lixiviação/instabilidade da enzima devido à mecânica de cisalhamento ao misturar o *pellet* com tampão no início de uma nova reação, além disso a adição de nanopartículas em CLEAs não modifica o sítio ativo na estrutura da enzima (Abdulhamid *et al.*, 2021).

Figura 7 - Preparação de CLEAs magnéticos



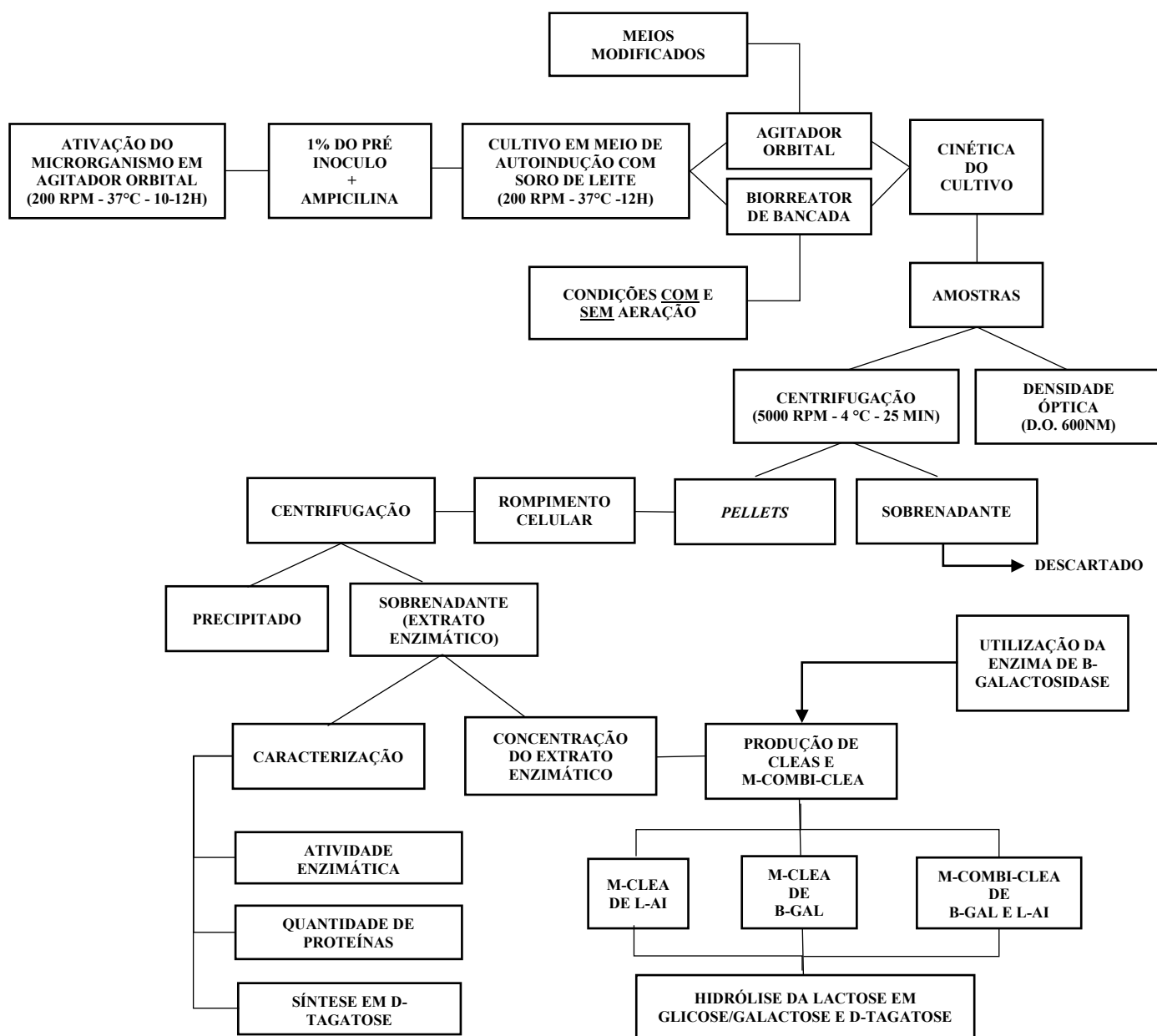
Fonte: Sheldon (2019).

De acordo com Sheldon (2019), a tecnologia do CLEA tem angariado resultados positivos na imobilização de diversos biocatalizadores aplicadas na conversão de carboidratos, permitindo a reciclagem múltipla das enzimas de modo que a tendência, no âmbito industrial, seja a utilização de Combi-CLEAs e CLEAs magnéticos aplicadas para processos de conversão de carboidratos no processamento tradicional de alimentos e bebidas e na produção de biocombustíveis.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 8 apresenta as principais etapas desenvolvidas nesse estudo.

Figura 8 – Fluxograma das fases de produção de biocatalisadores heterogêneos (CLEAs magnéticos) visando a produção e D-tagatose a partir de lactose



Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.1 Produção e extração da enzima L-arabinose isomerase

### 4.1.1 Microrganismo

Cepas recombinantes de *Escherichia coli*, BL21, contendo os genes para L-AI (Laiso\_pET302/NT-His) de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36, foram utilizadas para a expressão da enzima L-arabinose isomerase (L-AI), conforme reportado por Manzo *et al.* (2013, 2019).

### 4.1.2 Conservação da cultura e preparo do pré-inóculo

As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) foram preservadas a -80 °C, em meio Luria Bertani (LB) (composição por litro: 10g triptona, 5g extrato de levedura e 5g NaCl), contendo ampicilina (100 µg/mL) e 20% (v/v) de glicerol, como agente crioprotetor.

Em todos os cultivos realizados, a ampicilina foi utilizada como antibiótico afim de assegurar o crescimento exclusivo do microrganismo de interesse. Desse modo, a princípio, as cepas de *E.coli* foram ser reativadas em caldo LB (proporção: 50 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL) em agitador orbital, no período de 8-12h a 37 °C. Em seguida, o microrganismo, já ativado, foi repicada em placas, contendo meio LB<sub>amp</sub> e 2% (p/v) de ágar bacteriológico, e mantidas durante 24h a 37 °C em estufa bacteriológica (Modelo SP-101 - SPLABOR).

Para o preparo do pré-inóculo, utilizou-se o meio LB<sub>amp</sub> (proporção: 50 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL), esterilizado por 10 minutos, a 110 °C, no qual incorporou-se alçadas de colônias isoladas ao meio. Os frascos foram incubados durante 10-12h a 37 °C, em agitador orbital a 200 rpm, para que se atingisse uma densidade ótica (D.O.), cuja diluição a 600 nm, permanecesse entre 1,6 -1,7 Todas as etapas foram desenvolvidas em ambiente estéril.

### 4.1.3 Produção da enzima L-AI

Para produção da enzima L-AI, em todos os meios de cultivos preparados nesse estudo, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Studier (2005) e adaptada por Souza (2020), sem a utilização de elementos traços. Neste protocolo, a lactose proveniente do soro de leite é utilizada como indutor disponível no meio, para incitar a produção da proteína de

interesse. Para tal, utilizou-se um soro de leite em pó adquirido da empresa “Ingredientes online”.

Visto que o soro de leite é rico em proteínas que podem interferir na síntese enzimática da L-AI, fez-se necessário realizar uma etapa de pré-tratamento visando a remoção dessas macromoléculas, nesse intuito, utilizou-se a metodologia proposta por Lima (2013). Para essa etapa, aplicou-se uma quantidade de soro de leite que fornecesse uma concentração de 4 g/L de lactose. O soro de leite hidratado foi mantido em banho-maria sob agitação. Ao atingir a temperatura de 85 °C, utilizou-se ácido láctico 0,5 M para corrigir o pH da solução para 4,8. Após atingir a temperatura de 90 °C, a solução foi reservada e mantida em repouso até que se observasse a formação de precipitado. Após sedimentação das proteínas, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e suplementada com os componentes descritos na Tabela 1, em seguida, foi esterilizada em autoclave por 10 minutos, a 110 °C. Na capela de fluxo laminar, já em temperatura ambiente (25 °C), adicionou-se o antibiótico ampicilina (100 µg/mL).

Tabela 1- Composição do meio (m/v).

<b>Composição do meio</b>	<b>Concentrações</b>
Triptona	1%
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	0,05%
Glicerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	0,50%
Extrato de Levedura	0,50%
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	2,0 mM
Cloreto de amônia (NH <sub>4</sub> Cl)	5,0 mM
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25,0 mM
Fosfato mono potássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	25,0 mM
Fosfato de Sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	50,0 mM

Fonte: Souza (2020).

Foram aplicados dois métodos para o crescimento do microrganismo e produção da enzima L-AI: agitador orbital e biorreator de bancada. Em ambas as metodologias, o crescimento do microrganismo foi conduzido por 12h, a 37 °C, 200 rpm, utilizando 1% do pré-inóculo. Em agitador orbital, utilizou-se 50 mL de meio em frascos de 250 mL e conduziu-se o crescimento do microrganismo utilizando o meio de referência, chamado Mc1, a qual se aplica os componentes descritos na Tabela 1, utilizando um extrato de levedura de grau analítico, ou comercial, e os meios modificados: Mc2, no qual se manteve a composição de referência sem adição da triptona ao meio; Mc3, no qual o extrato de levedura de grau

analítico foi substituído, no meio de cultivo, por um extrato de levedura menos puro e de origem industrial, nas mesmas concentrações explanadas na Tabela 1; e Mc4, no qual se utilizou o extrato de levedura industrial sem a adição da triptona. No biorreator de 1L, observou-se o cultivo sem aeração e com aeração ( $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) das formulações Mc1 e Mc3, contendo 600 mL de meio fermentativo.

Ao final dos cultivos, o caldo fermentado foi submetido a centrifugação (Hettich Zentrifugen Rotina 420R) por 25 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , 5000 rpm e o sobrenadante descartado. Posteriormente, o *pellet* formado foi lavado com solução salina,  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ , e novamente centrifugados por 25 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado permanecendo apenas o *pellet* que foi armazenado em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **4.1.4 Extração da proteína L-AI**

Para a extração da proteína, utilizou-se o protocolo descrito por Souza (2020). A princípio, o concentrado celular (*pellet*) foi ressuspenso em solução tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0 suplementado com NaCl 150 mM. As células foram rompidas por meio da sonicação utilizando ultrassom de ponteira (Sonicator Qsonic, Q500 Sonicators, EUA), em amplitude de 30%, pulsos de 3 segundos *on* e 3 segundos *off*, durante 4 minutos, intercalando o contato da amostra com o sonicador, visto que o equipamento aquece durante o procedimento, prevenindo uma possível desnaturação da enzima de interesse. Esse protocolo foi repetido 3 vezes por amostra, visando garantir o rompimento celular. Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo. Após a ruptura celular, as amostras foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen Rotina 420R) por 25 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , 5000 rpm, para separação de resíduos celulares e extratos enzimáticos, de modo que, o sobrenadante livre de células corresponde ao extrato enzimático.

### **4.2 Caracterização do extrato enzimático**

#### **4.2.1 Quantificação de proteína**

A concentração de proteína no extrato enzimático foi determinada através do método colorimétrico desenvolvido por Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### 4.2.2 Atividade enzimática

Para determinar a atividade enzimática da L-AI, seguiu-se a metodologia de Hung *et al.*, 2014). Foi preparada uma solução de 0,4 mL de 500 mM de D- galactose em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, suplementado com 1 mM de MnCl<sub>2</sub> e 0,1 mL do extrato enzimático concentrado. A solução foi incubada durante 60 minutos na temperatura de 50°C. Em seguida, a quantificação de D-tagatose foi determinada utilizando (DISCHE; BORENFREUND, 1951): 250 µL dessa mistura reacional, 50 µL de cisteína 1,5% (m/v), 1,5 mL ácido sulfúrico 70% (v/v) e 50 µL de carbazol em álcool absoluto 0,12% (m/v). Após 15 minutos de reação, a densidade óptica das amostras (D.O.) foi medida em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22) a 560 nm em temperatura ambiente. Determinou-se a unidade (U) como a quantidade de L-AI necessária para produzir 1 µmol de D-tagatose por minuto. A atividade catalítica da enzima (U/mL) foi obtida pela Equação 1.

$$Atividade = \frac{[TAG] * Vr}{Ve * t} * D \quad (1)$$

No qual, [TAG] corresponde a concentração de D-tagatose convertida na reação (mM), valor definido pela curva padrão; Vr ao volume reacional (mL); Ve ao volume de solução enzimática (mL); D ao fator de diluição e t ao tempo de reação do ensaio enzimático (min) .

#### 4.2.3 Concentração do extrato enzimático

A concentração do extrato enzimático, segundo metodologia descrita por Oliveira (2019), foi realizada visando a aplicação do biocatalisador na produção de agregados enzimáticos reticulados (CLEA). A L-AI desse estudo apresenta, de acordo com Manzo *et al.* (2019), apresenta um peso molecular em torno de 55,87 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 5,07. Desse modo, utilizou-se um tubo de filtração com membrana de celulose com corte no peso molecular de 30 kDa (sistema de concentração Amicon® Pro da Merck Millipore), empregando a força motriz da centrifugação (Hettich Zentrifugen Rotina 420R) por 25 minutos, a 4 °C, 5000 rpm para o processo de filtração. A concentração do extrato foi verificada pela quantificação de proteínas conforme metodologia descrita no tópico 4.2.1.

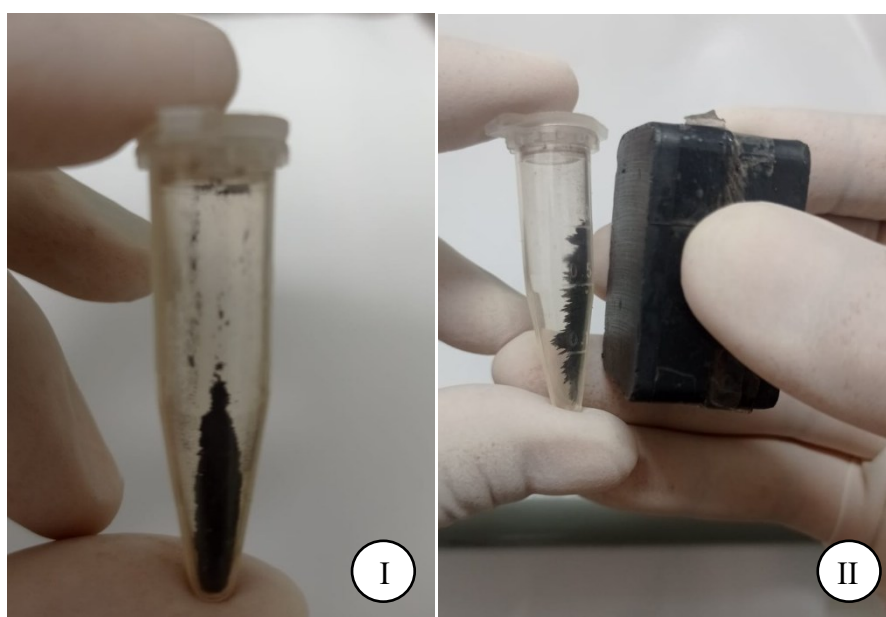
### 4.3 Formação de agregados enzimáticos reticulados magnéticos

#### 4.3.1 Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas

Visando agregar a característica magnética ao CLEA, foi realizada a síntese de nanopartículas magnéticas conforme descrito por Bezerra *et al.* (2017), com modificações. Inicialmente, foram aplicados 0,99 g de sulfato ferroso hepta-hidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e 1,93 g de cloreto férrico hexa-hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), dissolvidos em 30 mL de água ultrapura previamente acidificada com ácido clorídrico (HCl) 5 % (v/v), adequando o pH para uma faixa entre 3,0 e 4,0 e permanecendo sob agitação magnética por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi então mantida sob agitação ultrassônica com amplitude de 40 % por 9 minutos, e durante este período foram adicionados 10 mL de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) gota a gota. As nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) formadas foram lavadas com água ultrapura até que a solução remanescente atingisse o pH neutro, sendo então armazenada em dessecador.

Para a funcionalização da magnetita, foram utilizados 100 mg de nanopartículas suspensas em uma mistura de 20 mL de etanol e 20 mL de tolueno, com adição de 100  $\mu\text{L}$  de 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES). A suspensão foi mantida sob agitação ultrassônica, seguindo os mesmos parâmetros aplicados na etapa anterior. As nanopartículas ativas foram lavadas com água ultrapura e armazenadas em dessecador (Figura 9)

Figura 9 – Nanopartículas magnéticas de ferro na (I) ausência e (II) presença de campo magnético



Fonte: Arquivos da autora.

#### **4.3.2 Produção de CLEA magnético de $\beta$ -galactosidase**

Para a preparação de m-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase, adotou-se o protocolo descrito por Freitas *et al.* (2023). Foram utilizadas 20 mg de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, em sua forma liofilizada, viabilizada pela empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), solubilizada em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Em seguida, foi adicionado, gradativamente, 550 mg do agente precipitante sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em estado sólido, seguido de 1 mL do precipitante na forma de solução 55% (m/v) e foi deixado sob agitação magnética por 15 minutos. Ao final desse período, sob agitação mecânica adicionou-se 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e 120  $\mu$ L do agente reticulante, glutaraldeído 25% (v/v). A solução permaneceu em banho de gelo e agitação por 16h, em seguida, a amostra foi submetida a quatro ciclos de lavagens, dois de 15 minutos e dois de 10 minutos, em centrífuga por 15 minutos, a 4 °C, 5000 rpm. As lavagens foram realizadas com a solução tampão utilizada no processo. Por fim, o produto resultante foi identificado e armazenado para análise posterior.

#### **4.3.3 Produção de CLEA magnético de L-arabinose isomerase**

Para a preparação de m-CLEAs de L-AI, seguiu-se o protocolo descrito Freitas *et al.* (2023), com modificações. O extrato enzimático foi adicionado à solução tampão de Tris HCl pH 8,0; suplementada com 150 mM de NaCl, visando a obtenção de uma solução de 4 mL e concentração de 20 mg/mL. Posteriormente, foram adicionados 2,8 g do precipitante sulfato de amônio e mantido sob agitação magnética durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionadas 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e 128  $\mu$ L de glutaraldeído 25% (v/v). A mistura permaneceu sob agitação mecânica em banho de gelo durante 16 horas. Após esse período, a amostra foi submetida a quatro ciclos de centrifugação por 15 minutos, a 4 °C, 5000 rpm nos dois primeiros ciclos e 10 minutos nos dois subsequentes. As lavagens foram realizadas com a solução tampão utilizada no processo. Ao final, o produto resultante foi identificado e armazenado para análise posterior.

#### **4.3.4 Produção do Combi-CLEA magnéticos de $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase**

Para formação do m-Combi-CLEA (Figura 10), foram utilizadas 20 mg de  $\beta$ -galactosidase *Aspergillus oryzae* solubilizada em 1 mL de tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0;



suplementada com 150 mM de NaCl e uma concentração final de 20 mg/mL em 1 mL de solução do extrato de L-AI. Em seguida, adicionaram-se, gradativamente, 2,8 g do precipitante sulfato de amônio e colocou-se sob agitação magnética durante 15 minutos. Posteriormente, foram acrescentadas 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e 128  $\mu$ L de glutaraldeído 25% (v/v). A mistura foi deixada sob agitação mecânica em banho de gelo durante 16 horas. Após esse período, a amostra foi submetida a quatro ciclos de centrifugação por 15 minutos, a 4 °C, 5000 rpm nos dois primeiros ciclos e 10 minutos nas duas subseqüentes e lavagem com solução tampão utilizada no processo. Ao final, o produto resultante foi identificado e armazenado para análise posterior.

#### ***4.3.5 Determinação da atividade enzimática dos agregados enzimáticos reticulados***

##### ***4.3.5.1 $\beta$ -galactosidase***

Foi suspenso de 0,1 g de m-Combi-CLEA em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,6 na presença do cofator  $\text{MnCl}_2$  0,1 mM, a 37 °C, e foi retirada uma amostra de 50  $\mu$ L da suspensão para medição em espectrofotômetro a 420 nm durante 2 minutos para liberação de o-nitrofenil proveniente da incubação da enzima com orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (oNPG) 1,25 mM (FREITAS *et al.*, 2020). Para a enzima livre a carga utilizada foi de 25  $\mu$ L de uma solução de 10mg/mL. A atividade (U/mL) foi calculada segundo a equação (2):

$$Atividade = \frac{Slope \cdot V_r}{V_e \cdot L \cdot \epsilon} \quad (2)$$

No qual, o *Slope* corresponde a variação de absorbância no tempo de análise ( $\text{min}^{-1}$ ),  $V_r$  o volume total de reação (mL);  $V_e$  corresponde ao volume de enzima adicionada (mL) e  $L$  é o caminho óptico (1 cm). O coeficiente de extinção  $\epsilon$  sob essas condições foi de 4,53  $\text{cm}^2\mu\text{mol}^{-1}$ . Para o volume de enzima é substituído pela massa estimada do agregado dependendo da proporção e do volume de suspensão adicionado, de modo que valor de atividade pode ser dado em U/g.

#### 4.3.5.2 *L-arabinose isomerase*

Foi realizada uma suspensão de 0,1 g de m-Combi-CLEA em 1 mL de solução tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0 suplementada com 150 mM de NaCl e aplicou-se a metodologia descrita no tópico 4.2.2 para a solução suspensa.

#### 4.3.6 *Parâmetros de imobilização*

As atividades das enzimas  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase em CLEA foram determinadas conforme descrito nos tópicos 4.3.5.1 e 4.3.5.2, respectivamente. Estas medidas foram utilizadas para caracterizar o processo de imobilização. Calculou-se os parâmetros atividade teórica ( $At_T$ ), rendimento de imobilização (IY) e atividade recuperada ( $At_R$ ) (SILVA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2020).

A atividade teórica ( $At_T$ ) da enzima imobilizada se dá a partir da quantidade de enzima oferecida ( $At_{off}$  em U) e o rendimento de imobilização (IY), equação 3:

$$At_T (U) = At_{off} * IY / 100 \quad (3)$$

Sendo a IY calculada pela equação 4:

$$IY (\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100 \quad (4)$$

Onde,  $At_i$  e  $At_f$  corresponde a atividade inicial e final da enzima ( $U.mL^{-1}$ ) no sobrenadante. Com a atividade da enzima imobilizada ( $At_D$  em U/g) e a massa (g) do biocatalizador produzida, a atividade recuperada poderá ser calculada usando a equação 5:

$$At_R(\%) = \frac{At_D * (massa\ do\ CLEA)}{At_T} * 100 \quad (5)$$

#### 4.4 Estudo da reação em cascata para a produção de D-Tagatose a partir da lactose

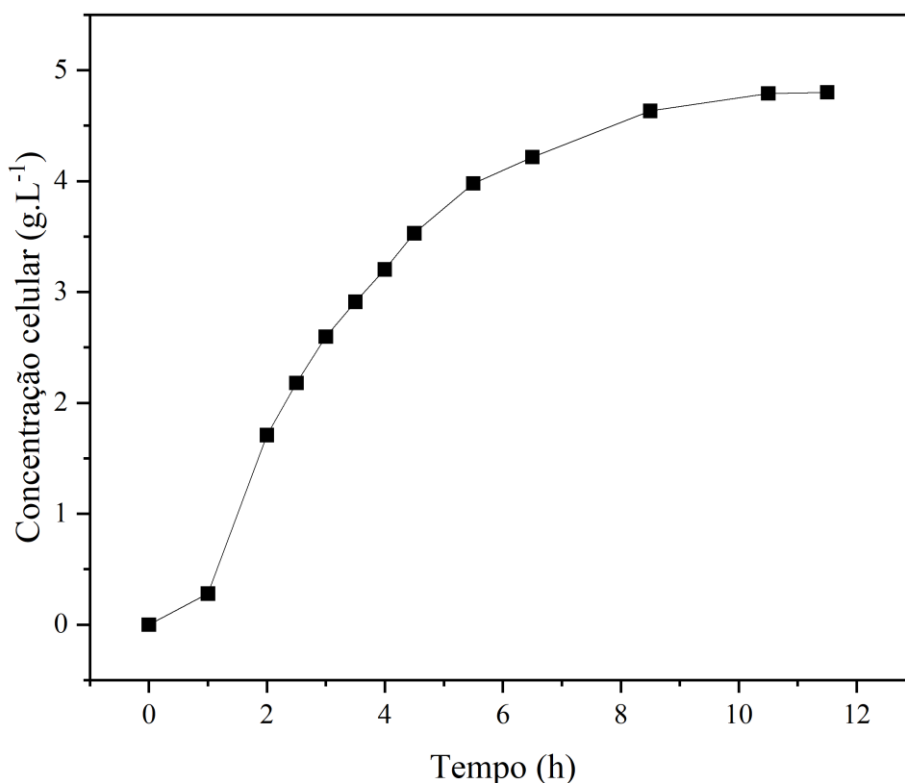
A produção de D-tagatose foi conduzida em batelada conforme metodologia descrita por Freitas *et al.* (2023) com modificações, utilizando lactose comercial. Em um primeiro momento, observou-se a produção dos açúcares de interesse em um combinado de CLEAs, utilizando 0,3 g de m-CLEA de  $\beta$ -galactosidase e 0,3 g de m-CLEA de L-AI em um biorreator de 50 mL, com 5 mL de solução contendo lactose em solução tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, suplementado com 1 mM de  $MnCl_2$ , por 24h, a 50°C, sob agitação mecânica constante a 700 rpm. O mesmo experimento foi realizado utilizando o m-Combi-CLEA nas mesmas condições descrita anteriormente, utilizando 0,3 g e 0,6 g de massa para reação. Foram aferidas amostras nos tempos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de reação. A concentração de galactose foi determinada pela concentração de glicose presente, dado a estequiometria da reação, por meio do Kit de Glicose Bioclin® (Laborlab) . A concentração de tagatose formada foi determinada pelo método colorimétrico ácido sulfúrico-cisteína-carbazol (4.2.2). Todos os ensaios foram realizados em duplicada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cinética de crescimento da *Escherichia coli* em agitador orbital

Observou-se o crescimento do microrganismo *E. coli*, em um meio de autoindução, como experimento preliminar, no qual a lactose presente no soro do leite induz a produção da enzima de interesse, em agitador orbital, a fim de esboçar o seu perfil de crescimento. É importante mencionar que o soro do leite foi utilizado apenas para os ensaios relativos à produção da enzima de interesse. Na Figura 10, é possível visualizar o crescimento celular do microrganismo que a partir da expressão heteróloga da L-AI, sob agitação a 37°C, 200 rpm. A primeira hora de cultivo corresponde a fase de *lag* do microrganismo, na qual ele se adapta às condições do meio. Já na segunda hora de cultivo, inicia-se a fase exponencial e após 8 horas de fermentação, dar-se início a desaceleração que corresponde ao começo da fase estacionária. Comportamento similar, para a cinética de crescimento da proteína recombinante L-arabinose isomerase, foi identificado por Souza *et al.* (2021), que observaram o nível máximo de crescimento celular em 9h de ensaio.

Figura 10- Perfil de crescimento da *Escherichia coli*, BL21, em meio de autoindução em agitador orbital no período de 12 horas, a 37°C, 200 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 Avaliação do uso alternativo de extrato de levedura industrial e influência da triptona no crescimento de *Escherichia coli* em frascos agitados (agitador orbital)

O objetivo das fermentações, no ponto de vista industrial, é a obtenção de altos rendimentos, usando matérias-primas de baixo custo, sem influenciar negativamente a produtividade da enzima (Cardoso *et al.*, 2020). Nesse contexto, fontes de nitrogênio, como a triptona e o extrato de levedura, elevam o custo de produção do meio de cultivo (Souza, 2020). Para tanto, é necessário buscar componentes economicamente acessíveis, que garantam o crescimento adequado do microrganismo e a produção desejada. Desse modo, após estudar a cinética de crescimento do microrganismo, avaliou-se os efeitos sistemáticos de um extrato de levedura menos puro, de origem industrial, na composição do meio, como substituto do extrato de levedura de grau analítico, comumente usados em análises laboratoriais, observando, também, a influência da triptona no desenvolvimento do microrganismo e produção da L-AI, ao ser removida do meio.

Na Tabela 2, é possível observar os resultados obtidos ao modificar os meios, comparando-os ao meio de referência (extrato de levedura comercial e triptona), na concentração final do microrganismo, na atividade enzimática e concentração de proteínas do biocatalizador produzindo nesses meios modificados e na atividade específica.

Tabela 2 - Dados do crescimento celular do meio de referência (Mc1: extrato de levedura comercial) e dos meios modificados (Mc2: extrato de levedura comercial sem adição de triptona; Mc3: extrato de levedura industrial; Mc4: extrato de levedura industrial sem adição de triptona) em cultivo em agitador orbital por 12h, a 37°C, 200rpm, com resultados da atividade enzimática e concentração de proteínas dos extratos lisados de L-arabinose isomerase.

Meios de cultivo	$[X]_F$ (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade Enzimática (U. mL <sup>-1</sup> )	Concentração de Proteínas (mg. mL <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U. mg <sup>-1</sup> )
<b>Mc1</b>	3,1±0,00	0,80±0,00 <sup>a</sup>	5,09±0,02 <sup>c</sup>	0,16
<b>Mc2</b>	1,8±0,00	0,54±0,00 <sup>c</sup>	3,62±0,04 <sup>a</sup>	0,15
<b>Mc3</b>	2,2±0,00	0,76±0,00 <sup>b</sup>	5,13±0,02 <sup>c</sup>	0,15
<b>Mc4</b>	1,6±0,00	0,55±0,00 <sup>c</sup>	3,47±0,00 <sup>b</sup>	0,16

Fonte: Elaborado pela autora. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não apresentam diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey.

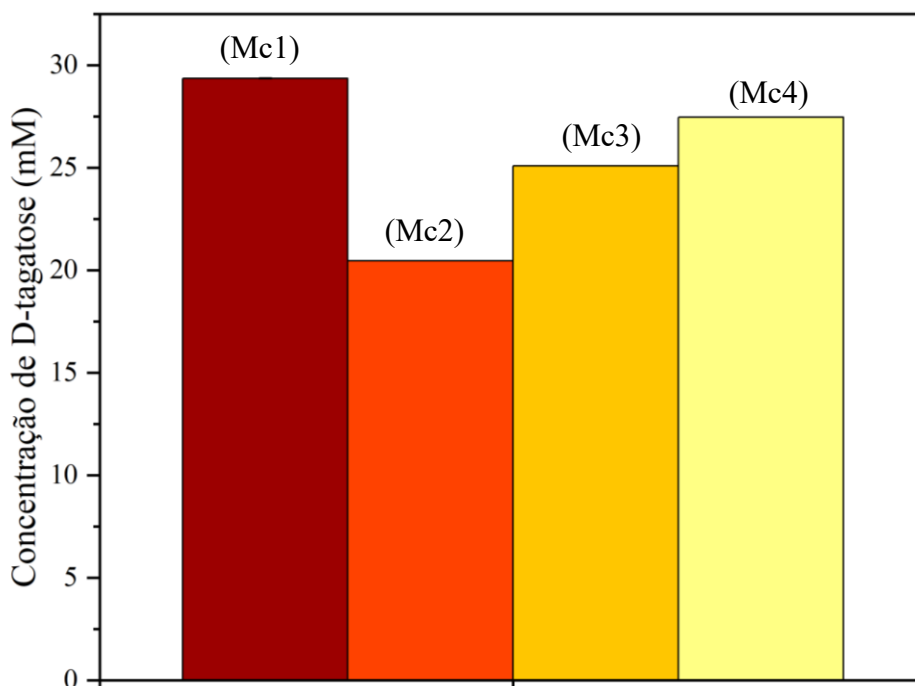
O extrato de levedura, é considerada, nos meios de cultivo, uma fonte de nutrientes, como carboidratos, proteínas e vitaminas. A triptona, por sua vez, estimula o crescimento e diferenciação de células microbianas (Studier, 2005). Desse modo, ao substituir o extrato de levedura comercial no meio (Mc1) pelo extrato de levedura industrial (Mc3), observou-se uma redução em torno de 29% no crescimento do microrganismo. Isso ocorre, provavelmente, porque o extrato de levedura industrial contém componentes, não identificados, que possam, de algum modo, interferir no crescimento do microrganismo. Contudo, apesar da alteração no perfil de crescimento do microrganismo, pode-se evidenciar que não houve diferenças significativas, desse meio ao meio de referência (Mc1), quanto a concentração de proteína produzida. Por seguinte, observou-se que em ambos os meios modificados, no qual a triptona não foi adicionada, Mc2 e Mc4, denotou-se uma redução em torno de 42% na concentração final do microrganismo, expressando, também, uma redução de aproximadamente 30% na atividade enzimática e na concentração de proteína gerada se comparado ao meio de referência (Mc1).

Entretanto nota-se que, apesar da atividade enzimática apresentar, nos meio modificados, valores inferiores ao do meio de referência, a atividade específica permanece, praticamente, constante. Estes dados, ao serem confrontados com os dados de crescimento, indicam que a produção de enzima não foi afetada pela substituição dos componentes do meio, demonstrando que, o impacto, dessas alterações no meio, foi no crescimento do microrganismo que, conseqüentemente, impactou a quantidade total de enzima produzida, e que o microrganismo pode desenvolver-se e produzir a enzima em meios onde no qual a triptona esteja ausente sem impactar a atividade específica.

### ***5.2.1 Produção de D-tagatose catalisada pela L-AI obtida nos meios de cultivo modificados***

Visto que a L-arabinose isomerase foi produzida em diferentes meios de cultivo propostos, avaliou-se, portanto, a capacidade dessas enzimas de sintetizar de D-tagatose, utilizando como substrato a D-galactose a 500 mM, em um ensaio de 8h, a 50 °C. Na Figura 11, é possível observar que todas as reações catalisadas pelas enzimas obtidas nos meios modificados apresentaram um perfil de concentração de tagatose inferior a amostra de referência, confirmando que uma menor quantidade de enzima foi produzida, de modo que, deflagrou-se taxas de conversão na faixa de 5,9%; 4,1%; 5%; 5,5%, respectivamente.

Figura 11- Perfil de concentração de D-tagatose após 8 horas de reação, a 50 °C, em substrato galactose 500 Mm, onde Mc1 corresponde ao meio de referência (detendo o extrato de levedura comercial), Mc2, Mc3 e Mc4 corresponde aos meios modificados cuja formulação detêm respectivamente: meio com extrato de levedura comercial sem adição de triptona; meio com extrato de levedura industrial e meio com extrato de levedura industrial sem adição de triptona

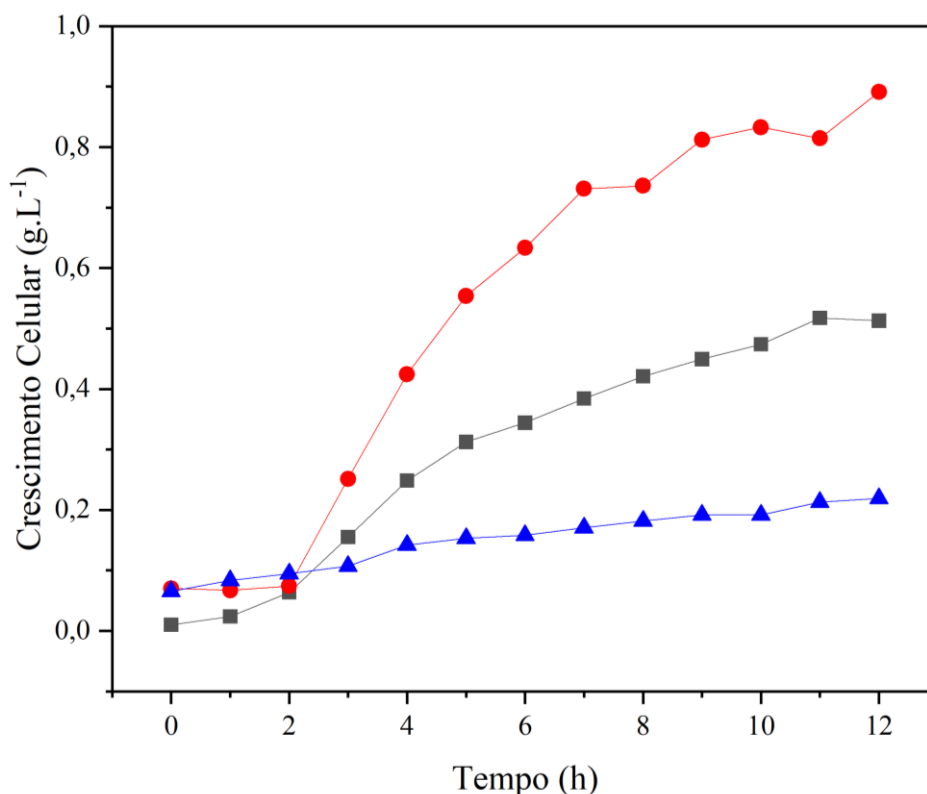


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 Cinética de crescimento da *Escherichia coli* em biorreator de bancada

Dados resultados obtidos em agitador orbital, realizaram-se ensaios de crescimento celular em biorreator de 1L, onde foi possível, a princípio, observar o feito da aeração no crescimento microbiano, utilizando os meios de cultivo Mc1 (meio de referência) e Mc3 (meio modificado que utiliza extrato de levedura industrial), Figura 12.

Figura 12 – Cinética de crescimento da *E. coli*, BL21, em meio de autoindução, durante de 12 horas, a 37°C, 200 rpm. em biorreator de 1L. Mc1 sem aeração (■), Mc1 com aeração (1 L.min<sup>-1</sup>) (●); Mc3 com aeração (1 L.min<sup>-1</sup>) (▲), onde Mc1 corresponde ao meio de referência e Mc3 ao meio modificado que utilizava o extrato de levedura industrial ao invés do extrato de levedura comercial



Fonte: Elaborado pela autora

Apesar dos resultados obtidos em agitador orbital, apontarem para uma favorável utilização do extrato de levedura industrial como substituto do extrato de levedura comercial, não foi possível acompanhar o crescimento do microrganismo, em uma condição sem aeração, utilizando o extrato de levedura industrial em biorreator, pois observou-se que a densidade óptica da amostra pode ter sido prejudicada por limitações de solubilidade e homogeneização do meio contendo o extrato de levedura industrial.

Dado as condições de cultivo, quando se utilizou o extrato de levedura industrial, observou-se que não houve o crescimento do microrganismo em ambas as condições de cultivo, com e sem aeração, visto que o pH inicial no cultivo sem aeração estava em torno de 5,5 e com aeração em torno de 4,5. O pH do meio de cultivo apresentava-se ácido, condição que não favorece o crescimento microbiano ou a produção da enzima. Ao fazer a substituição dos componentes do meio, uma etapa, que não foi observada, foi a correção do pH. Este fato comprometeu o ensaio, de modo que o crescimento do microrganismo não foi favorecido, uma vez que, de acordo com Studier (2005), o pH ideal para o crescimento da BL21, seria um



pH acima de 6,0 em uma faixa próxima a neutralidade não superando o pH de 8,0, pois pode haver o estresse das células e reduzir a sua viabilidade. Diante disso, ao realizar o rompimento das células, oriundas de ambas essas fermentações, utilizando o extrato de levedura industrial, observou-se que não houve atividade enzimática, deduzindo-se, portanto, que a enzima de interesse não foi produzida.

Entretanto, foi possível observar o impacto da aeração no meio de referência (extrato de levedura comercial e triptona), tanto no crescimento do microrganismo, como na concentração de D-tagatose produzida, atividade enzimática e concentração de proteínas (Tabela 3), evidenciando a produção da enzima (L-AI) de interesse.

Tabela 3 – Concentração de D-tagatose, atividade enzimática de L-AI e concentração de proteínas dos extratos lisados de L-arabinose isomerase dos cultivos em biorreator, utilizando o meio de referência (Mc1), em condições sem aeração e com aeração (1 L.min<sup>-1</sup>)

Amostra	Concentração de D-Tagatose (mM)	Atividade Enzimática (U. mL <sup>-1</sup> )	Concentração de Proteínas (mg. mL <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U. mg <sup>-1</sup> )
Enzima do cultivo <u>sem</u> aeração	4,8±0,13	0,38±0,03	2,09±0,8	0,18
Enzima do cultivo <u>com</u> aeração	11,95±0,14	0,99±0,01	13,91±1,16	0,07

Fonte: Elaborado pela autora

Mediante os resultados favoráveis apresentados por Sousa (2020) ao aplicar em seu trabalho uma taxa de aeração de 0,6 L.min<sup>-1</sup>, observou-se a possibilidade explorar resultados ainda melhores ao se utilizar, no presente estudo, uma taxa de aeração na faixa 1 L.min<sup>-1</sup>.

A aeração beneficiou o crescimento do microrganismo e consequentemente a quantidade de enzima produzida, de modo que, em condições aeradas, foi possível registrar uma produção de D-tagatose na faixa de 11,95 mM, taxa 2,5 vezes maior do que valor registrado para concentração de D-tagatose em condição não aerada, corresponde a 4,8 mM. A mesma premissa, de benefício da aeração, pôde ser aplicada ao se observar os resultados obtidos nas análises de atividade enzimática e concentração de proteínas, onde foi possível observar, respectivamente, valores 2,6 e 6,7 maiores, em condições aeradas, se comparadas ao cultivo sem aeração. Souza (2020), por exemplo, ao estudar o cultivo aerado da *E. coli*, BL21, com duração de 11h, obteve uma concentração de proteínas em torno de 7,08 mg/mL, enquanto, nesse estudo, obteve-se uma concentração de proteínas em torno de 13,91 mg/mL.

Zhou e seus colaboradores (2012), ao estudar a produtividade de D- lactato por *E. coli* recombinante, demonstraram que a aeração influencia nas taxas de crescimento do microrganismo, aumentando a sua biomassa e melhorando a produtividade de produto desejado, validando, portanto, os benefícios da aeração e os impactos positivos da mesma, nos resultados obtidos nesse estudo.

#### **5.4 Preparação de agregados enzimáticos reticulados magnéticos de L-arabinose isomerase e $\beta$ -galactosidase**

Para se avaliar a produção integrada de D-tagatose a partir de lactose, enzimas imobilizadas foram avaliadas na reação em cascata: hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase seguida de isomerização de galactose em tagatose catalisada por L-AI (Bortone; Fidaleo, 2020). Para tanto, três biocatalisadores imobilizados foram preparados: m-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase, m-CLEAs de L-AI e m-Combi-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase e L-AI. Os parâmetros de imobilização para a preparação de m-CLEAs e m-Combi-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase e de L-AI são apresentados na Tabela 4. A concentração de enzimas em solução foi a mesma para todas as imobilizações, na faixa de 10 mg/mL, com uma atividade de 11,92 U de volume final para  $\beta$ -galactosidase e 36,4 U para L-arabinose isomerase. É observado que o rendimento de imobilização das enzimas foi de 100% para todos os m-CLEAs, dado a ausência de atividade no sobrenadante após a reticulação. Desse modo, a atividade teórica corresponde a atividade oferecida da  $\beta$ -galactosidase e da L-arabinose isomerase em seu volume final. Em seu trabalho, Freitas (2022) encontrou uma atividade recuperada de 24,25% para o m-CLEA de  $\beta$ -galactosidase, usando glutaraldeído como reticulante, faixa similar ao reportado nesse estudo. Para o m-CLEA de L-AI, Sousa e seus colaboradores (2020) observaram uma atividade recuperada na faixa de 7,61%, ao preparar m-CLEA com partículas funcionalizadas com APTES (3-aminopropiltriethoxissilano). Quanto à atividade do m-Combi-CLEA, nota-se que não houve impacto na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, que apresentou os mesmos valores para o m-CLEA e m-Combi-CLEA. Já a atividade da L-AI foi impactada quando se preparou o m-Combi-CLEA, que apresentou um valor 26 % menor do que o do m-CLEA.

Tabela 4 – Parâmetros de imobilização e atividade da  $\beta$ -galactosidase e da L-arabinose isomerase imobilizada

	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U)	Atividade recuperada (%)
m-CLEA de $\beta$ -galactosidase	100	2,99 $\pm$ 0,01	25,08
m-CLEA de L-AI	100	2,85 $\pm$ 0,00	7,83
m-Combi-CLEA ( $\beta$ -galactosidase)	100	3,07 $\pm$ 0,01	25,75
m-Combi-CLEA (L-AI)	100	2,10 $\pm$ 0,00	5,76

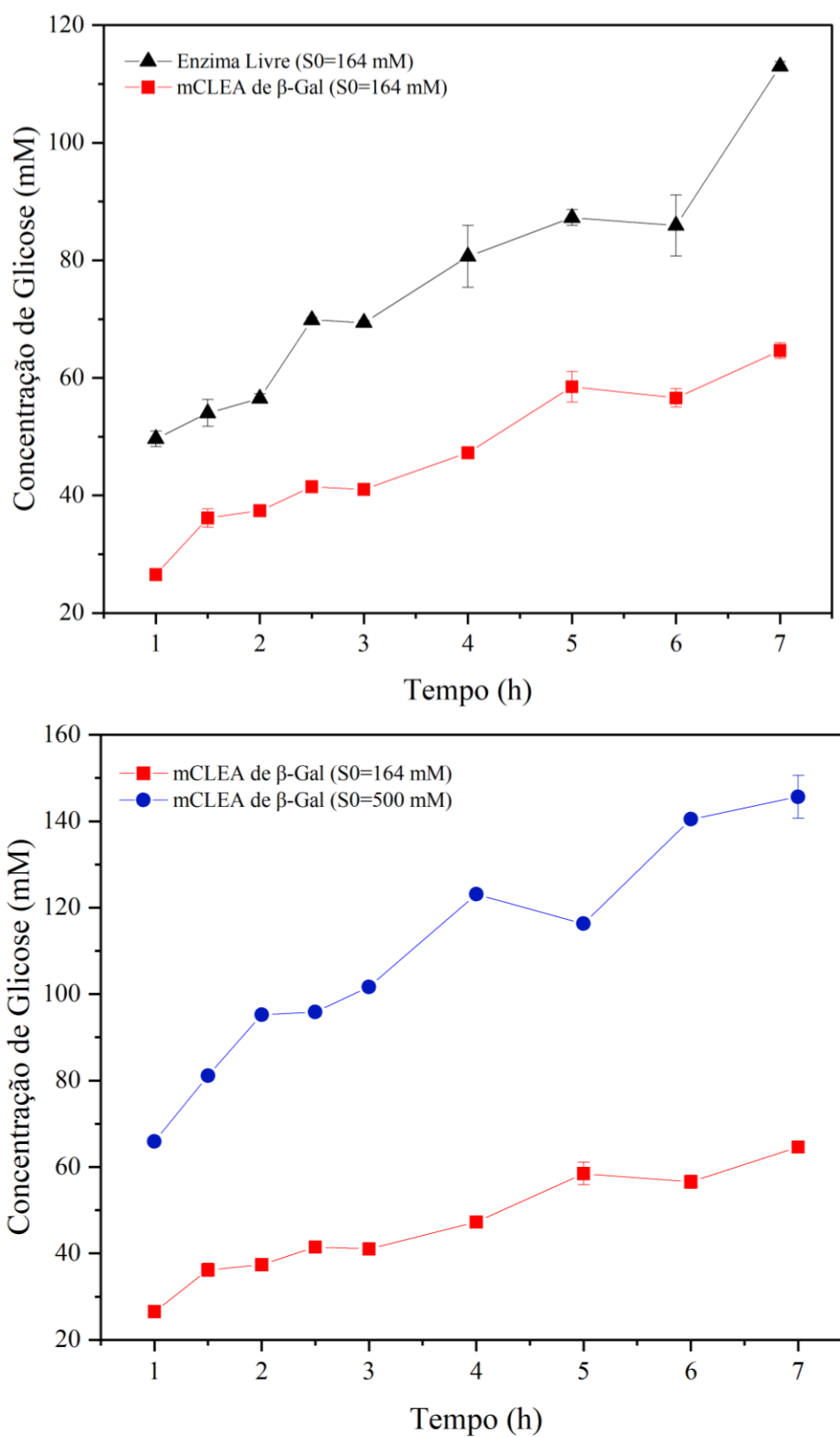
Fonte: Elaborado pela autora. A atividade recuperada é uma razão entre a atividade do imobilizado e a atividade teórica. Essa última é definida pela subtração entre a atividade ofertada pela enzima e a atividade obtida no sobrenadante.

#### 5.4.1 Influência da concentração de lactose na cinética de hidrólise catalisada por m-CLEA de $\beta$ -galactosidase

Ao estudar a melhor concentração de galactose para a síntese de tagatose, Souza (2020) observou resultados satisfatórios na concentração de 500 mM, de modo que, foi possível observar uma conversão, de galactose em tagatose, superior a 20%, após estabelecer o equilíbrio da reação. Ao utilizar a concentração de 164 mM de galactose, os autores observaram uma conversão em torno de 8,4%. Desse modo, diante do estudo apontando por Souza (2020), observou-se a necessidade de avaliar a capacidade de hidrólise da lactose em D-galactose, pela enzima  $\beta$ -GAL imobilizada, nas mesmas concentrações de substrato (galactose) comumente ofertado a L-AI em outros estudos, a fim de favorecer o processo em cascata de produção da D-tagatose pela L-AI imobilizada no Combi-CLEA. A síntese de tagatose a partir da galactose é limitada pelo equilíbrio termodinâmico desfavorável entre produtos e substratos, que pode ser modificado pela adição de altas concentrações de substrato (galactose) no início da reação de isomerização (Freitas *et al.*, 2023).

Desse modo, Freitas e seus colaboradores (2023) observaram, para a enzima livre de  $\beta$ -galactosidase, em uma concentração inicial de 164 mM de lactose, em 7 horas de reação, uma conversão de 60%. Neste estudo, dada as mesmas condições operacionais, foi possível observar que a enzima livre sintetizou 113,03 mM de glicose, caracterizando uma faixa de conversão em torno de 68,91%. Pela estequiometria da reação, na síntese da lactose, pode-se afirmar que a mesma quantidade de galactose foi formada. Por seguinte, observou-se que a enzima imobilizada converteu em torno de 39,41% do substrato inicial (164 mM). Enquanto na concentração de 500 mM de substrato (lactose), após 7 h de reação, 29,13% da lactose havia sido convertida em glicose, pela  $\beta$ -GAL imobilizada, evidenciado uma concentração de galactose de 145,65 mM, dados que podem observados na Figura 13.

Figura 13 – Hidrólise de lactose catalisada por 10 mg da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em m-CLEA e livre. Enzima livre ( $\blacktriangle$ ), m-CLEA -S0 =164mM ( $\blacksquare$ ), m-CLEA -S0 =500mM ( $\bullet$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.4.2 Bioconversão da lactose

Para o ensaio de bioconversão da lactose, para síntese de D-tagatose, foram utilizadas duas estratégias. Em um primeiro ensaio, um Combinado de m-CLEAs, 0,3 g do m-CLEA de  $\beta$ -GAL e 0,3 g do m-CLEA de L-AI, foram adicionados em biorreator de 50 mL, contendo um volume final de 5 mL de lactose (500 mM), em solução tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,6, suplementado com 1 mM de  $\text{MnCl}_2$  a 50 °C, em agitação mecânica, por 24h. Posteriormente, estas mesmas condições operacionais foram aplicadas usando o m-Combi-CLEA, em uma proporção 0,3 g para reação. Acorda-se que a concentração de galactose foi determinada pela concentração de glicose presente, dado a estequiometria da reação, por meio do Kit de Glicose Bioclin®. A Figura 15 mostra os resultados obtidos nos diferentes ensaios.

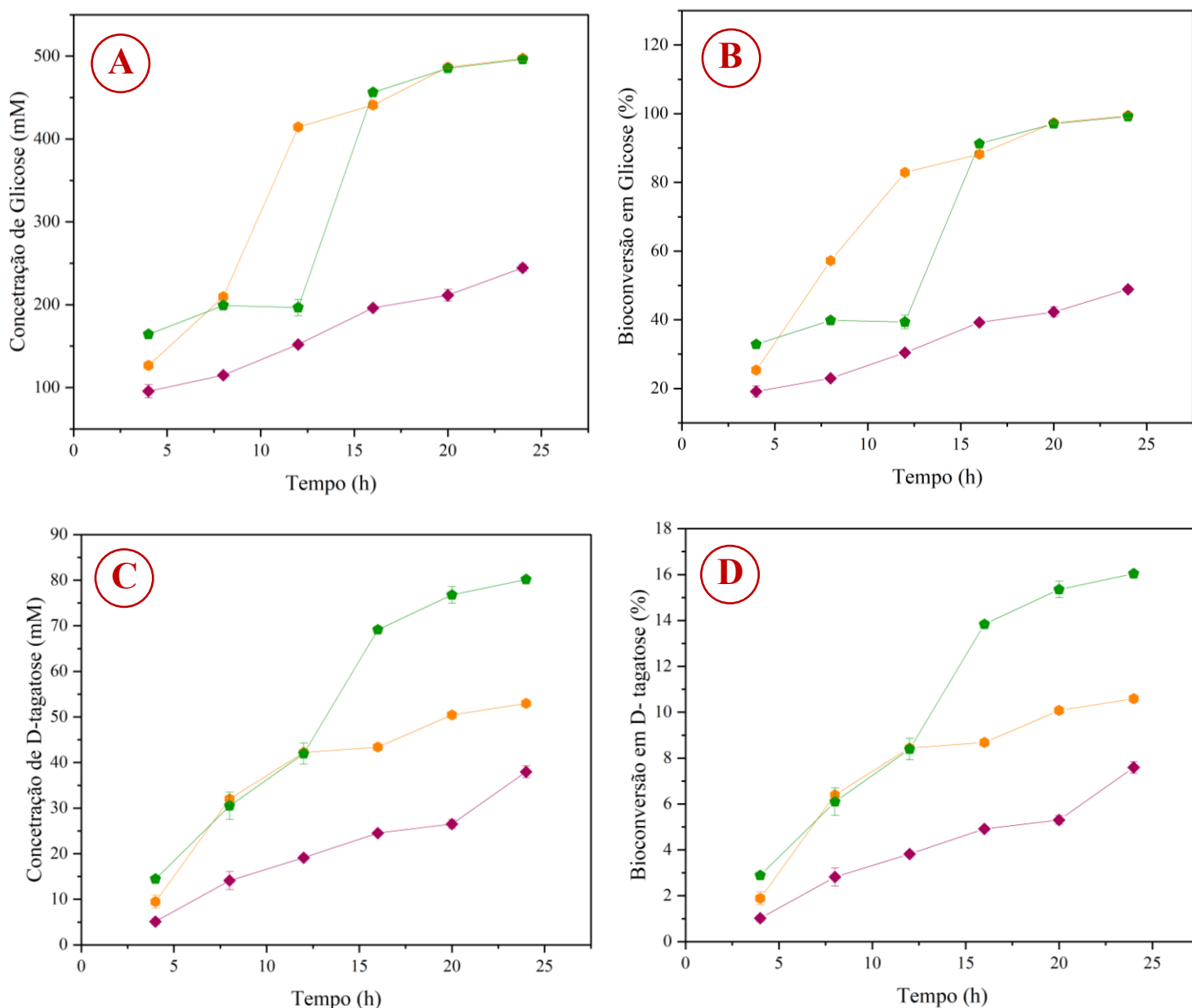
Após de 24h de reação, foi observado que o m-Combi-CLEA, na proporção de 0,3 g, cuja imagem demonstrativa pode ser observada na Figura 14, havia convertido em torno de 50% da lactose inicial em glicose/galactose, enquanto o Combinado de CLEAs, no mesmo período, havia hidrolisado em torno de 99% da lactose. Diante desse resultado, observou-se a necessidade de realizar o experimento com m-Combi-CLEA utilizando uma massa de catalisador correspondente ao ofertado para o Combinado de CLEAs (0,6 g).

Figura 14 - Massa de 0,3 g do m-Combi-CLEA magnético de L-AI e  $\beta$ -GAL utilizado para o ensaio de bioconversão



Fonte: Arquivo da autora.

Figura 15 – Dados experimentais do ensaio de hidrólise da lactose catalisada pela combinação de 0,3 g m-CLEA de  $\beta$ -GAL e 0,3 g de m -CLEA de L-AI (●) comparados a catálise do m-Combi-CLEA de  $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,3 g (◆) e do m-Combi-CLEA de  $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,6 g (◆); registrando, no período de 24h, a concentração da D-glicose/D-galactose (A), a bioconversão da D-glicose/D-galactose (B) e os subseqüente dados de concentração da D-tagatose (C) e bioconversão D-tagatose (D)

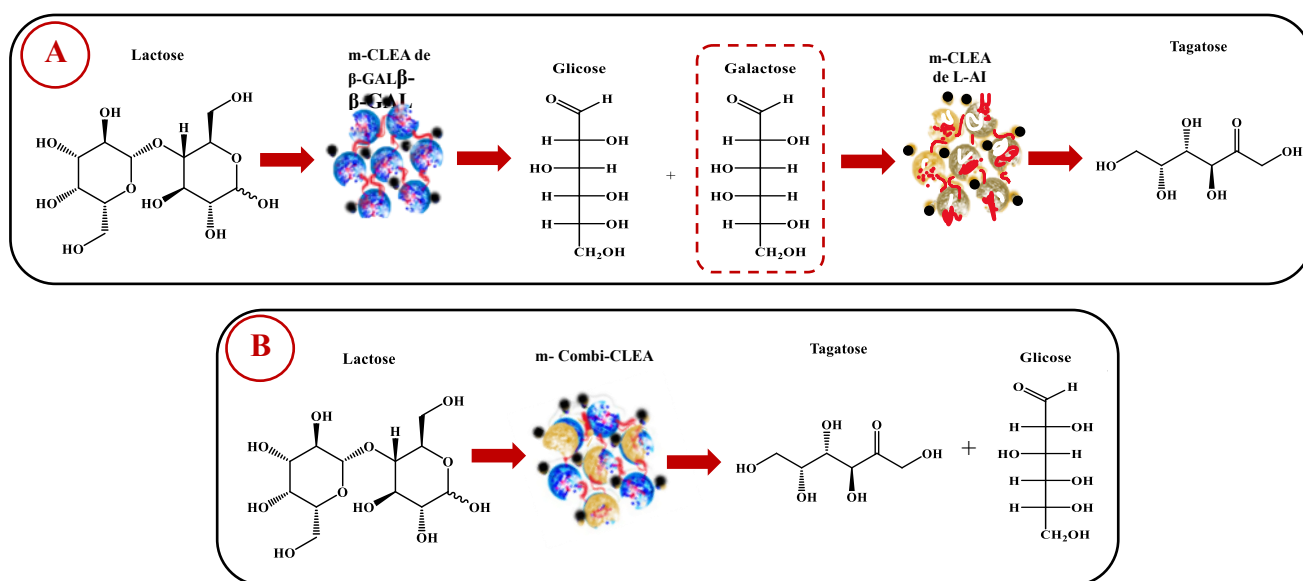


Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 15 é possível visualizar os resultados obtidos e, nota-se que, quando a concentração do catalisador foi aumentada, a concentração de glicose/galactose produzida pelos m-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase e pelo m-Combi-CLEA, após 15h de reação, foi semelhante. Isso mostra que não há impacto da forma de preparação do catalisador na hidrólise da lactose. A presença

da L-AI não alterou a velocidade de reação, ou seja, não impactou negativamente a performance da  $\beta$ -galactosidase. Quando observamos a produção de D-tagatose, o uso do m-Combi-CLEA favoreceu a produção de D-tagatose, permitindo alcançar uma concentração em torno de 80 mM após 24h. Esta concentração é 1,6 vezes maior do que alcançada com os combinados de m-CLEA. Resultados semelhantes foram obtidos por Rai, Kumar e Yadav (2021) que observaram que o uso das enzimas ( $\beta$ -GAL + L-AI) em um m-Combi-CLEA foi capaz aumentar o rendimento de D-tagatose. Os autores atribuem este resultado a um fenômeno de tunelamento comum em reações em cascata, em que os efeitos de transferência de massa são minimizados pela proximidade do segundo substrato (galactose) ao sítio ativo da enzima (Figura 16).

Figura 16 – Comparativo da reação combinada de CLEA de L-AI e  $\beta$ -GAL (A) com o fenômeno de tunelamento em reações em cascata do Combi-CLEA (B)



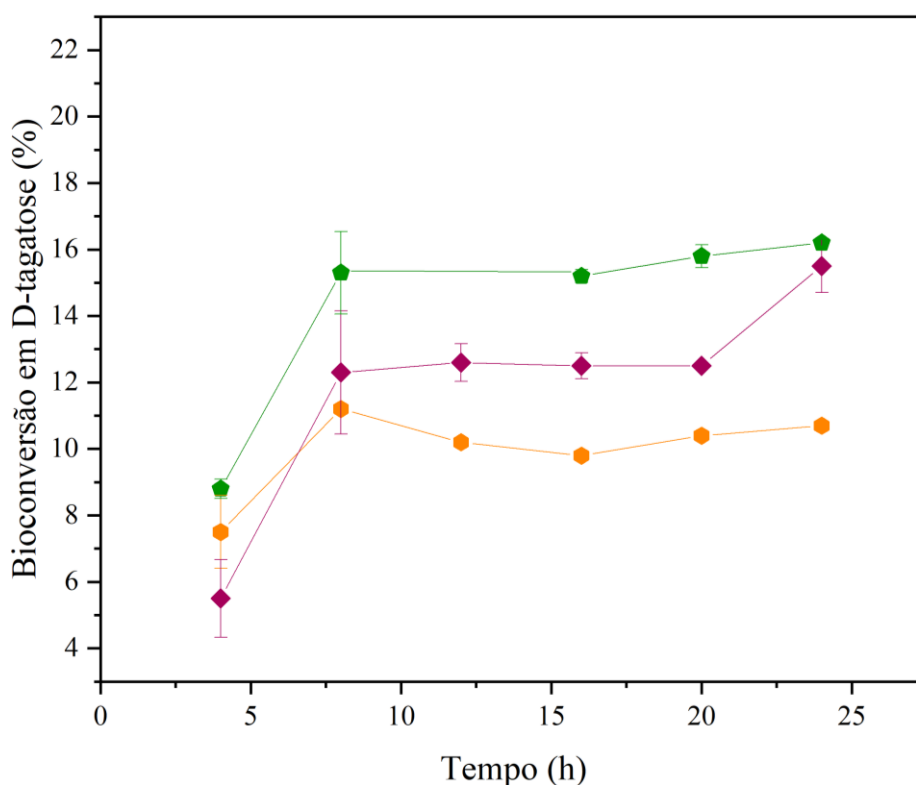
Fonte: Elaborado pela autora.

Freitas e seus colaboradores (2023) realizaram experimentos aplicando m-CLEAs de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* na conversão de lactose em D-tagatose em uma reação de duas etapas. Em um primeiro reator, no período de 24h, os autores alcançaram a conversão total da lactose em glicose e galactose. Em seguida, ao aplicar L-arabinose isomerase imobilizada (m-CLEA-LAI) para produzir D-tagatose (etapa 2), eles obtiveram 13% de conversão de galactose em D-tagatose, após 24h. A bioconversão encontrada por estes autores foi superior a conversão do Combinado de CLEAs

desse estudo, de 10,6%, mas levemente inferior a valor encontrado para o m-Combi-CLEA (0,6 g) que deteve conversões em torno de 16%. Rai, Kumar e Yadav (2021) observaram o rendimento Combinado de CLEA de  $\beta$ -galactosidase e L-AI obtendo um rendimento de 25% após 24h de reação superior ao da enzima livre, atribuindo esse aumento a um fenômeno de tunelamento do substrato na reação em cascata quando o m-Combi-CLEA foi utilizado como biocatalisador, como já mencionado anteriormente.

Outra maneira de expressar os resultados do uso do m-Combi-CLEA para síntese da D-tagatose, foi então avaliar a taxa de bioconversão em tagatose a partir da galactose produzida no meio reacional. A Figura 17 demonstra que o m-Combi-CLEA (0,6 g) obteve uma conversão em torno de 16% no período de 24h. Em 48h de reação utilizando m-CLEA de L-AI de *Enterococcus faecium*, Sousa e colaboradores (2020) obtiveram uma conversão de 22%.

Figura 17 – Bioconversão de D-tagatose catalisadas pela combinação de 0,3 g m-CLEA de  $\beta$ -GAL e 0,3 g de m -CLEA de L-AI (●), pelo m-Combi-CLEA de  $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,3 g (◆) e pelo m-Combi-CLEA de  $\beta$ -GAL e L-AI com massa de 0,6 g (◆) no período de 24h, a partir da D-galactose formada



Fonte: Elaborado pela autora.



## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos em frascos agitados, observou-se que o extrato de levedura industrial apresenta potencial na substituição do extrato de levedura de grau analítico no meio de cultivo. Contudo, a ausência da triptona no meio resultou em uma redução de cerca de 42% no crescimento do microrganismo em comparação com o meio de referência. Desta forma, ressalta-se a necessidade de otimizar a formulação do meio de cultivo para produção de D-tagatose, com o intuito de assegurar o crescimento apropriado do microrganismo e a obtenção da produção desejada.

Nos estudos conduzidos em biorreator, conclui-se que as condições aeróbicas foram favoráveis para o crescimento e atividade metabólica do microrganismo utilizado, de modo que a aeração impactou positivamente o processo de produção da D-tagatose, registrando uma maior concentração de proteína e atividade enzimática.

Ao aplicar a L-AI produzida, usando a metodologia de agregados enzimáticos reticulados magnéticos, obteve-se um rendimento de imobilização de 100%. Além disso, foi possível comprovar a viabilidade da conversão de lactose na concentração de 500 mM em glicose e galactose pela enzima  $\beta$ -GAL imobilizada. Por fim, a partir dos ensaios de imobilização das enzimas L-AI e  $\beta$ -GAL em um m-Combi-CLEA, foi possível observar a melhora da transferência de massa na relação substrato-enzima, evidenciando o fenômeno em cascata. Esse aprimoramento resultou em uma concentração superior de D-tagatose obtida utilizando o m-Combi-CLEA, em comparação com a obtida ao usar a combinação de m-CLEAs, de modo a demonstrar o potencial e a eficácia do biocatalizador e da enzima imobilizada na conversão de lactose em glicose, galactose e D-tagatose, sugerindo sua aplicabilidade em processos de síntese de interesse industrial.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar parâmetros para o escalonamento da produção da L-arabinose isomerase utilizando a lactose do soro do leite como indutor;
- Avaliar a influência da agitação e da aeração para expressão da L-arabinose isomerase por *Escherichia coli* BL21 em biorreator de bancada;
- Determinar o peso molecular da enzima produzida por eletroforese;
- Conduzir uma análise de custo do meio de cultivo utilizando extrato de levedura industrial;
- Caracterização estrutural do m-Combi-CLEA por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Otimizar as condições operacionais do processo de produção do m-Combi-CLEA através de delineamento experimental;
- Aplicação do soro do leite para obtenção de D-tagatose utilizando o m-Combi-CLEA de  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase;
- Determinar a estabilidade operacional e de estocagem do m-Combi-CLEA.

## REFERÊNCIAS

ABDULHAMID, María Belén; HERO, Johan Sebastian; ZAMORA, Mariana; GÓMEZ, María Inés; NAVARRO, María Carolina; ROMERO, Cintia Mariana. Effect of the biological functionalization of nanoparticles on magnetic CLEA preparation. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 191, p. 689-698, nov. 2021. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.091>.

AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of Combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food And Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 94, p. 555-560, abr. 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.08.003>.

BADENHORST, Christoffel P.s.; BORNSCHEUER, Uwe T.. Getting Momentum: from biocatalysis to advanced synthetic biology. **Trends In Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 180-198, mar. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.003>.

BEADLE, James R; SAUNDERS, James Pl; WAJDA, Thomas J Jr. **Process For Manufacturing Tagatose**. Titular: Biospherics Inc. EUA n. EP0518874A1. Depósito: 01 jul. 1991. Concessão: 23 dez. 1992.

BERTELSEN, H.; JENSEN, B.B.; BUEMANN, B.. D-Tagatose - A Novel Low-Calorie Bulk Sweetener with Prebiotic Properties. **Low-Calories Sweeteners: Present and Future**, [s. l.], p. 98-109, 1999. KARGER. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000059685>.

BORTONE, Nadia; FIDALEO, Marcello. Stabilization of immobilized L-arabinose isomerase for the production of D-tagatose from D-galactose. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 36, n. 6, 30 jun. 2020. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.3033>

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BORNSCHEUER, U. T.; HUISMAN, G. W.; KAZLAUSKAS, R. J.; LUTZ, S.; MOORE, J. C.; ROBINS, K.. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, [s. l.], v. 485, n. 7397, p. 185-194, maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11117>.

BRUGGINK, Alle; SCHOEVAART, Rob; KIEBOOM, Tom. Concepts of Nature in Organic Synthesis: ∴ cascade catalysis and multistep conversions in concert. **Organic Process Research & Development**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 622-640, 16 ago. 2003. American Chemical Society (ACS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/op0340311>.

BUEMANN, Benjamin; TOUBRO, Søren; RABEN, Anne; BLUNDELL, John; ASTRUP, Arne. The acute effect of D-tagatose on food intake in human subjects. **British Journal Of Nutrition**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 227-231, ago. 2000. Cambridge University Press (CUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s000711450000146x>.

CAO, Linqiu. **Carrier-Bound Immobilized Enzymes, Principles, Applications, and Design**. Germany: Wiley-VCH, 2005.

CAO, Linqiu; VAN LANGEN, Luuk; A SHELDON, Roger. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. **Current Opinion In Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 387-394, ago. 2003. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(03\)00096-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(03)00096-x).

CARDOSO, Hugo B.; WIERENGA, Peter A.; GRUPPEN, Harry; SCHOLS, Henk A.. Maillard induced glycation behaviour of individual milk proteins. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 252, p. 311-317, jun. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.106>.

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.I.; ZANGIROLAMI, Teresa C. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 26, p. 00441, jun. 2020. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00441>.

CISAR, J O; KOLENBRANDER, P e; MCINTIRE, F C. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. **Infection And Immunity**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 742-752, jun. 1979. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.24.3.742-752.1979>.

CHOI, Jin Myung; LEE, Yong-Jik; CAO, Thinh-Phat; SHIN, Sun-Mi; PARK, Min-Kyu; LEE, Han-Seung; LUCCIO, Eric di; KIM, Seong-Bo; LEE, Sang-Jae; LEE, Sang Jun. Structure of the thermophilic l-Arabinose isomerase from *Geobacillus kaustophilus* reveals metal-mediated intersubunit interactions for activity and thermostability. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s. l.], v. 596, p. 51-62, abr. 2016. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.033>.

CRUZ-IZQUIERDO, Á.; PICÓ, E.A.; LÓPEZ, C. ; SERRA, J.L.; LLAMA; M.J. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* lipase: an efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. **PLoS One**, 9 (2014), Article e115202. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202>.

DICOSIMO, Robert; MCAULIFFE, Joseph; POULOSE, Ayrookaran J.; BOHLMANN, Gregory. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6437, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35506c>.

DONNER, T. W.; WILBER, J. F.; OSTROWSKI, D.. D-tagatose, a novel hexose: acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity And Metabolism**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 285-291, set. 1999. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-1326.1999.00039.x>.

FAN, Chen; LIU, Kaiqin; ZHANG, Tao; ZHOU, Leon; XUE, Dong; JIANG, Bo; MU, Wanmeng. Biochemical characterization of a thermostable l-arabinose isomerase from a thermoacidophilic bacterium, *Alicyclobacillus hesperidum* URH17-3-68. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 102, p. 120-126, abr. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.001>.

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 Bio/Technology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 147-174, 11 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-016-9417-7>.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Editorial for Special Issue: enzyme immobilization and its applications. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 24, p. 4619, 17 dez. 2019. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24244619>.

FREITAS, Fernanda F.; MARQUEZ, Líbia D.s.; RIBEIRO, Gustavo P.; BRANDÃO, Gabriela C.; CARDOSO, Vicelma L.; RIBEIRO, Eloízio J.. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 58-59, p. 33-38, dez. 2011. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.011>.

FREITAS, Lucas Almeida de. **Preparação de agregados enzimáticos magnéticos (mCLEAs) de  $\beta$ -galactosidase para produção integrada de D-tagatose a partir de lactose**. 2022. 65 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

FREITAS, Lucas A de., SOUSA, Marylane de; RIBEIRO, Laiza B. ; FRANÇA, Ítalo W. L. de; GONÇALVES, Luciana R.B. Magnetic CLEAs of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* as a Potential Biocatalyst to Produce Tagatose from Lactose. **Catalysts**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 306, 30 jan. 2023. MDPI AG. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal13020306>.

FONSECA, Larissa. *Escherichia coli*: uma ferramenta importante para a Biotecnologia. In: FONSECA, Larissa. **Blog do Profissão Biotec**. Porto Alegre, v. 2, jul. 2017. Disponível em: <https://profissao biotec.com.br/escherichia-coli-uma-ferramenta-importante-para-biotecnologia/>. Acesso em: 05 ago. 2023

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized  $\beta$ -galactosidase in different agarose functionalized supports. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 230, p. 56-66, abr. 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.037>.

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

HEATH, E.C.; HURWITZ, Jerard; HORECKER, B.L.; GINSBURG, A.. PENTOSE FERMENTATION BY LACTOBACILLUS PLANTARUM. **Journal Of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 231, n. 2, p. 1009-1029, abr. 1958. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)70463-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(18)70463-8).

HERO, Johan S.; MORALES, Andrés H.; PEROTTI, Nora I.; ROMERO, Cintia M.; MARTINEZ, M. Alejandra. Improved development in magnetic Xyl-CLEAs technology for

biotransformation of agro-industrial by-products through the use of a novel macromolecular cross-linker. **Reactive And Functional Polymers**, [s. l.], v. 154, p. 104676, set. 2020. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104676>.

HIRST, E. L.; HOUGH, L.; JONES, J. K. N.. Composition of the Gum of Sterculia setigera: occurrence of d-tagatose in nature. **Nature**, [s. l.], v. 163, n. 4135, p. 177-177, jan. 1949. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/163177b0>.

HOMAEI, Ahmad Abolpour; SARIRI, Reyhaneh; VIANELLO, Fabio; STEVANATO, Roberto. Enzyme immobilization: an update. **Journal Of Chemical Biology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 185-205, 29 ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.

HONG, Young-Ho; LEE, Dong-Woo; LEE, Sang-Jae; CHOE, Eun-Ah; KIM, Seong-Bo; LEE, Yoon-Hee; CHEIGH, Chan-Ick; PYUN, Yu-Ryang. Production of d-tagatose at high temperatures using immobilized Escherichia coli cells expressing l-arabinose isomerase from Thermotoga neapolitana. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 569-574, 6 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9277-2>.

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. l.], v. 83, p. 121-128, fev. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.026>.

IBRAHIM, Osama O.; SPRADLIN, Joseph E.. **Process for manufacturing D-tagatose**. Titular: Kraft Foods Inc. EUA n. US 6057135 A. Depósito: 13 nov. 1992. Concessão: 02 maio 2000.

INTERNATIONAL Diabetes Federation (org.). **IDF Diabetes Atlas**. 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; GAUTAM, P.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.. Biocatalytic production of D-tagatose: a potential rare sugar with versatile applications. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 16, p. 3430-3437, 25 maio 2017a. Informa UK Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1126550>.

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

KIM, Byoung-Chan; LEE, Yoon-Hee; LEE, Han-Seung; LEE, Dong-Woo; CHOE, Eun-Ah; PYUN, Yu-Ryang. Cloning, expression and characterization of  $\alpha$ -arabinose isomerase from Thermotoga neapolitana: bioconversion of  $\alpha$ -galactose to  $\alpha$ -tagatose using the enzyme. **Fems Microbiology Letters**, [s. l.], v. 212, n. 1, p. 121-126, 18 jun. 2002. Oxford University Press (OUP). DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(02\)00715-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(02)00715-2).

KIM, H.-J.; RYU, S.-A.; KIM, P.; OH, D.-K.. A Feasible Enzymatic Process for D-Tagatose Production by an Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 400-404, 4 abr. 2003. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bp025675f>.

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. l.], v. 85, n. 6, p. 1839-1847, 2 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2210-6>.

KIM, P. Estudos atuais sobre produção biológica de tagatose usando L -arabinose isomerase: uma revisão e perspectiva futura. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s. l.], v.65 , p. 243–249 (2004). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1665-8>.

KOSSEVA, Maria R.; PANESAR, Parmjit S.; KAUR, Gurpreet; KENNEDY, John F.. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 437-447, dez. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2009.09.005>.

KUCHARCZYK, Krzysztof; TUSZYŃSKI, Tadeusz. The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 31-38, jan. 2017. The Institute of Brewing & Distilling. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jib.392>.

LÆRKE, Helle N.; JENSEN, Bent B.; HØJSGAARD, Søren. In Vitro Fermentation Pattern of D-Tagatose Is Affected by Adaptation of the Microbiota from the Gastrointestinal Tract of Pigs. **The Journal Of Nutrition**, [s. l.], v. 130, n. 7, p. 1772-1779, jul. 2000. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/130.7.1772>.

LEE, Dong-Woo; JANG, Hyeung-Jin; CHOE, Eun-Ah; KIM, Byoung-Chan; LEE, Sang-Jae; KIM, Seong-Bo; HONG, Young-Ho; PYUN, Yu-Ryang. Characterization of a Thermostable L-Arabinose ( d -Galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 1397-1404, mar. 2004. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.3.1397-1404.2004>.

LEE, Yong-Jik; LEE, Sang-Jae; KIM, Seong-Bo; LEE, Sang Jun; LEE, Sung Haeng; LEE, Dong-Woo. Structural insights into conserved l-arabinose metabolic enzymes reveal the substrate binding site of a thermophilic l-arabinose isomerase. **Febs Letters**, [s. l.], v. 588, n. 6, p. 1064-1070, 20 fev. 2014. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.023>.

LEVIN, Gilbert V.. Tagatose, the New GRAS Sweetener and Health Product. **Journal Of Medicinal Food**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 23-36, maio 2002. Mary Ann Liebert Inc. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/109662002753723197>.

LI, Xue-Yong; XU, Meng-Qiu; LIU, Hui; ZHOU, Qiang; GAO, Jian; ZHANG, Ye-Wang. Preparation of combined cross-linked enzyme aggregates containing galactitol dehydrogenase and NADH oxidase for l-tagatose synthesis via in situ cofactor regeneration. **Bioprocess And**



**Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 353-364, 19 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-021-02665-w>.

LOSEN, M.; FROLICH, B.; POHL, M.; BUCHS, J.. Effect of Oxygen Limitation and Medium Composition on Escherichia coli Fermentation in Shake-Flask Cultures. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1062-1068, 6 ago. 2004. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bp034282t>.

MANJASETTY, Babu A.; CHANCE, Mark R.. Crystal Structure of Escherichia coli L-Arabinose Isomerase (ECAI), The Putative Target of Biological Tagatose Production. **Journal Of Molecular Biology**, [s. l.], v. 360, n. 2, p. 297-309, jul. 2006. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.040>.

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. l.], v. 30, n. 4, p. 711-720, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-66322013000400003>.

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

MATEO, Cesar; CHMURA, Andrzej; RUSTLER, Sven; VAN RANTWIJK, Fred; STOLZ, Andreas; SHELDON, Roger A.. Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase–nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 320-323, fev. 2006. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.01.020>.

MENDOZA, Maite Rada; OLANO, Agustín; VILLAMIEL, Mar. Chemical Indicators of Heat Treatment in Fortified and Special Milks. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 2995-2999, 16 mar. 2005. American Chemical Society (ACS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf040406l>.

MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.. The Effects of Linoleic Acid Supplementation of Cropped Yeast on its Subsequent Fermentation Performance and Acetate Ester Synthesis. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 227-235, 2002. The Institute of Brewing & Distilling. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00545.x>.

MOORE, Mary Courtney. Drug evaluation: tagatose in the treatment of type 2 diabetes and obesity. **Current Opinion In Investigational Drugs**, London, v. 10, n. 7, p. 924-935, out. 2006.

MUSCHLIOL, Jan; PETERS, Christin; OBERLEITNER, Nikolin; MIHOVILOVIC, Marko D.; BORNSCHEUER, Uwe T.; RUDROFF, Florian. Cascade catalysis – strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. **Chemical Communications**, [s. l.], v.



51, n. 27, p. 5798-5811, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc08752f>.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (org.). **Número de pessoas com diabetes nas Américas mais do que triplica em três décadas, afirma relatório da OPAS**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/11-11-2022-numero-pessoas-com-diabetes-nas-americas-mais-do-que-triplica-em-tres-decadas>. Acesso em: 12 jun. 2023.

PCHELINTSEV, N.A.; YOUSHKO, M.I.; IVEDAS, V.K.. Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 202-207, abr. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.006>.

QUIN, M. B.; WALLIN, K. K.; ZHANG, G.; SCHMIDT-DANNERT, C.. Spatial organization of multi-enzyme biocatalytic cascades. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 20, p. 4260-4271, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c7ob00391a>.

RAI, Shushil Kumar; KUMAR, Varun; YADAV, Sudesh Kumar. Development of recyclable magnetic cross-linked enzyme aggregates for the synthesis of high value rare sugar d-tagatose in aqueous phase catalysis. **Catalysis Science & Technology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 2186-2194, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d0cy02397c>.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.020>.

RHIMI, Moez; ILHAMMAMI, Rimeh; BAJIC, Goran; BOUDEBBOUZE, Samira; MAGUIN, Emmanuelle; HASER, Richard; AGHAJARI, Nushin. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.036>.

RIBEIRO, Laiza Brito. **Otimização das condições de síntese e aplicação de agregados enzimáticos reticulados de  $\beta$  galactosidase com propriedades magnéticas**. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

RICARDI, Natália Carminatti. **Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes porosos de óxidos mistos de sílica/titânia contendo quitosana**. 2021. 98 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/234750/001136445.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 05 jun. 2023.

RICHARDS, E. L.; CHANDRASEKHARA, M. R.. Chemical changes in dried skim-milk during storage. **Journal Of Dairy Research**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 59-66, fev. 1960. Cambridge University Press (CUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0022029900010128>.

ROBINSON, Peter K.. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays In Biochemistry**, [s. l.], v. 59, p. 1-41, 26 out. 2015. Portland Press Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/bse0590001>.

ROH, Hoe J.; KIM, Pil; PARK, Yong C.; CHOI, Jin H.. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1, 1 fev. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1042/ba19990065>.

ROY, Sohini; CHIKKERUR, Jayaram; ROY, Sudhir Chandra; DHALI, Arindam; Kolte, Atul Puroshtam; SRIDHAR, Manpal; SAMANTA, Ashis Kumar. Tagatose as a potential nutraceutical: Production, properties, biological roles, and applications. **Journal Of Food Science**, [s. l.], v. 83, n. 11, p. 2699-2709, nov. 2018. DOI: <https://doi-org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1750-3841.14358>

SANTACOLOMA, Paloma A.; SIN, Gürkan; GERNAEY, Krist V.; WOODLEY, John M.. Multienzyme-Catalyzed Processes: next-generation biocatalysis. **Organic Process Research & Development**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 203-212, 2 dez. 2010. American Chemical Society (ACS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/op1002159>.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde. Resolução SS-SP nº 27 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova Norma Técnica que institui medidas de controle sobre o uso do Glutaraldeído nos Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. **Diário Oficial do Estado**: seção 1, São Paulo, SP, p. 20-23, 01 mar. 2007. Disponível em: <http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=PesquisaLegislacao&dif=s&ficha=1&id=6759&tipo=R ESOLU%C7%C3O&orgao=Secretaria%20da%20Sa%FAde/Estado%20de%20S%E3o%20Paulo&numero=27&situacao=VIGENTE&data=28-02-2007&vide=sim>. Acesso em: 07 ago. 2023.

SCHLEIF, Robert. Regulation of the l-arabinose operon of Escherichia coli. **Trends In Genetics**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 559-565, dez. 2000. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02153-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02153-3).

SCHRITTWIESER, Joerg H; SATTLER, Johann; RESCH, Verena; MUTTI, Francesco G; KROUTIL, Wolfgang. Recent biocatalytic oxidation–reduction cascades. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 249-256, abr. 2011. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.010>.

SERI, Kenji; SANAI, Kazuko; NEGISHI, Shigenori; AKINO, Toshiro. **Prophylactic and remedial preparation for diseases attendant on hyperglycemia, and wholesome food**. Titular: GODO SHUSEI KK .JP n. US5468734A . Depósito: 09 mar. 1993. Concessão: 15 mar 1993.

SHELDON, R.A.. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1583-1587, 23 nov. 2007. Portland Press Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/bst0351583>.

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

SHELDON, Roger A.. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 467-477, 2 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3554-2>.

SHELDON, Roger. CLEAs, Combi-CLEAs and 'Smart' Magnetic CLEAs: biocatalysis in a bio-based economy. **Catalysts**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 261, 14 mar. 2019. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/catal9030261>.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.s.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B.. Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 60, p. 16-24, jan. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011>.

SOUPIONI, Magdalini; GOLFINOPOULOS, Aristidis; KANELLAKI, Maria; KOUTINAS, Athanasios A.. Study of whey fermentation by kefir immobilized on low cost supports using <sup>14</sup>C-labelled lactose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 145, p. 326-330, out. 2013. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.131>.

SOUSA, Marylane de. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-Tagatose por L-Arabinose Isomerase**. 2015. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2015. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/13060/1/2015\\_tese\\_msousa.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/13060/1/2015_tese_msousa.pdf). Acesso em: 07 jun. 2023.

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

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**. 2020. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/57523>. Acesso em: 07 jun. 2023.

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

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

SUN, Zhijun; MIAO, Tingting; YIN, Aiguo; QIU, Hulin; XIAO, Yunyi; LI, Ying; HAI, Jinping; XU, Bo. Optimization of fermentation conditions for production of l-arabinose isomerase of *Lactobacillus plantarum* WU14. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 230-243, 24 nov. 2020. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1989>.

TOLEDO, Mettler. **Biocatálise | Catálise Enzimática**: catalisadores ativos altamente seletivos que apoiam a química sustentável e inovadora. Barueri, SP: Mettler Toledo, 2021. Disponível em: [https://www.mt.com/br/pt/home/applications/L1\\_AutoChem\\_Applications/fermentation/biocatalysis.html#overviewaf](https://www.mt.com/br/pt/home/applications/L1_AutoChem_Applications/fermentation/biocatalysis.html#overviewaf). Acesso em: 05 jun. 2023

TROYANO, E; MARTINEZCASTRO, I; A OLANO,. Kinetics of galactose and tagatose formation during heat-treatment of milk. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 41-43, 1992. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90010-y](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(92)90010-y).

WARD, Owen P. **Biotecnología de la fermentación**: principios, procesos y productos . Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 274p ISBN 8420007064.

XU, Wei; FAN, Chen; ZHANG, Tao; JIANG, Bo; MU, Wanmeng. 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 Science and Business Media LLC. DOI: <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. DOI: <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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6073-0>.

XUE, Rui; WOODLEY, John M.. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 115, p. 183-195, jul. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.033>.

YAMAGUCHI, Hiroshi; KIYOTA, Yuhei; MIYAZAKI, Masaya. Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 174, 24 abr. 2018. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/catal8050174>.

ZHOU, Li; TIAN, Kang-Ming; NIU, Dan-Dan; SHEN, Wei; SHI, Gui-Yang; SINGH, Suren; WANG, Zheng-Xiang. Improvement of D-lactate productivity in recombinant *Escherichia coli* by coupling production with growth. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1123-1130,

25 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0883-x>.

ZUCCA, Paolo; SANJUST, Enrico. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: methods and mechanisms. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 14139-14194, 9 set. 2014. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190914139>.

## APÊNDICE A – PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS VINCULADAS A ESTE TRABALHO

### 1 Resumo publicado em anais de congresso

SOUZA, T. C. ; ALMEIDA, A. C. P. ; RABELO, M. C. ; MANZO, R. M. ; MAMMARELLA, E. J. ; HISSA, D. C. ; GONCALVES, L. R. B.. Expression of L-arabinose isomerase by auto-induction in a batch bioreactor. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 23., 2022, Búzios. **Anais** [...]. Búzios: Galoá, 2022. p. 1-2.

### 2 Capítulo de livro

OLIVEIRA, Ravena Casemiro; RIBEIRO, Laiza Brito; SOUZA, Ticiane Cavalcante de; FREITAS, Lucas Almeida de; ALMEIDA, Ana Carolina Pinto de; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Carbohydrate-active enzymes in the production of lactose-derived tagatose. In: GOLDBECK, Rosana; POLETTO, Patrícia. **Polysaccharide-Degrading Biocatalysts**. [S. l.]: Elsevier, 2023. p. 365-383. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-04497-X>.