

CONVERSÃO DE LACTOSE EM TAGATOSE USANDO MISTURAS DE CLEAS DE β -GALACTOSIDASE E L-ARABINOSE ISOMERASE

Lucas Almeida de Freitas, Marylane de Sousa, Luciana Rocha Barros
Gonçalves

RESUMO

A utilização de enzimas imobilizadas permite melhorar sua eficiência, possibilitando sua reutilização em diferentes processos e fácil separação do produto. Além disso, permite o uso simultâneo de enzimas em reações em cascata, acelerando o processo. Desta forma, o presente trabalho objetiva estabelecer um protocolo eficiente de imobilização da enzima β -galactosidase pela metodologia de *cross-linked enzyme aggregates* (CLEA) magnéticos para a aplicação conjunta a CLEAs magnéticos de L-arabinose isomerase (LAI) para a produção de D-tagatose a partir de lactose. Duas principais metodologias de imobilização foram aplicadas, utilizando dextrana-aldeído como agente reticulante das enzimas, produzindo o derivado mCLEA-DEX, ou utilizando glutaraldeído, produzindo o derivado mCLEA-GLU-1.5. Os biocatalisadores foram avaliados quanto a capacidade de hidrolisar lactose e quanto à estabilidade térmica a 50 °C, temperatura ótima para a atividade da LAI. O derivado mais estável foi usado na produção de D-tagatose junto ao CLEA magnético de LAI, tanto em reatores separados, sequencialmente, como simultaneamente em um mesmo reator. A hidrólise de lactose se deu de forma semelhante para ambos os derivados nas primeiras horas de análise, com uma util superioridade do mCLEA-GLU-1.5 ao final de 7 horas, com 76% de hidrólise, frente aos 60% do mCLEA-DEX. Já quanto à estabilidade térmica a 50 °C, mCLEA-GLU-1.5 apresentou desempenho inferior, com tempo de meia-vida aproximadamente de 1,5 h, frente a 9,5 h do mCLEA-DEX. A enzima livre se mostrou mais estável que ambos os derivados. Com os resultados obtidos, mCLEA-DEX foi escolhido para a aplicação junto ao CLEA magnético de LAI, apresentando 25% de conversão em D-tagatose em reatores sequenciais. O

trabalho permitiu concluir que é viável a utilização da metodologia de CLEAs magnéticos para a imobilização de β -galactosidase e sua aplicação com CLEAs magnéticos de LAI para a produção de D-tagatose. Agradecimento: CNPq.

ABSTRACT

The use of immobilized enzymes allows achieving an improvement in its efficiency, enabling the reuse in different processes and easy product recovery. Besides, it allows the simultaneous use of enzymes in cascade reactions, making it a faster process. Thus, the present work aims to establish an efficient immobilization protocol for β -galactosidase using the magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEA) methodology to apply in processes with L-arabinose isomerase (LAI) magnetic CLEAs, to produce D-tagatose from lactose. Two immobilization strategies were investigated, using glutaraldehyde or dextran-aldehyde as crosslinking agent, producing the mCLEA-GLU-1.5 and mCLEA-DEX derivatives, respectively. The biocatalysts were evaluated in the lactose hydrolysis, as well as its thermal stability at 50 °C, optimal temperature for LAI activity. The most stable derivative was used to produce D-tagatose with the magnetic CLEA of LAI in sequential reactors and simultaneously in the same reactor. The lactose hydrolysis occurred similarly to both derivatives on the first hours of analysis, being slightly higher when using mCLEA-GLU-1.5 at 7 h (76% hydrolysis) when compared to mCLEA-DEX (60% hydrolysis). The thermal stability at 50 °C of mCLEA-DEX ($t_{1/2} = 9$ h) was higher than mCLEA-GLU-1.5 ($t_{1/2} = 1.5$ h). The free enzyme was more stable than both derivatives, however, it cannot be reused. mCLEA-DEX was chosen to be used together with LAI magnetic CLEA, presenting 25% conversion to D-tagatose in sequential reactors. This work allowed to certify the viability of magnetic CLEA methodology to immobilize β -galactosidase and its application with LAI magnetic CLEAs to produce D-tagatose. Acknowledgment: CNPq.

1 INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma das enzimas mais empregadas na indústria de alimentos, devido à sua capacidade de hidrolisar o principal carboidrato do leite, a lactose, em seus monômeros glicose e galactose. Essa atividade hidrolítica é utilizada para a produção de produtos lácteos propícios para pessoas com intolerância à lactose, para evitar a cristalização em sobremesas geladas derivadas do leite, para o tratamento dos efluentes ricos em lactose da indústria de laticínios e para a obtenção dos monômeros constituintes da lactose, que podem ser posteriormente utilizados para diferentes fins, como a produção de etanol, de meios de cultura ou de produtos de alto valor agregado. (Saqib *et al.*, 2017) A galactose obtida da hidrólise da lactose pode ser isomerizada, em outra reação catalisada por enzima, em D-tagatose, um açúcar com alto potencial para substituição da sacarose em dietas mais saudáveis, por ter menor valor calórico, doçura comparável ao açúcar comum e ausência de sabor residual, podendo ser consumido por diabéticos sem afetar a glicemia. (Sousa *et al.*, 2020) Como a D-tagatose é atualmente mais produzida por síntese química, que geralmente resulta em produtos indesejados, a substituição da produção por um método biológico, e a partir de lactose obtida em resíduos de indústrias de laticínios, é atraente e vantajosa para a indústria.

A β -galactosidase é um membro da família das glicosil hidrolases, possuindo seis domínios, incluindo seu domínio catalítico configurado como barril alfa-beta. Podendo ser obtida de diferentes organismos, a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, alvo do presente trabalho, possui um resíduo de ácido glutâmico no seu sítio ativo, que atua como catalisador ácido-base, e outro que funciona como nucleófilo. Dentro do sítio ativo, o monômero D-galactose faz ligações de hidrogênio com outros resíduos em volta do domínio. (Maksimainen *et al.*, 2013)

O trabalho com enzimas em ambiente industrial requer certos cuidados, como controle de temperatura, pH e de possíveis contaminações, mas especialmente no tocante à maximização da eficiência e redução das perdas. Sendo assim, a imobilização enzimática apresenta-se como uma necessidade

para suprir tais condições, por permitir a reutilização das moléculas e possibilitar o aumento de estabilidade da enzima, garantindo máximo aproveitamento de sua atividade (Basso & Serban, 2019). Dentre os diversos métodos de imobilização enzimática existentes, a formação de *cross-linked enzyme aggregates* (CLEA) se mostra bem vantajosa por não necessitar de um suporte específico, reduzindo os custos associados à estratégia. O CLEA consiste de um agregado de enzimas ligadas covalentemente entre si, o que impede a sua solubilização e, consequentemente permite sua separação do meio por técnicas simples como filtração e centrifugação (Sheldon & van Pelt, 2013).

Como mesmo os métodos de separação mais utilizados para CLEA, como a centrifugação e a filtração, ainda possuem limitações, a saber, formação de aglomerados com problemas de transferência de massa atrelados, é vantajoso aplicar uma técnica que permita forma alternativa de separação. Essa técnica envolve o entrecruzamento das enzimas na presença de nanopartículas magnéticas de ferro (MNP) funcionalizadas com grupos amino, para que sejam incorporadas ao derivado. Dessa forma, os derivados podem ser separados do meio reacional através da aplicação de campo magnético (Velasco-Lozano *et al.*, 2015). O protocolo de CLEAs magnéticos foi, inclusive, já utilizado para a imobilização de L-arabinose isomerase, a enzima responsável pela catálise da reação de isomerização da galactose em D-tagatose. (Sousa *et al.*, 2020)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivando uma eficiência de hidrólise da lactose do soro de leite, subproduto comum e pouco aproveitado nas indústrias de laticínios, para produção de galactose, o presente trabalho propõe-se a realizar a imobilização da β -galactosidase em CLEAs magnéticos, e utilizar os derivados em conjunto aos CLEAs magnéticos de L-arabinose isomerase, para a produção de D-tagatose. Com isso, espera-se otimizar a recuperação dos derivados após

utilização nos processos industriais, bem como sua estabilidade térmica, eficiência catalítica e estabilidade operacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar diferentes métodos de reticulação para formação de CLEAs magnéticos de β -galactosidase, quanto à atividade.
- Testar a capacidade de hidrólise de lactose pelos derivados de β -galactosidase.
- Verificar a estabilidade dos derivados de β -galactosidase na temperatura ótima de atuação da L-arabinose isomerase.
- Obter os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada.
- Atestar a viabilidade de armazenamento e de reutilização dos derivados de β -galactosidase.
- Aplicar os derivados de β -galactosidase junto a derivados de L-arabinose isomerase sequencialmente para produzir D-tagatose a partir de lactose.

3 METODOLOGIA

3.1 Síntese e funcionalização das nanopartículas magnéticas com APTES

A síntese de magnetite foi realizada como descrito anteriormente por Bezerra *et al.* (2017), com modificações. Inicialmente dissolveu-se cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura previamente acidificada com ácido clorídrico 5% (pH 3,0 – 4,0), sob agitação magnética, durante 30 minutos. O processo seguiu então as etapas descritas por Sousa *et al.* (2020), submetendo a solução aquosa a agitação ultrassônica, com a adição continuada de hidróxido de amônio (NH_4OH). O procedimento de funcionalização

seguiu a mesma metodologia, com a adição de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) às nanopartículas.

3.2 Produção de CLEA magnéticos de β -galactosidase utilizando glutaraldeído

A produção de amostras com a utilização de glutaraldeído como agente reticulante seguiu a metodologia previamente estabelecida por Gaur *et al.* (2006), com algumas modificações. Para cada amostra, dissolveu-se 0,020 g de β -galactosidase liofilizada em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, e a solução foi mantida sob agitação magnética em banho de gelo. À solução enzimática, foi adicionado 0,550 g de sulfato de amônio, o agente precipitante, e, posteriormente, 1 mL de solução de sulfato de amônio 55% m/v. Após 15 minutos de agitação, foi adicionado às amostras 0,020 g de MNP e glutaraldeído (25%), mantendo-se a mistura sob agitação mecânica constante, em banho de gelo, durante 16 h. As quantidades de glutaraldeído utilizadas foram 50, 80 e 120 μ L, relativo às amostras mCLEA-GLU-0.6, mCLEA-GLU-1 e mCLEA-GLU-1.5, respectivamente. Os derivados formados foram lavados em solução tampão diversas vezes.

3.3 Produção de CLEA magnéticos de β -galactosidase utilizando dextrana-aldeído

A dextrana-aldeído utilizada foi produzida através da oxidação de uma solução de dextrana com periodato de sódio, durante 90 min, sob agitação e à temperatura ambiente. A solução foi dialisada por 10 horas no total, com 5 trocas da água de diálise. A metodologia seguida para a formação dos CLEA magnéticos utilizando dextrana-aldeído, a amostra mCLEA-DEX, foi a previamente descrita por Mateo *et al.* (2004), com modificações. Foi solubilizado 0,020 g de β -galactosidase liofilizada em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 8,0, mantendo-se esta solução sob agitação magnética em banho de gelo. Adicionou-se então 0,550 g de sulfato de amônio à solução, seguido de 1 mL de solução de sulfato de amônio 55% m/v. Posteriormente, foram adicionados 0,020 g de MNP seguidos de 2 mL da solução de dextrana-aldeído, mantendo-se a

mistura sob agitação mecânica constante, em banho de gelo, durante 16 horas. Os derivados formados foram lavados em solução tampão diversas vezes.

3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para calcular os parâmetros cinéticos velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_M), os derivados mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX e a enzima livre foram utilizados para reação de conversão em soluções de lactose de concentração crescente (5, 10, 20, 30, 50, 100 e 200 mM), por 60 minutos, como previamente descrito por Li *et al.* (2015), com modificações. Para os derivados, utilizou-se 0,025 g de enzima imobilizada em 250 μ L de solução de lactose, enquanto para a enzima livre, utilizou-se 650 μ L de solução dialisada de β -galactosidase em 850 μ L de solução de lactose. As medidas de concentração de glicose resultante da reação de conversão foram realizadas utilizando o kit de glicose Bioclin®.

3.5 Estabilidade térmica dos biocatalisadores imobilizados e solúveis

Para cada ensaio com biocatalisadores imobilizados em CLEA, foram ressuspensos 150 mg de derivado em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,6, previamente aquecido a 60 ou a 50 °C. Para a enzima livre, uma solução com a concentração ajustada para igualar-se à dos derivados foi adicionada ao tampão previamente aquecido. As soluções foram mantidas à temperatura constante com a retirada de amostras para medida de atividade nos tempos de 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos para a temperatura de 60 °C, e nos tempos de 0, 5, 15 e 30 minutos, e a cada hora para a temperatura de 50 °C, até 7 horas de experimento, e entre as 16 e 24 horas. As curvas relacionando atividade residual como porcentagem da atividade inicial ao tempo foram construídas no software Origin 8.5, utilizando um modelo de desativação enzimática previamente descrito por Sadana e Henley (1987) para determinar o tempo de meia-vida dos biocatalisadores.

3.6 Ensaio de hidrólise de lactose

O ensaio de hidrólise de lactose foi conduzido como previamente descrito por Lima *et al.* (2013), com modificações. Para os derivados mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX, seguiu-se um mesmo protocolo, consistindo na adição de 0,2942 g de derivado em um reator contendo 5 mL de solução de lactose 164 mM. Para a enzima livre, foi adicionado um volume de solução com a atividade correspondente à presente nos CLEAs. O reator foi mantido a 37 °C e sob agitação constante. As amostras foram retiradas em pontos com intervalos de 30 minutos nas duas primeiras horas, e a cada hora até 7 horas de experimento, com outras amostras sendo retiradas apenas após 24 horas de análise, para medir a hidrólise da lactose em galactose e glicose. Para a medida da concentração de glicose, foi utilizado o Kit de Glicose Bioclin®. Para efeitos comparativos, os mesmos derivados foram submetidos à análise de atividade convencional.

3.7 Ensaios de estabilidade operacional e à estocagem

Para a avaliação da estabilidade operacional dos derivados, as amostras foram submetidas a 10 ciclos de conversão de lactose, cada um com duração de 60 minutos. A concentração de lactose utilizada em cada ciclo foi de 164 mM e o volume foi de 5 mL. As reações ocorreram a 37 °C e a massa inicial de derivado utilizada, para cada amostra, foi de 0,53g. Ao fim de cada ciclo, a conversão foi medida utilizando o kit de glicose Bioclin®. Para a avaliação da estabilidade à estocagem, suspensões de 0,1 g de mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX em 1 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,6, bem como 1 mL de enzima livre dialisada, foram mantidas em refrigerador a 4 °C. Amostras foram retiradas para medida de atividade após 0, 2, 6 e 10 semanas de armazenamento.

3.8 Ensaio de aplicação

A aplicação sequencial consistiu na primeira etapa, lactólise no biorreator 1 utilizando β -galactosidase imobilizada (mCLEA-DEX), seguida de isomerização por L-arabinose-isomerase imobilizada (mCLEA-LAI) de D-

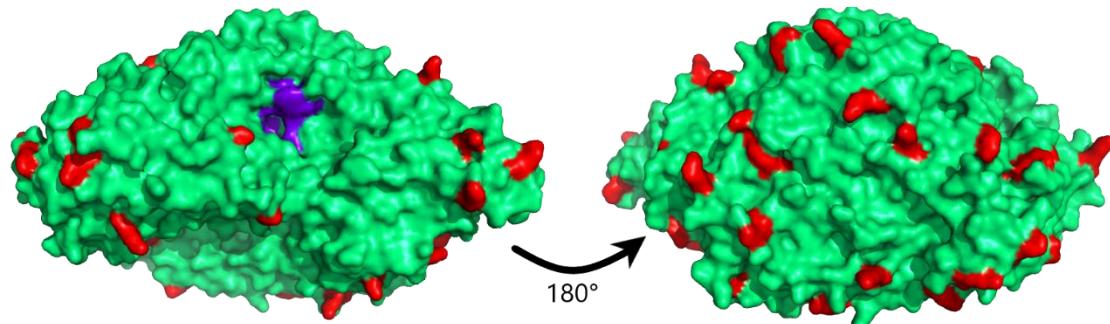
galactose em D-tagatose no biorreator 2. O derivado foi utilizado em processo batelada com lactose (164 mM) como substrato. A produtividade foi expressa em termos de carboidratos e a D-tagatose foi quantificada pelo método da cisteína-carbazol ácido sulfúrico (Sousa *et al.*, 2020).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da concentração de glutaraldeído

O glutaraldeído é um reagente bifuncional, capaz de reagir com grupos amino de resíduos de aminoácidos lisina, formando entre eles uma ligação entrecruzada. Diversos trabalhos já foram produzidos atestando a efetividade do glutaraldeído como agente entrecruzante para a formação de CLEA, inclusive com β -galactosidase, como por Gaur *et al.* (2006), por Ulrich *et al.* (2017) e por Li *et al.* (2015). A β -galactosidase é uma enzima com diversos aminoácidos lisina em sua estrutura (Figura 1), o que a torna apta à imobilização utilizando ligação covalente por meio desses grupos. No presente trabalho, foi feita uma avaliação do efeito da concentração do glutaraldeído utilizado para reticular as moléculas enzimáticas na atividade recuperada do CLEA, bem como na sua estabilidade térmica. Após a precipitação da enzima em todas as amostras com o sulfato de amônio, o glutaraldeído foi adicionado nas amostras em volumes que resultaram nas concentrações de 0,625% v/v (mCLEA-GLU-0.6), 1,000% v/v (mCLEA-GLU-1) e 1,500% v/v (mCLEA-GLU-1.5). Embora em todas essas amostras a taxa de precipitação tenha sido de 100%, ou seja, não houve perda de moléculas de enzima no sobrenadante, pode-se verificar uma diferença na atividade recuperada em cada uma, como mostrado na Tabela 1.

Figura 1 – β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*



Fonte: Maksimainen *et al.* (2013). Visualização tridimensional da estrutura da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. O sítio ativo está marcado em roxo e os resíduos de lisina em vermelho. Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, com o código de acesso 4IUG.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização e atividade dos derivados produzidos.

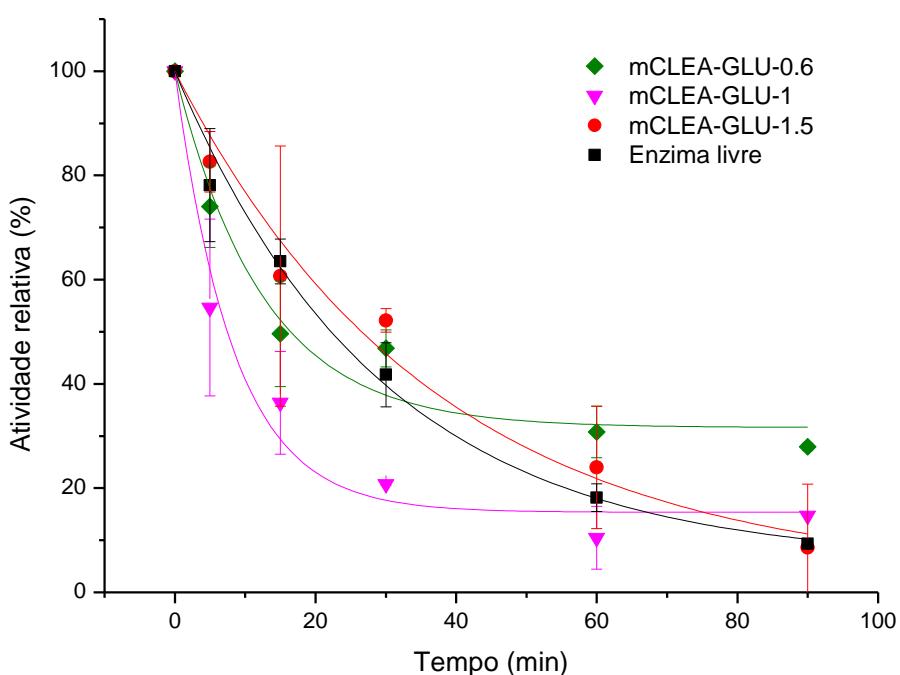
Amostra	Atividade teórica (U)	Atividade do derivado (U)	Atividade recuperada (%)
mCLEA-GLU-0.6	10,925	1,307	11,961
mCLEA-GLU-1	10,925	2,306	21,110
mCLEA-GLU-1.5	10,925	2,649	24,247
mCLEA-PEI	10,925	0,736	6,737
mCLEA-DEX	10,893	8,024	73,661

Fonte: elaborado pelo autor. A atividade recuperada é uma razão entre a atividade do derivado e a atividade teórica, esta definida com base na atividade de enzima oferecida e na atividade obtida no sobrenadante. A amostra CLEA-GLU-0.6 foi produzida com uma concentração de 0,625% de glutaraldeído, enquanto CLEA-GLU-1 foi produzido com 1% de glutaraldeído e CLEA-GLU-1.5 com 1,5%. CLEA-GAL e CLEA-PEI foram produzidos com 1,5% de glutaraldeído, com a presença de galactose ou com posterior recobrimento por polietilenoimina, respectivamente. A amostra CLEA-DEX foi produzida com dextrana-aldeído.

A amostra mCLEA-GLU-0.6 foi a que apresentou menor atividade recuperada, e percebe-se que a atividade cresceu junto ao aumento da concentração de glutaraldeído, tendo sido melhor na amostra CLEA-GLU-1.5. O trabalho de Ulrich *et al.* (2017) apresenta um rendimento de atividade bem inferior (3,1%) aos obtidos no presente trabalho (11,9%, 21,1% e 24,2%), utilizando os mesmos agentes precipitante e reticulante, ou seja, sulfato de

amônio e glutaraldeído. Essa discrepância se deve provavelmente ao maior nível de saturação do agente precipitante utilizado no presente estudo. Sendo também submetidas ao ensaio de estabilidade térmica a 60 °C, foi também possível verificar que a amostra CLEA-GLU-1.5 apresentou um desempenho superior às demais, apresentando o maior tempo de meia-vida, inclusive em relação à enzima livre. Apenas a amostra CLEA-GLU-1 apresentou um desempenho inferior ao da enzima livre, como é possível verificar no perfil apresentado na Figura 2. Em seu trabalho, Li *et al.* (2015) também verificaram a superioridade em estabilidade térmica do derivado de β -galactosidase produzido com glutaraldeído em relação à enzima livre, ainda que o experimento tenha sido realizado a uma diferente temperatura (40 °C). Este aumento na performance de estabilidade térmica dos derivados frente à enzima livre é um indicativo de que a reticulação auxilia na manutenção da conformação molecular das enzimas quando submetidas a temperaturas acima da temperatura ótima da enzima.

Figura 2 – Desativação térmica dos derivados produzidos com glutaraldeído



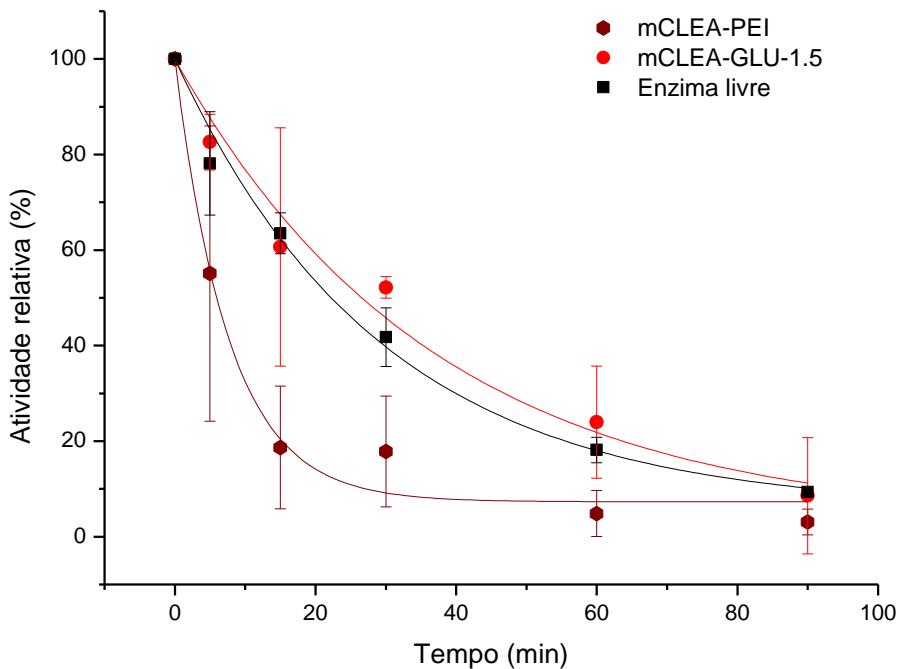
Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C dos derivados produzidos em diferentes concentrações de glutaraldeído e da enzima livre, em termos de atividade relativa à

inicial por tempo em minutos. As reações ocorreram em tampão fosfato de potássio, pH 6,6, com MnCl₂ 0,1 mM como cofator.

4.2 Efeito de alterações na produção de derivados com glutaraldeído

Como a amostra mCLEA-GLU-1.5 foi a que apresentou melhor desempenho tanto em recuperação de atividade quanto em estabilidade térmica, a concentração de glutaraldeído ideal foi definida como a de 1,5%, sendo utilizada para os experimentos de produção dos derivados seguida de recobrimento. A polietilenoimina (PEI) foi utilizada para recobrir os derivados objetivando um aumento da estabilidade térmica, já que suas cadeias poliméricas são capazes de recobrir as moléculas de enzimas para evitar que percam sua conformação durante o aquecimento. Entretanto, a amostra mCLEA-PEI apresentou uma performance diferente da esperada. Tanto a recuperação de atividade quanto a estabilidade térmica foram drasticamente reduzidas, como é mostrado na Tabela 1 e na Figura 3. Acredita-se que a razão para esse fenômeno tenha sido o bloqueio dos sítios ativos das enzimas por parte das cadeias poliméricas de PEI, impedindo a realização plena da atividade enzimática. Ainda com a baixa performance apresentada pelo mCLEA-PEI na medida de atividade com o substrato ONPG, a amostra foi levada para o ensaio de hidrólise de lactose, para avaliar sua performance frente ao substrato natural da enzima.

Figura 3 – Desativação térmica dos derivados produzidos com 1,5% de glutaraldeído



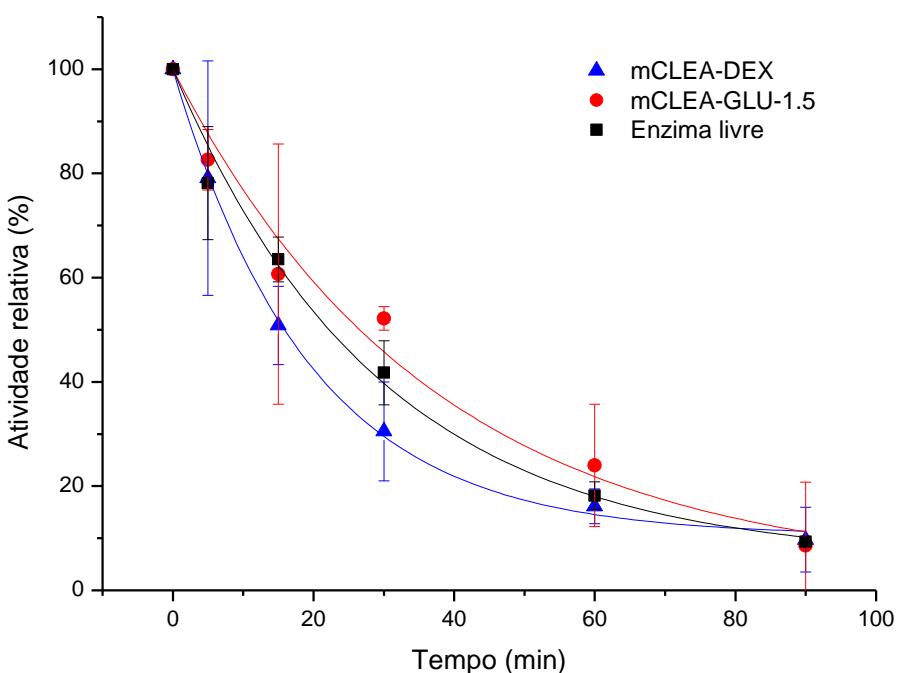
Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C da enzima livre e dos derivados produzidos com concentração de 1,5% de glutaraldeído, incluindo o recobrimento do derivado, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos. As reações ocorreram em tampão fosfato de potássio (pH 6,6), com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator.

4.3 Produção de derivados com dextrana-aldeído como agente reticulante

Como uma alternativa à utilização de glutaraldeído como agente reticulante, escolheu-se utilizar a dextrana-aldeído, que possui proporções moleculares bem maiores e já foi relatada como um agente útil para a produção de CLEAs com boa recuperação de atividade. A amostra mCLEA-DEX, como mostrado na Tabela 1, apresentou uma recuperação de atividade acima de 70%, indicando um aproveitamento satisfatório de atividade em relação à enzima livre, um desempenho mais de duas vezes superior ao apresentado pela amostra mCLEA-GLU-1.5. Mateo *et al.* (2004) estudaram a atividade reticulante de

diversos agentes em relação a suas proporções moleculares, concluindo que a utilização de dextrana-aldeído resulta em altos rendimentos de imobilização devido às suas grandes dimensões moleculares, que impedem a reação com resíduos do sítio ativo das enzimas. A provável razão para a discrepância entre a recuperação de atividade entre os derivados produzidos com glutaraldeído ou com dextrana-aldeído é o enrijecimento molecular causado pela formação de ligações covalentes entre o glutaraldeído e os grupamentos básicos das enzimas em regiões críticas, que pode provocar alterações em volta do sítio ativo, como evidenciado por Talekar *et al.* (2013). Já com relação à estabilidade térmica a 60 °C, a amostra mCLEA-DEX apresentou uma performance ligeiramente inferior tanto à mCLEA-GLU-1.5 quanto à enzima livre, como pode ser verificado no perfil de desativação apresentado na Figura 4, perdendo sua atividade em uma taxa mais acelerada.

Figura 4 – Desativação térmica dos derivados produzidos com diferentes agentes reticulantes



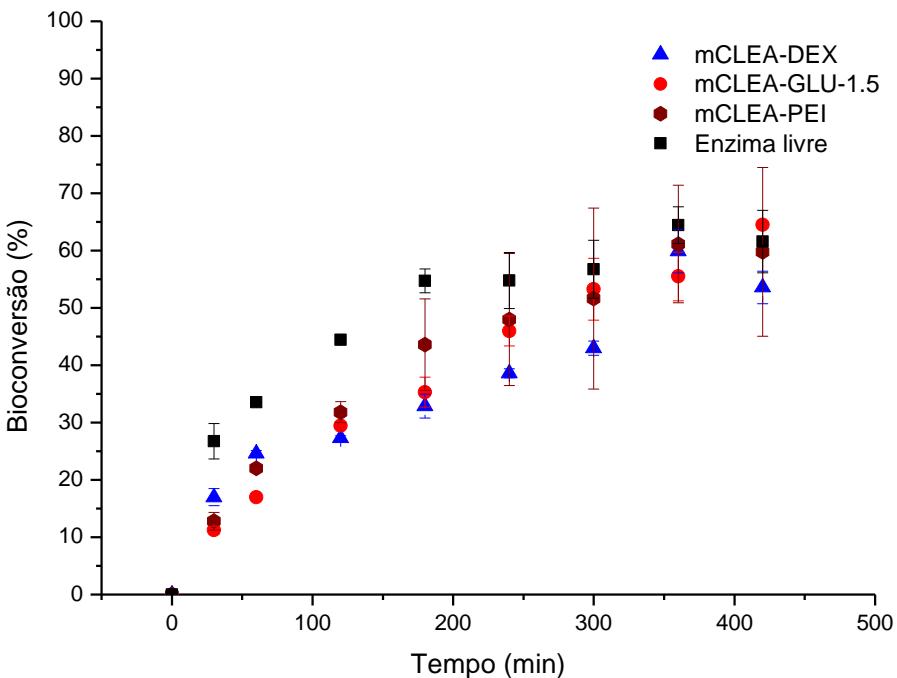
Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C dos derivados produzidos com glutaraldeído e dextrana-aldeído e da enzima livre, em termos de atividade relativa à inicial por

tempo em minutos. As reações ocorreram em tampão fosfato de potássio, pH 6,6, com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator.

4.4 Hidrólise de lactose

Como os ensaios de atividade realizados com os derivados e com a enzima livre utilizam um substrato artificial (ONPG), faz-se necessária a experimentação da atividade desses derivados frente ao substrato natural da enzima, a lactose. Os melhores derivados foram levados adiante para o ensaio de hidrólise de lactose, consistindo nas amostras mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX, bem como a amostra mCLEA-PEI, para verificar seu comportamento frente à lactose, e a enzima livre. A escolha dos melhores derivados se deu com base nos parâmetros de imobilização, atividade e tempo de meia-vida a 60 °C. Os três derivados, mCLEA-GLU-1.5, mCLEA-DEX e mCLEA-PEI, apresentaram um bom perfil de conversão, bem semelhantes entre eles e próximos ao perfil da enzima livre, como pode ser verificado na Figura 5. Porém, nas horas iniciais é perceptível uma sutil acentuação na velocidade de conversão pela mCLEA-DEX, o que provavelmente está relacionado ao não comprometimento de resíduos essenciais à atividade enzimática. Já as fortes ligações proporcionadas pelo glutaraldeído podem ter inviabilizado a atividade de uma porção considerável das moléculas enzimáticas, o que explica o leve atraso na conversão da lactose, apesar do bom desempenho em relação à estabilidade térmica. O comportamento do mCLEA-PEI mostra que o recobrimento não afetou sua capacidade de hidrolisar a lactose, mas como há uma etapa adicional na sua produção, decidiu-se descartar essa opção dos ensaios seguintes, prosseguindo apenas com mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX.

Figura 5 – Hidrólise da lactose pelos derivados e enzima livre

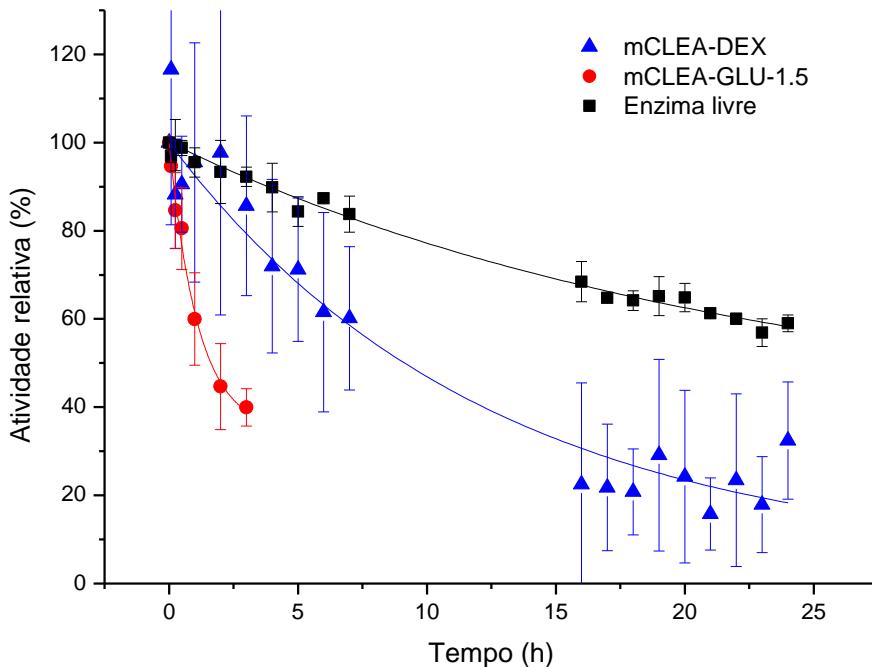


Fonte: elaborado pelo autor. Síntese enzimática de D-galactose e D-glicose catalisada por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* immobilizada por CLEA magnético e livre. As reações ocorreram em solução de lactose 164 mM, preparada em tampão fosfato de potássio (pH 6,6), com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator, a 37 °C. A conversão do substrato em produto está representada em função do tempo de reação em minutos. As reações ocorreram em volume final de 5 mL, com adição de 0,3 g de CLEA ou de enzima livre com atividade correspondente.

4.5 Estabilidade térmica dos biocatalisadores a 50 °C

As amostras de enzima livre, mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX foram submetidas à temperatura de 50 °C durante 24 horas, e os perfis de decaimento térmico estão representados na Figura 6. Percebe-se uma mudança gradual entre os perfis da enzima livre, do mCLEA-DEX, e do mCLEA-GLU-1.5, com uma redução do tempo de meia-vida, na ordem apresentada, tendo o mCLEA-GLU-1.5 apresentado a meia-vida antes de 3 horas de análise, motivo pelo qual não se prosseguiu com as leituras dessa amostra.

Figura 6 – Decaimento térmico a 50 °C dos derivados e enzima livre



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 50 °C de imobilizados de β -galactosidase produzidos com glutaraldeído e com dextrana-aldeído e da enzima livre dialisada, em termos de atividade relativa por tempo em minutos. As reações ocorreram em tampão fosfato de potássio, pH 6,6, com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator.

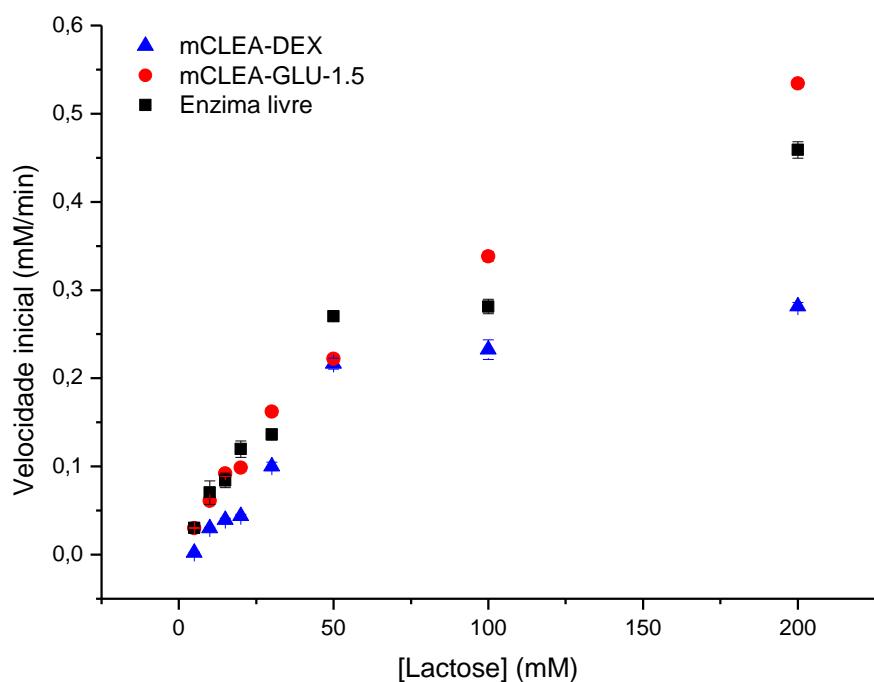
A imobilização de β -galactosidase no presente trabalho tem como objetivo a aplicação junto a CLEAs magnéticos de L-arabinose-isomerase, enzima que atua na temperatura ótima de 50 °C (Sousa *et al.*, 2020). Dessa forma, é essencial verificar se os derivados de β -galactosidase mantêm sua estabilidade nessa temperatura. Ao passo que o mCLEA-DEX apresentou uma queda mais lenta nas primeiras horas, ainda mais acentuada que a da enzima livre, o mCLEA-GLU-1.5 apresentou um decaimento ainda mais acentuado, chegando à metade de sua atividade inicial aos 98 minutos de análise. O mCLEA-DEX apresentou um tempo de meia-vida de mais de 9 horas, enquanto a enzima livre prosseguiu sem chegar à metade de sua atividade inicial com 24 horas de análise. Estima-se pela curva de Sadana-Henley que o tempo de meia-vida para a enzima livre seja de 35 horas. Comportamentos similares foram apresentados por Gaur *et al.* (2006), comparando-se diferentes metodologias de imobilização de β -galactosidase, onde a imobilização por mCLEA apenas apresentou melhor

estabilidade térmica que a imobilização em quitosana em uma das três temperaturas estudadas. É válido ressaltar que no presente experimento, os CLEAs não estavam na presença do substrato natural, o que retira da análise o fator de proteção da conformação enzimática pelo substrato.

4.6 Avaliação dos modelos cinéticos utilizando lactose como substrato

Obteve-se a velocidade inicial em cada concentração de substrato para a enzima livre e para as amostras m-CLEA-GLU-1.5 e m-CLEA-DEX, através da aferição da quantidade de glicose produzida pela hidrólise da lactose catalisada pela enzima. Os resultados foram ajustados utilizando o software Origin 8.5, gerando as curvas mostradas na Figura 7. Os parâmetros cinéticos determinados, K_M e V_{max} , foram respectivamente 96 mM e 0,65 mM·min⁻¹ para a enzima livre, 167 mM e 0,96 mM·min⁻¹ para m-CLEA-GLU-1.5, e 87 mM e 0,42 mM·min⁻¹ para m-CLEA-DEX.

Figura 7 – Cinética da reação de hidrólise dos derivados e enzima livre



Fonte: elaborado pelo autor. Influência da concentração de lactose na taxa inicial da reação de hidrólise catalisada por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre e imobilizada por CLEA magnéticos. As reações ocorreram em tampão fosfato de potássio, pH 6,6, com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator, a 37 °C.

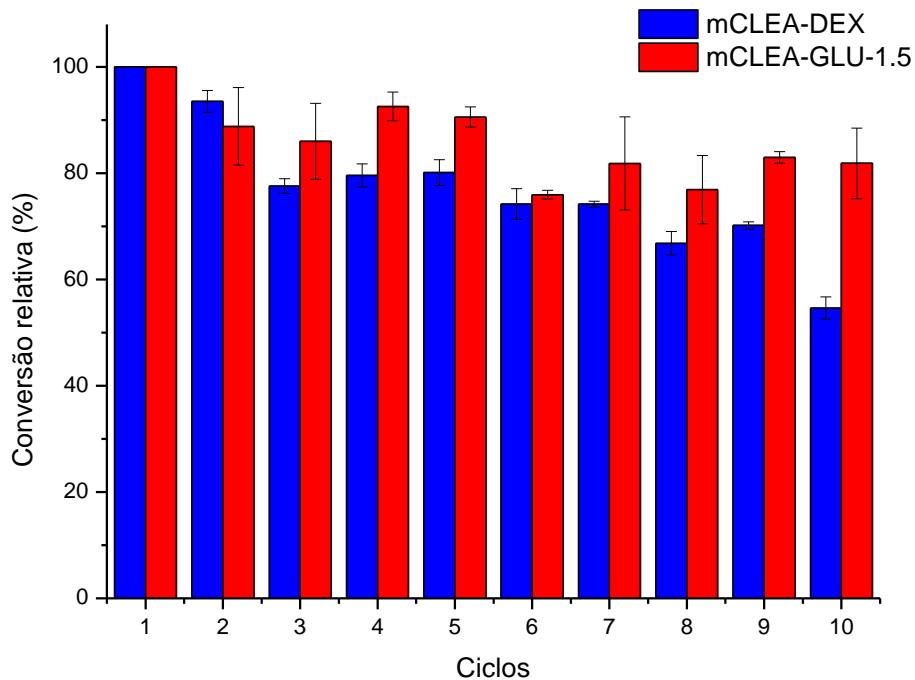
A obtenção dos parâmetros cinéticos dos biocatalisadores imobilizados e da enzima livre permitiram, além da obtenção de informações importantes acerca da taxa de reação enzimática, a avaliação da afinidade das enzimas pelo substrato, e como a imobilização com cada agente reticulante influenciou esse parâmetro. A princípio, os modelos cinéticos mostram a enzima, tanto livre quanto imobilizada, segue uma cinética de Michaelis-Menten. Não houve uma diferença significativa entre o K_m do mCLEA-DEX e da enzima livre, porém a velocidade máxima do mCLEA-DEX foi um pouco inferior. Já para o mCLEA-GLU-1.5, o valor de K_m foi consideravelmente maior que o da enzima livre, implicando que a imobilização com glutaraldeído provocou uma redução de afinidade da enzima pelo seu substrato natural. Essa mudança cinética, representada pelo aumento do valor do K_m , entre enzima livre e imobilizada também foi reportada por Li *et al.* (2015) e Gaur *et al.* (2005), que trabalharam com a imobilização em CLEA, com a utilização de glutaraldeído, de uma β -galactosidase obtida de biblioteca metagenômica e de *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

4.7 Reutilização e armazenamento dos biocatalisadores

Submetidos a 10 ciclos de operação, os derivados mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX começaram a apresentar diferenças significativas na sua atividade relativa à inicial a partir do 3º ciclo de operação, como pode ser visualizado na Figura 8, finalizando no 10º ciclo com cerca de 80% da atividade inicial para o mCLEA-GLU-1.5 e cerca de 60% para o mCLEA-DEX. Ao final dos 10 ciclos de operação, ambos os derivados apresentaram uma atividade relativa à inicial satisfatória, indicativo de uma boa estabilidade operacional, e consequentemente de uma adequabilidade à reutilização, que é o principal propósito da imobilização. Resultados similares com CLEA de β -galactosidase produzido com glutaraldeído foram obtidos por Li *et al.* (2015), que também

chegaram a uma atividade relativa próxima de 80% ao final de 10 ciclos. Dessa forma, o potencial para produção econômica quanto à hidrólise da lactose em glicose e galactose se mostrou expressivo.

Figura 8 – Estabilidade operacional dos derivados

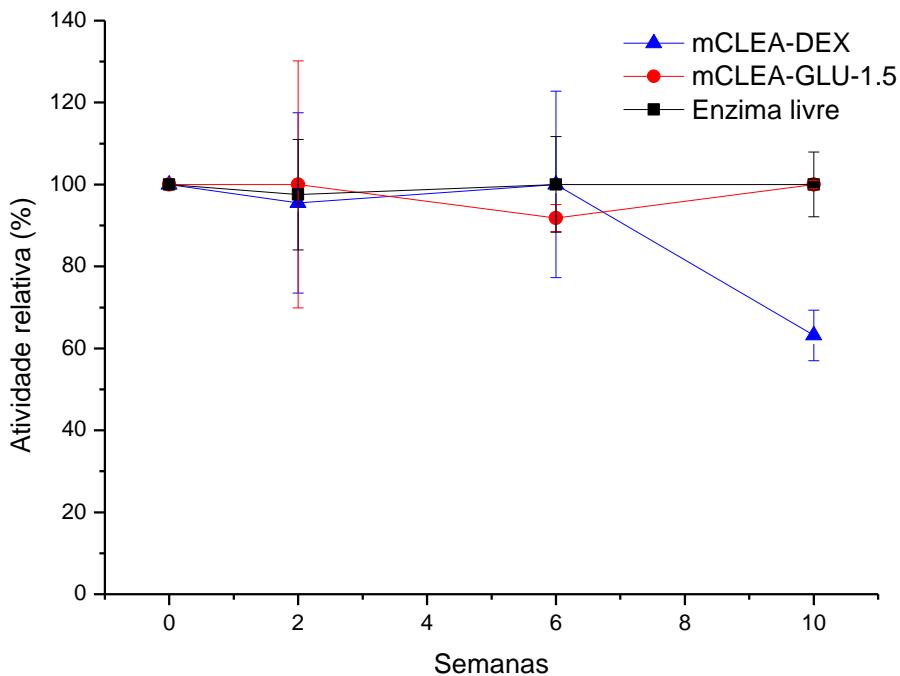


Fonte: elaborado pelo autor. Estabilidade operacional dos mCLEA-GLU-1.5 e mCLEA-DEX de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, ao longo de 10 ciclos de 60 minutos de duração. As bateladas de hidrólise subsequentes foram realizadas em solução de lactose 164 mm preparada em tampão fosfato de potássio (pH 6,6), com $MnCl_2$ como cofator, a 37 °C.

Outro parâmetro importante para os derivados, a estabilidade à estocagem, foi avaliada por 10 semanas, a 4 °C. Os resultados de atividade relativa dos derivados e da enzima livre após 10 semanas de armazenamento a 4 °C estão mostrados na Figura 9. Após o final do período, o mCLEA-GLU-1.5 apresentou uma superativação do biocatalisador, indicando 100% de retenção de atividade, e, logo, completa estabilidade, semelhante ao comportamento da enzima livre. Já o mCLEA-DEX, apesar de manter a atividade relativa alta nas 6 primeiras semanas, mostrou uma redução de atividade ao final do período de estocagem, retendo 63% de sua atividade. Esses resultados mostram que o mCLEA-GLU-1.5 apresenta uma estabilidade maior que o mCLEA-DEX, tanto

em relação ao armazenamento quanto à reutilização, ainda que não tenha apresentado a mesma performance em relação à temperatura de 50 °C.

Figura 9 – Estabilidade à estocagem dos derivados e da enzima livre



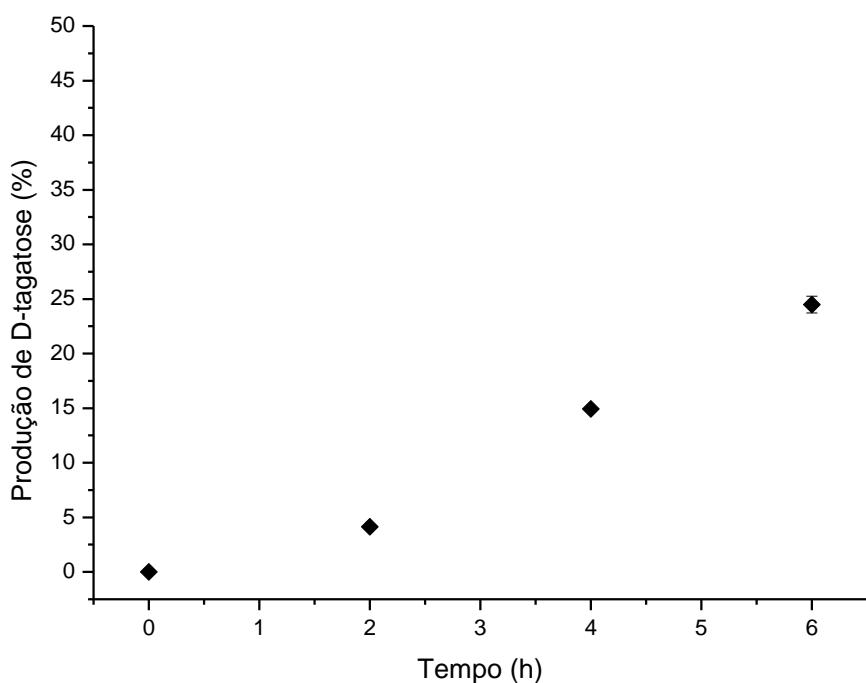
Fonte: elaborado pelo autor. Estabilidade à estocagem da enzima livre, do mCLEA-GLU-1.5 e do mCLEA-DEX de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, durante 10 semanas. Condições de análise: 0,1 g de derivado em 1 mL de tampão fosfato de potássio (pH 6,6), com $MnCl_2$ 0,1 mM como cofator, a 37 °C. A atividade foi obtida pela leitura da absorbância a 420 nm, por 2 minutos, da reação de 50 μ L de suspensão ou 25 μ L de enzima livre em 2 mL de ONPG 1,25 mM.

4.8 Aplicação sequencial de derivados de β -galactosidase e de L-arabinose-isomerase

A performance da aplicação dos mCLEAs de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* (Sousa et al., 2020) no processo de bioconversão da lactose em D-tagatose foi estudada em biorreatores sequenciais, utilizando 0,3 g do mCLEA-DEX em 5 mL do substrato lactose 164 mM, a 50 °C. Os resultados da produção de D-tagatose estão mostrados na Figura 10.

A aplicação sequencial consistiu na hidrólise da lactose em D-glicose e D-galactose no biorreator 1 pelo mCLEA-DEX, seguida da isomerização de D-galactose em D-tagatose no biorreator 2 pelo mCLEA-LAI. A primeira etapa foi realizada durante 24 h, resultando em 100% de conversão da lactose, e o produto foi aplicado à segunda etapa, resultando ao final de 6 horas de reação em 25% de conversão em D-tagatose. O resultado demonstra a aplicabilidade dos CLEA de β -galactosidase como parte da produção de D-tagatose a partir da lactose. Para os próximos passos do estudo, deve ser realizada a aplicação de ambos os CLEA em um único biorreator, para verificar a viabilidade de acoplar as reações tornando o processo mais rápido de forma geral.

Figura 10 – Produção de D-tagatose em biorreatores sequenciais



Fonte: elaborado pelo autor. Bioconversão nas primeiras 6 horas da biotransformação de lactose em D-tagatose, a 50 °C utilizando duas enzimas imobilizadas mCLEA-DEX e m-CLEA-LAI, em biorreatores sequenciais.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram apresentadas diferentes abordagens para o estabelecimento do melhor protocolo para a imobilização de β -galactosidase pela metodologia de CLEAs magnéticos. Duas principais abordagens foram alcançadas, utilizando dextrana-aldeído ou glutaraldeído a 1,5 % como agente reticulante. Cada um apresenta vantagens e desvantagens, e embora em alguns aspectos se mostrem inferiores à enzima livre, cumprem o papel principal da enzima imobilizada, que é sua eficiente reutilização.

Foi atestada a viabilidade da utilização de CLEAs magnéticos de β -galactosidase com CLEAs de L-arabinose isomerase em reatores sequenciais, para uma produção satisfatória de D-tagatose, açúcar de alto valor agregado. Para próxima etapa, é necessário verificar a eficiência da utilização dos CLEAs de ambas as enzimas em um mesmo reator, otimizando as condições de forma a favorecer ambas as reações da cascata.

REFERÊNCIAS

- BASSO, A.; SERBAN, S., Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular catalysis**, 479 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- BEZERRA, R. M.; NETO, D. M. A.; GALVÃO, W. S.; RIOS, N. S.; CARVALHO, A. C. L. d. M.; CORREA, M. A.; GONÇALVES, L. R. B. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, 125, 104–115, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.024>
- GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v.97, p. 426-430, 2006.

LI, L.; LI, G.; CAO, L. C.; REN, G. H.; KONG, W.; WANG, S. D.; GUO, G. S.; LIU, Y. H. Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel β -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 894-901, 2015.

MAKSIMAINEN, M. M.; LMAPIO, A.; MERTANEN, M.; TURUNEN, O.; ROUVINEN, J., The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 60 (2013) 109–115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.003>

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. A New Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 273-276, 2004.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S. A.; TASSADUQ, R., Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, 7:79 (2017). doi: 10.1007/s13205-017-0645-5

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, 42 (2013) 6223-6235. DOI: 10.1039/c3cs60075k

TALEKAR, S.; JOSHI, A.; JOSHI, G.; KAMAT, P.; HARIPURKAR, R.; KAMBALE, S. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, v. 3, 2013.

ULRICH, L. G.; MAFRA, A. C. O.; TARDIOLI, P. W.; RIBEIRO, M. P. A. Imobilização de beta-galactosidase utilizando a técnica CLEA (cross-linked enzyme aggregates). In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 12., 2017, São Carlos.

VELASCO-LOZANO, S.; LOPEZ-GALLEGO, F.; MATEOS-DIAZ, J. C. FAVELA-TORRES, E., Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, 1 (2015) 166–177. DOI 10.1515/boca-2015-0012