

ISABEL CRISTINA DA ROCHA CÉSAR

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE α -GALACTOSIDASE
EXTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*

Orientador (a): Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas

Co-orientador (a): Solimar Gonçalves Machado

VIÇOSA- MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C421u
2024

César, Isabel Cristina da Rocha, 1992-
Utilização de diferentes técnicas de imobilização e
aplicação biotecnológica de alfa-galactosidase extracelular de
Debaryomyces hansenii UFV-1 / Isabel Cristina da Rocha César.
– Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (114 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.408>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hidrólise. 2. Enzimas imobilizadas.
3. Alfa-galactosidase. 4. Rafinose. 5. Intestinos - Microbiologia.
I. Maitan-Alfenas, Gabriela Píccolo, 1986-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Doutorado em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 660.634

ISABEL CRISTINA DA ROCHA CÉSAR

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE α -GALACTOSIDASE
EXTRACELULAR DE *Debaryomyces hansenii* UFV-1**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 29 de maio de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 ISABEL CRISTINA DA ROCHA CESAR
Data: 24/07/2024 15:36:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

.....
Isabel Cristina da Rocha César

Autora

Documento assinado digitalmente
 GABRIELA PICCOLO MAITAN ALFENAS
Data: 25/07/2024 09:55:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

.....
Gabriela Piccolo Maitan Alfenas

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS porque sem a ação dele na minha vida, nada disso seria possível de acontecer. Somente a ele toda honra e toda glória.

Agradeço à minha mãe e irmã pela motivação, apoio, compreensão e por sempre ter acreditado em mim.

Agradeço ao meu esposo Pedro Paulo pelo companheirismo, cuidado, carinho e paciência em todos os momentos.

Agradeço a todos os colegas do laboratório pelas alegrias do dia a dia e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço às minhas amigas Juliana e Mariana pelos conselhos diários e pelas palavras de incentivo e apoio.

Agradeço aos meus amigos Edirley, Edilaine e Letícia por terem me proporcionado momentos de descontração.

Agradeço a Rafaela Ladeira e Rafaela Venturim por terem compartilhado o conhecimento de vocês comigo.

Agradeço a minha orientadora Gabriela pela disponibilidade e atenção nos momentos de dúvidas dos experimentos, pelos conhecimentos transmitidos, pela compreensão e principalmente pela paciência.

Agradeço à professora Valéria pelo conhecimento compartilhado e pela contribuição na realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram de alguma forma, seja com palavras de apoio ou com conhecimentos compartilhados. Todos vocês moram no meu coração.

RESUMO

CESAR, Isabel Cristina da Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2024. **Utilização de diferentes técnicas de imobilização e aplicação biotecnológica de α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Orientadora: Gabriela Piccolo Maitan Alfenas. Coorientadora: Solimar Gonçalves Machado

Os oligossacarídeos de rafinose (ROs) são carboidratos presentes em leguminosas como soja, lentilha e feijão. A presença de ROs, principalmente estaquiose e rafinose, em sementes de soja pode acarretar em distúrbios gastrointestinais em humanos. Isso ocorre porque, ao alcançar o intestino, os ROs são fermentados pela microbiota, produzindo gases que podem causar cólicas, inchaço, flatulência e diarreia. Os ROs apresentam ligações glicosídicas α -1,6 que não podem ser hidrolisadas devido à ausência da enzima α -galactosidase em humanos e animais. Uma alternativa para a remoção desses fatores antinutricionais é a aplicação da α -galactosidase no processamento da soja. Esta enzima catalisa a hidrólise de ligações α -1,6 de resíduos α -galactosídeos em oligossacarídeos simples como rafinose e estaquiose e em polissacarídeos como galactomananas. As α -galactosidases podem ser produzidas de diversos microrganismos, dentre eles *Debaryomyces hansenii*, levedura encontrada em produtos como queijos e salsichas, e que não apresenta restrição quanto à segurança, para o seu uso no processamento de alimentos. O alto custo para a obtenção da enzima limita a rentabilidade da grande maioria das aplicações. Com isso, a utilização de subprodutos de baixo custo como o soro de leite reduz o custo da enzima e contribui para a economia circular. A utilização de α -galactosidase apresenta diversos gargalos como a desnaturação, inativação, curta vida útil industrial, além da dificuldade de separá-la do meio em que se encontra. Uma alternativa para contornar essa problemática é a imobilização, que consiste em confinar fisicamente a enzima. Com a imobilização, as enzimas tendem a apresentar melhor estabilidade, reutilização e fácil separação do meio reacional, reduzindo assim o custo geral de aplicações industriais. Este estudo teve como objetivo verificar a produção da enzima α -galactosidase por *D. hansenii* UFV-1 utilizando o soro de leite como fonte de carbono. Posteriormente, realizar a imobilização da enzima utilizando diferentes técnicas e, por conseguinte, aplicar a enzima livre e imobilizada em leite de soja para avaliar a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose em leite de soja. No presente estudo foi possível observar que *D. hansenii* UFV-1 foi capaz de produzir a enzima α -galactosidase intra (0,274 U/mL) e extracelular (0,213 U/mL), utilizando somente o soro de leite como fonte de carbono. A enzima α -galactosidase extracelular foi escolhida para a realização das próximas etapas, para economia de tempo e energia. A enzima α -galactosidase extracelular apresentou pH e

temperatura ótimos de 4,0 e 50 °C, respectivamente, além disso, apresentou ser termoestável durante 5 dias nas temperaturas de 50 e 60°C. Ademais, nas temperaturas de armazenamento testadas (25 e 4 °C) a enzima manteve sua atividade durante 5, 15 e 30 dias. Durante o tratamento do leite de soja, utilizando 0,02 U de enzima, foi possível observar os percentuais de hidrólise foram 8,0 e 2,8 e 8,1 e 2,8 % de estaquiose e rafinose, nos tempos 4 e 6 horas, respectivamente. Ao utilizar 0,08 U de enzima, os percentuais de hidrólise de estaquiose e rafinose foram 10,3 e 3,0 e 17 e 11 % nos tempos de 4 e 6 horas, respectivamente. A α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas apresentou pH e temperatura ótimos de 6,0 e 50 °C e de 4,0 e 40 °C, respectivamente. Ambas as enzimas foram mais termoestáveis na temperatura de 50 °C. Em relação às temperaturas de armazenamento, a temperatura de 4 °C foi a que proporcionou maiores atividades enzimáticas e a enzima imobilizada em partículas magnéticas manteve mais de 90 % de sua atividade durante 5, 15 e 30 dias nessa temperatura. A enzima imobilizada em alginato de cálcio foi aplicada para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em leite de soja, devido ao seu baixo custo, não toxicidade e facilidade da técnica de imobilização. Durante 4 e 6 horas, e os percentuais de hidrólise obtidos foram 3,3 e 42 % para estaquiose e 11 e 45 %, para rafinose, respectivamente. Conclui-se que a α -galactosidase livre e imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas apresenta potencial para a hidrólise dos ROs em leite de soja, uma vez que todas as formas da enzima apresentaram pH ótimo na faixa acídica e atividade enzimática em altas temperaturas, fato que é de extrema relevância, uma vez que o pH do leite de soja normalmente está compreendido entre 6,4 e 6,8, e o processamento deste produto ocorre em temperaturas de 50 a 60° C. Além disso, a α -galactosidase livre apresentou-se termoestável durante 5 dias nas temperaturas utilizadas no processamento de soja. Ademais, a α -galactosidase imobilizada, tanto em alginato de cálcio quanto em partículas magnéticas, apresentou termoestabilidade em 50 e 60 °C por até 10 horas, o que é de extrema importância, visto que são nessas temperaturas e tempos que ocorre a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose presentes em leite de soja.

Palavras – chave: α -Galactosidase; Alginato; Partículas magnéticas.

ABSTRACT

CESAR, Isabel Cristina da Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2024. **Use of different immobilization techniques and biotechnological application of extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Adviser: Gabriela Piccolo Maitan Alfenas. Co-adviser: Solimar Gonçalves Machado.

Raffinose oligosaccharides (ROs) are carbohydrates present in legumes such as soybeans, lentils and beans. The presence of ROs, mainly stachyose and raffinose, in soybean seeds can lead to gastrointestinal disorders in humans. This occurs because when they reach the intestine they are fermented by the microbiota, producing gases that can cause cramps, bloating, flatulence and diarrhea. ROs have α -1,6 glycosidic bonds that cannot be hydrolyzed due to the absence of the enzyme α -galactosidase in humans and animals. An alternative for removing these antinutritional factors is the application of α -galactosidase in soybean processing. This enzyme catalyzes the hydrolysis of α -1,6 bonds of α -galactoside residues in simple oligosaccharides such as raffinose and stachyose and in polysaccharides such as galactomannans. α -Galactosidases can be produced from various microorganisms, including *Debaryomyces hansenii*, yeast found in fermented products rich in proteins, such as cheeses and sausages, and which has no restrictions regarding safety for its use in food processing. The high costs of obtaining the enzyme limits the profitability of most applications. Therefore, the use of low-cost byproducts such as whey reduces the costs of the enzyme and contributes to the circular economy. The use of α -galactosidase shows several bottlenecks such as denaturation, inactivation, short industrial useful life, in addition to the difficulty of separating it from the medium in which it is found. An alternative to overcome this problem is immobilization, which consists of physically confining the enzyme. With immobilization, enzymes tend to exhibit better stability, effective reuse, and easy separation from the reaction medium, thus reducing the overall cost of industrial applications. This study aimed to verify the production of the enzyme α -galactosidase by *D. hansenii* UFV-1 using whey as a carbon source. Subsequently, to immobilize the enzyme using different techniques and, therefore, apply the free and immobilized enzyme in soy milk to evaluate the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. In the present study, it was possible to observe that *D. hansenii* UFV-1 could produce the enzyme α -galactosidase intra (0.274 U/mL) and extracellularly (0.213 U/mL), using only whey as a carbon source. Subsequently, the extracellular α -galactosidase enzyme was chosen to carry out the next steps, for time and energy savings. The extracellular α -galactosidase enzyme showed optimal pH and temperature of 4.0 and 50 °C, respectively. Furthermore, the free enzyme was

thermostable for 5 days at temperatures of 50 and 60 °C. At the storage temperatures tested (25 and 4 °C) the enzyme maintained its activity for 5, 15 and 30 days. During the treatment of soy milk, using 0.02 U of enzyme, it was possible to observe hydrolysis percentages of 8.0 and 2.8 and 8.1 and 2.8 % of stachyose and raffinose, at times 4 and 6 hours, respectively. When using 0.08 U of enzyme, the hydrolysis percentages of stachyose and raffinose were 10.3 and 3.0 and 17 and 11 % at times of 4 and 6 hours, respectively. The α -galactosidase immobilized in calcium alginate and magnetic particles showed optimal pH and temperature values of 6.0 and 50 °C and 4.0 and 40 °C, respectively. Both enzymes were more thermostable at a temperature of 50 °C. Regarding storage temperatures, the temperature of 4 °C was the one that provided the greatest enzymatic activities, the enzyme immobilized in magnetic particles maintained more than 90 % of its activity during 5, 15 and 30 days at this temperature. The enzyme immobilized in calcium alginate was applied in soy milk for raffinose oligosaccharides hydrolysis for 4 and 6 hours, due to its low cost, non-toxicity and ease of immobilization technique, and the hydrolysis percentages obtained were 3.3 and 42 % and 11 and 45 % for stachyose and raffinose, respectively. It is concluded that the α -galactosidase in the forms free and immobilized, both in calcium alginate or magnetic particles, has potential in the hydrolysis of ROs in soy milk, since all forms of the enzyme showed optimal enzymatic activity at acidic pH values and high temperatures, which is of extreme relevance, since the pH of soy milk ranges from 6.4 to 6.8 and the processing of this product occurs at temperatures of 50 to 60 °C. Furthermore, the free α -galactosidase was thermostable for 5 days at the temperatures used in soybean processing. Additionally, the α -galactosidase immobilized in calcium alginate and magnetic particles showed thermostability at 50 and 60 °C for 10 hours, which is extremely important, since it is at these temperatures and times that hydrolysis of soy milk raffinose oligosaccharides occurs.

Keywords: α -Galactosidase; Alginate; Magnetic particles.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1: ENABLING APPLICATIONS THROUGH IMMOBILIZATION: HARNESSING THE POTENTIAL OF ALPHA-GALACTOSIDASES	14
ARTICLE: ENABLING APPLICATIONS THROUGH IMMOBILIZATION: HARNESSING THE POTENTIAL OF ALPHA-GALACTOSIDASES.....	15
ABSTRACT	15
INTRODUCTION.....	16
1. Industrial applications of α -galactosidase.....	18
1.1 Food and Feed Industries	18
1.2 Ethanol production	19
1.3 Pharmaceutical Industry	20
2. Immobilization of α -galactosidase	20
2.1 Adsorption	23
2.2 Entrapment and encapsulation	23
2.3 Covalent-binding	24
2.4 Cross-linking	25
2.5 Bioaffinity.....	26
3. PERSPECTIVES.....	26
4. REFERENCES.....	29
CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE POR <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM LEITE DE SOJA.....	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. METODOLOGIA	39
3.1 Preparo do Soro de leite.....	39
3.2 Composição do soro de leite.....	39
3.3 Microrganismo	39
3.4 Manutenção da cultura da levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	40
3.5 Meios de cultura, fontes de carbono e tempos para produção de α -galactosidases por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1.....	40
3.6 Cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	40
3.7 Extração das α -galactosidases	41
3.8 Determinação da atividade enzimática das α - galactosidases de <i>D. hansenii</i>	42

3.9 Determinação da concentração de proteínas nos extratos enzimáticos obtidos de <i>D. hansenii</i> UFV-1.....	42
3.10 Purificação parcial da α -galactosidase extracelular de <i>D. hansenii</i> UFV-1	43
3.11 Determinação do grau de pureza da enzima α -galactosidase extracelular por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
3.12 Coloração do gel de eletroforese	43
3.13 Caracterização enzimática.....	44
3.13.1 Efeito do pH.....	44
3.13.2 Efeito da Temperatura.....	44
3.13.3 Análise de Termoestabilidade	44
3.14 Análise Estatística	45
3.15 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja comercial	45
3.16 Extração de ROs.....	45
3.17 Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Preparo do soro de leite	47
4.2 Composição do soro de leite.....	48
4.3 Atividade de α -galactosidase intracelular e extracelular da cultura de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 em soro de leite e em diferentes meios, fontes de carbono e tempos ..	49
4.4 Purificação da α -galactosidase extracelular produzida pela levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1.....	61
4.5 Caracterização Enzimática.....	64
4.5.1 Efeito do pH.....	64
4.5.2 Efeito da Temperatura	65
4.5.3 Análise de Termoestabilidade	66
4.6 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	69
5. CONCLUSÃO	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CAPÍTULO 3: TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE DE <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 E HIDRÓLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM PRODUTO DE SOJA PELA ENZIMA IMOBILIZADA	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. OBJETIVOS	81
2.1 Objetivo Geral.....	81
2.2 Objetivos Específicos	81
3. METODOLOGIA	82
3.1 Imobilização da α - galactosidase extracelular em alginato de cálcio.....	82

3.1.1 Determinação da atividade enzimática de α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio	82
3.1.2 Efeito das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio na atividade de α -galactosidase	83
3.1.3 Efeito da relação enzima: alginato na atividade de α -galactosidase.....	83
3.1.4 Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase	83
3.1.5 Efeito do número de esferas de alginato de cálcio ensaiadas na atividade de α -galactosidase	84
3.1.6 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase	84
3.2 Imobilização da α -galactosidase extracelular em partículas magnéticas.....	84
3.2.1 Determinação da atividade enzimática de α -galactosidase extracelular imobilizada em partículas magnéticas	85
3.2.2 Efeito da relação enzima: partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase	86
3.2.3 Efeito da relação entre o tempo de contato da enzima com as partículas na atividade de α -galactosidase	86
3.2.4 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase	87
3.3 Caracterização enzimática	87
3.3.1 Efeito do pH.....	87
3.3.2 Efeito da Temperatura	87
3.3.3 Análise de Termoestabilidade	88
3.4 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio	88
3.5 Extração de ROs.....	89
3.6 Determinação do teor de oligossacarídeos de rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	89
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.1. Efeito das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio na atividade de α -galactosidase	90
4.1.1 Efeito da relação enzima: alginato na atividade de α -galactosidase.....	92
4.1.2 Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase	93
4.1.3 Efeito do número de esferas de alginato de cálcio ensaiadas na atividade de α -galactosidase	94
4.1.4 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio	94
4.2 Caracterização enzimática da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio ...	95
4.2.1 Efeito do pH.....	95
4.2.2 Efeito da Temperatura	97

4.2.3 Análise de Termoestabilidade	98
4.3 Efeito da relação enzima: partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase	101
4.3.1 Efeito da relação entre o tempo de contato da enzima com as partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase imobilizada.....	102
4.3.2 Efeito da agitação na determinação da atividade de α - galactosidase imobilizada em partículas magnéticas	103
4.4 Caracterização Enzimática da α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas	103
4.4.1 Efeito do pH.....	103
4.4.2 Efeito da Temperatura	105
4.4.3 Análise de Termoestabilidade	106
4.5 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio	109
5. CONCLUSÃO	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

INTRODUÇÃO

O consumo de produtos à base de soja tem sido reportado por reduzir o risco de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose (PERSKY, et al., 2002; GENOVESE & LAJOLO, 2002; MESSINA, 2000). A soja contém oligossacarídeos de rafinose (ROs) que incluem rafinose, estaquiose e verbascose, que tem sido relatados como prebióticos devido aos seus efeitos positivos na saúde (VASISHTHA & SRIVASTAVA, 2013). No entanto, os ROs são considerados fatores antinutricionais, responsáveis por causar desconforto intestinal. Os oligossacarídeos de rafinose apresentam ligações glicosídicas $\alpha - 1,6$ que não podem ser hidrolisadas devido à ausência da enzima α -galactosidase em humanos e animais (HU, et al., 2017; KATROLIA, et al., 2014); logo, quando esses oligossacarídeos, em particular rafinose e estaquiose, alcançam o intestino, são fermentados pela microbiota, produzindo gases que podem causar cólicas, inchaço, flatulência e diarreia (MARTÍNEZ – VILLALUENGA, et al., 2008; WAGNER, et al., 1976).

Uma alternativa para a remoção desses fatores antinutricionais é a aplicação da enzima α -galactosidase no processamento da soja (HU, et al., 2017; KATROLIA, et al., 2014). A α -galactosidase (EC 3.2.1.22) é uma exoglicosidase que catalisa a hidrólise de resíduos terminais de galactose ligados em $\alpha 1,6$, encontrados em rafinose, estaquiose, melibiose e em polissacarídeos como as galactomananas (BHATIA, et al., 2020). A levedura *D. hansenii* UFV-1 tem sido reportada por produzir quantidades expressivas de α -galactosidases intra e extracelular. Dentre as vantagens dessa levedura é a não-patogenicidade, além de ser encontrada em alimentos como salsichas e queijos, não devendo haver restrição, em relação à segurança, para seu uso no processamento de alimentos (JUNIOR, et al., 2009).

Embora as α -galactosidases apresentem diversas aplicações, principalmente na indústria de alimentos, o alto custo para a obtenção da enzima limita a rentabilidade da grande maioria das aplicações. JUNIOR, et al., 2018; VIANA, et al., 2011 e JÚNIOR, et al., 2009 utilizaram meios de cultura laboratoriais de custos elevados para a indução da produção desta enzima. No intuito de reduzir os custos de obtenção da α -galactosidase e contribuir para a economia circular, o presente estudo utilizou o soro de leite para a indução da produção da enzima de interesse por *D. hansenii* UFV-1, uma vez que, trata-se de um coproduto da indústria de laticínios de baixo custo. Além disso, por ser rico em

lactose, o soro de leite pode ser utilizado como matéria prima abundante e renovável para fermentações microbianas (DOMINGUES, et al., 2010).

A utilização de α -galactosidase apresenta diversos gargalos como a desnaturação, inativação, curta vida útil industrial, além da dificuldade de separá-la do meio em que se encontra. Uma alternativa para contornar essa problemática é a imobilização, que consiste em confinar fisicamente a enzima. Com a imobilização, as enzimas tendem a apresentar melhor estabilidade, reutilização eficaz e fácil separação do meio reacional, reduzindo assim o custo geral de aplicações industriais (KATROLIA, et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi produzir α -galactosidase utilizando o soro de leite como fonte de carbono e em seguida, imobilizá-la utilizando diferentes técnicas de imobilização. Posteriormente, a enzima foi aplicada na hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose presente em leite de soja na sua forma livre e imobilizada.

CAPÍTULO 1

**ENABLING APPLICATIONS THROUGH IMMOBILIZATION: HARNESSING
THE POTENTIAL OF ALPHA-GALACTOSIDASES
(ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO À *CHEMICAL ENGINEERING &
TECHNOLOGY* - IF = 2,1)**

ENABLING APPLICATIONS THROUGH IMMOBILIZATION: HARNESSING THE POTENTIAL OF ALPHA-GALACTOSIDASES

Isabel Cristina da Rocha Cesar¹, João Batista de Souza¹, Luiz Vinícius de Souza Arruda¹, Rafaela Zandonade Ventorim¹, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil

*Corresponding author: gabriela.maitan@ufv.br; <https://orcid.org/0000-0003-2340-0077>; Tel: +553136122424.

ABSTRACT

α -Galactosidases show several biotechnological applications, such as in the food and feed industries, where they are applied to remove the antinutritional factors of soy-derived products as well as to produce the prebiotics galactooligosaccharides, for ethanol production, since the products of raffinose hydrolysis by α -galactosidases can be fermented to ethanol, and in pharmaceutical industry, where they are used as potential therapeutic agents in Fabry disease. However, in order to improve stability and protect activity, as well as reducing operational costs, enzyme immobilization is suggested for α -galactosidases. The main methods of immobilization such as non-covalent adsorption, physical entrapment/encapsulation, covalent binding, cross-linking and bioaffinity are discussed, focusing on the improved properties of the α -galactosidases. Nevertheless, some strategies need to be applied to overcome the challenges concerning industrial applications of immobilized α -galactosidases such as the use of cheaper carriers to immobilize, like agricultural residues and the use of nano-materials, especially magnetic nanoparticles. Moreover, the combination of heterologous expression and enzyme engineering with the immobilization techniques are desired to increase immobilization yields and to perform a more effective and stable carrier-enzyme interaction, allowing longer times of use and more reuse cycles.

Keywords: α -Galactosidase; Biotechnological application; Enzyme immobilization; Food and Feed industries; Ethanol production; Pharmaceutical industry.

INTRODUCTION

The use of enzymes for industrial applications has increased drastically in several sectors such as food, beverages, feed, textiles, pharmaceuticals, leather and cosmetics [1]. The global enzyme market was estimated at US\$ 60.48 billion in 2023 and is expected to grow at a compound annual growth rate (CAGR) of 4.9 % from 2024 to 2030 (<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>). Enzymes have been rapidly replacing chemical catalysis due to their high selectivity and specificity, biocompatibility, biodegradability, economic benefits and ecological alternatives [1-2].

α -Galactosidase (α - D- galactoside galactohydrolase, EC. 3.2.1.22), also known as melibiase, catalyzes the hydrolysis of α -1,6 linkages of galactose residues in complex galactomannans and raffinose oligosaccharides (ROs) such as melibiose, raffinose and stachyose [3]. α -Galactosidases can be found in plants [4] and microorganisms [5-7]. Based on substrate specificity, α -galactosidases were previously classified by into groups I and II, in which, the enzymes from group I hydrolyze oligosaccharides, including melibiose, verbascose, raffinose and stachyose. Enzymes from group II hydrolyze polysaccharide substrates such as galactoglucomannan and galactomannan. Furthermore, based on amino acid sequence similarity, α -galactosidases are classified into six different families of glycoside hydrolases (GHs), named as GH4, GH27, GH36, GH57, GH97 and GH110 [8]. The GH4 and GH 36 families mainly comprise enzymes of prokaryotic origin, with GH36 functioning ideally at neutral or alkaline pH. GH27 are enzymes of eukaryotic and prokaryotic origin, and this type of enzyme is active in the acidic pH range [9]. The GH110 family consists of pH-neutral enzymes and exhibits narrow substrate specificity [9].

α -Galactosidases show several biotechnological applications, such as in the food and feed industries, ethanol production and pharmaceutical industry (Figure 1). However, the cost of the enzyme limits profitability in industrial applications, since when used in its free form it is subject to denaturation and inactivation, shortening its industrial useful life, in addition to the difficulty of separating it from the environment in which it is located [10-11]. In order to improve stability and protect activity, facilitate the process of separating the enzyme from the medium, and increase the number of reuses, thus reducing operational costs, enzyme immobilization is suggested. Immobilization for industrial applications must be viable and therefore several factors must be taken into consideration, such as better catalytic efficiency, stability and useful life of the immobilized enzyme

compared to the free enzyme in addition to suitability for industrial process conditions [11]. The aspects regarding strategies to overcome the challenges concerning industrial applications of α -galactosidases will be discussed in this review.



Figure 1. Industrial applications of α -galactosidases. The food and feed industries include soybean processing to eliminate antinutritional factors and functional food ingredients such as galactooligosaccharides (GOS). In the poultry feed industry, α -galactosidase has been proposed as an alternative to improve the nutritional value of feed. For ethanol production, α -galactosidases increase the availability of fermentable sugars for conversion into ethanol. In the pharmaceutical industry, α -galactosidases are used in the treatment of Fabry disease. The tridimensional structure of the α -galactosidase, shown in the center of the figure, is the model of α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* CBS767 obtained using Phyre2 v2.0 [12], with *Mortierella vinacea* α -galactosidase (PDB ID: 3A5V) used as the template.

1. INDUSTRIAL APPLICATIONS OF α -GALACTOSIDASE

1.1 Food and Feed Industries

Soy-based foods, commonly used as substitutes for milk and red meat [13], have several health benefits, such as reduction of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol [14], prevention of osteoporosis [13], and protective effect against breast cancer [15]. However, these products have low consumer acceptance due to their negative effects, such as abdominal discomfort, diarrhea and flatulence, caused by ROs, mainly stachyose and raffinose [16-17]. In humans and animals, these oligosaccharides cannot be digested in the intestine due to the absence of the enzyme α -galactosidase that catalyzes the hydrolysis of α -1,6 galactosidic bonds found in these oligosaccharides [18]. In this sense, free and immobilized forms of α -galactosidases have been investigated regarding their potential application in the food industry to remove the antinutritional factors of soy-derived products [2, 6, 10-11].

Several studies have investigated α -galactosidase immobilization strategies, as well as evaluating the potential action of the free enzyme. The α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 immobilized on cellulose film was able to hydrolyze the total content of stachyose and raffinose when applied to soy milk [6]. The extracellular α -galactosidase from *Citrullus vulgaris* in its free form and immobilized on Sepabeads EC-EP was also applied to soy milk processing. The free enzyme was able to hydrolyze 100 % of ROs, while the immobilized enzyme achieved 72.74 and 77.53 % hydrolysis of raffinose and stachyose, respectively [2]. The α -galactosidase from tomato immobilized on chitosan and EC-EA sepabeads was applied in a model system for industrial applications and the enzyme immobilized in Sepabeads EC-EA hydrolyzed 42 %, while the chitosan-immobilized enzyme hydrolyzed 55 % of the raffinose content [11]. The free and immobilized forms with calcium alginate and chitosan of a commercial α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* were applied to soy milk and the hydrolysis rate of ROs promoted by the free enzyme was 27.3 % and 30 %; the enzyme immobilized in calcium alginate was 96.2 % and 97.6 %, and the enzyme immobilized in chitosan was 61.8 % and 93.7 %, after 2h and 4h of incubation, respectively [10].

Another ability of α -galactosidases is the production of functional foods such as GOS via transgalactosylation [19]. GOS are non-digestible food ingredients that provide several benefits to human health, mainly increasing probiotic bacteria in the intestine,

such as *Lactobacillus* and Bifidobacteria. Furthermore, the degradation of GOS by the intestinal microbiota provides an improvement in intestinal function, increasing mineral absorption, reducing cancer risks and providing protection against infections caused by pathogenic bacteria [20].

The wide availability of genetic manipulation tools has allowed the search for diverse microbial sources and the development of engineered strains more suitable for the food industry, ensuring food safety. The α -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1 produced maninotriose, α -1,6 galactobiose, α -1,6 galactotriose, verbascotetraose, verbascose, and verbascopentaose from several substrates, including melibiose, raffinose and stachyose [21]. A recombinant α -galactosidase from *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 produced α -1,6 and α -1,4-galactobiosides, in addition to α -1,3-digalactosides using melibiose as substrate [22]. The α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* overexpressed in *Aspergillus sojae* produced several galactooligosaccharides such as galactosyl-sucrose, galactosyl-maltose, galactosyl-lactose, galactosyl-cellobiose, galactosyl-mannose, galactosyl-glucose and galactosyl-galactose, using the substrate pNPGal [7].

Moreover, the application of α -galactosidase has been suggested as a supplement in poultry diets that rely on corn and soybean meal as the main sources of energy. Soybean meal contains RO that are not digestible by birds due to the absence of α -galactosidase [23]. In a study carried out, it was observed that α -galactosidase supplementation, in addition to improving the growth performance of chickens, corrects the negative effect of a low-energy diet from the economic point of view of the diet [23]. In other studies carried out, the enzyme α -galactosidase has been suggested as a digestive aid, since, after administering the enzyme to children who had problems with gas, the symptoms of flatulence and bloating were reduced [24].

1.2 Ethanol production

α -Galactosidases can also be used to produce ethanol. The products of raffinose hydrolysis by α -galactosidase are galactose and sucrose and both sugars can be fermented to ethanol. Álvarez-Cao et al. [3] employed two *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce ethanol from beet molasses. The first strain, a mutant *S. cerevisiae* deficient in invertase, was used to obtain a high yield of α -galactosidase induced by raffinose, glucose and fructose, also present in molasses. In the second stage, the wild *S. cerevisiae*, an

invertase producer, was used to ferment the sucrose and other resulting fermentable sugars into ethanol. In another study, the α -galactosidase from *Rhizomucor miehei* expressed in *Yarrowia lipolytica* was applied to soybean molasses to hydrolyze the RO producing sucrose. The resulting sucrose was used to produce isomaltulose, which was later removed by *Pichia stipitis*, thus resulting in the fermentative production of ethanol [25].

1.3 Pharmaceutical Industry

Fabry disease is an X-linked hereditary lysosomal storage disorder characterized by the accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) due to α -galactosidase deficiency. The α -galactosidase hydrolyses the alpha-galactosyl terminal groups of glycoproteins and glycolipids, such as Gb3, which is a lipid containing a ceramide group linked to two molecules of galactose and one of glucose. The Gb3 accumulation due to α -galactosidase deficiency results in the symptoms of the disease, which include arrhythmia and cardiomyopathy, renal failure and proteinuria, neurological problems, as well as ocular and cerebrovascular problems such as strokes and transient ischemic attacks. Furthermore, anhidrosis and hyperhidrosis may occur, causing intolerance to heat and exercise [26]. The main treatment for Fabry disease is the α -galactosidase replacement [27]. The α -galactosidase from *Nicotiana benthamiana* was produced and showed similarities with human α -galactosidase, such as the ability to hydrolyze globotriaosylceramide, thus being able to be used as a potential therapeutic agent in Fabry disease [4]. Additionally, several α -galactosidase pharmaceutical formulations have been developed for enzyme replacement therapy of Fabry Disease, such as US9193964B2 assigned by Wuxi Biologics Shanghai Co Ltd, US20210269787A1 assigned by Codexis Inc, and JP6492139B2 assigned by Shire Human Genetics Therapies Inc.

2. IMMOBILIZATION OF ALPHA-GALACTOSIDASE

The application of enzymes across various industrial sectors is an established and growing field, since these biomolecules are capable of catalyzing specific reactions without generating byproducts, offer high catalytic efficiency, operate under mild conditions, and align with the demand for green technologies due to their non-toxic and environmentally friendly nature [28]. Nevertheless, employing enzymes in their free form

is not economically feasible from an industrial standpoint due to their low stability and the fact that they are not recoverable at the end of the process. An alternative to overcoming this bottleneck is enzyme immobilization, a process that consists of confinement or anchoring of enzymes in (or on) an inert support, or forming aggregates that will provide stabilization and the possibility of recovery and reuse [29].

The main methods of enzyme immobilization are non-covalent adsorption, physical entrapment/encapsulation, covalent binding, cross-linking and bioaffinity, which will be discussed in the following topics, with emphasis on α -galactosidases (Table 1).

Table 1. Summary of the main immobilization methods of α -galactosidases and achieved features

Immobilization method	Support	Enzyme source	Benefits	Reference
Adsorption	Cellulose film	<i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1	Increase in optimum temperature (65 to 80° C) and 10 reuse cycles, maintaining 80% of initial activity	Junior, 2018
Encapsulation/ entrapment	Magnetic nanoparticles encapsulated with chitosan	<i>Penicillium aculeatum</i>	Higher thermostability	Bangoria, 2023
Encapsulation/ entrapment	Sodium alginate and chitosan microcapsules	<i>Oudemansiella radicata</i>	Higher thermostability and reduction on RFO's hydrolysis time	Genge, 2022
Covalent binding	Sepabeads EC – HA + Glutaraldehyde	Watermelon	18 reuses cycles	Çelem, 2022
Cross- linking		Aladdin Biotechnology Co.	Tolerance to higher pH and temperature values and 12 reuses cycles	Bai, 2023
Bioaffinity	Chitosan functionalized with concavalin A	Tomato	Increase in optimum temperature (40 to 50° C) and decrease in optimum pH value (5,0 to 4,0)	Çalci, 2022
Bioaffinity	Chitosan and Sepabeads EC-EA	Tomato	Higher storage and thermostability and 10 reuses cycles	Demir, 2018

2.1 Adsorption

Adsorption immobilization is a traditional and widely used method that involves binding the enzyme to the surface of an inert support through weak interactions such as hydrogen bonds and van der Waals forces [30]. The carriers that interact with enzymes may be inorganic, such as silica and porous glass, or organic agents. The latter can be divided into two categories: natural, which is the case of chitin, chitosan, alginate, cellulose, collagen, starch or agar; and synthetic, such as polyacrylamide, polystyrene, polypropylene and epoxy or ion-exchange resins. Some criteria need to be considered for this immobilization strategy, such as surface area, pore structure, particle size, and functional groups that will interact with the enzyme itself and reaction media, mainly because weak stabilizing interactions can be disrupted under certain operating conditions, which can be a disadvantage of this method [30].

Immobilization of α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 in a cellulose film was able to increase the enzyme's optimum activity from 60 to 85 °C, maintaining 90 % of its initial activity. The free enzyme did not show activity above 70 °C. The immobilization process was able to expand the temperature range and allowed the re-use of the α -galactosidase for ten cycles, still showing 80 % of its initial activity [6].

2.2 Entrapment and encapsulation

Entrapment and encapsulation methods aim to confine the enzymes in a polymeric matrix or spherical capsules, respectively. In entrapment methods, the enzyme is physically retained in a polymeric matrix and the pores of the matrix must allow the enzyme to be confined inside the gel, while the substrates and products can migrate freely through it. Despite not promoting distortions in the active site of the enzyme, the matrices can result in loss of activity due to changes in temperature or pH or due to the nature of the solvent [31]. Encapsulation follows the same principle as entrapment, with the difference that the enzymes are retained in spherical capsules, named beads, that can be made from different materials [32].

Sodium or calcium alginate are frequently used. Alginate is mixed with the enzyme, forming a homogeneous solution. Then, with the aid of a syringe, the content is added drop by drop in a calcium chloride solution to form the beads [33]. In fact, any

material, organic or inorganic, that can confine the enzymes without major activity loss, allowing the passage of their respective substrates and reaction products can be used to entrap or encapsulate them, such as agar and chitosan [34].

Both entrapment and encapsulation methods are interesting because they protect the immobilized enzyme from the reaction medium and allow the immobilization of enzymes with a low degree of purity. However, they have disadvantages such as challenges in standardizing the pores, desorption of enzymes, and difficulties in mass transfer [35].

Immobilization of the partially purified α -galactosidase from *Penicillium aculeatum* was carried out using magnetic nanoparticles encapsulated with chitosan, aiming to avoid oxidation of the nanoparticles and strong aggregation due to magnetic attraction. After optimizing the method, an immobilization yield of 45 % and an activity yield of 47 % were obtained, in addition to increasing the enzyme's storage time and its thermostability. On the other hand, the immobilized enzyme showed lower ROs hydrolysis rates, which may have been caused by a decrease in the enzyme's affinity for the substrate, mass transfer limitations or steric hindrance [36]. Geng et al. [37] immobilized the α -galactosidase from *Oudemansiella radicata* in sodium alginate and chitosan microcapsules with an immobilization yield of 60.08 % and activity recovery of 72.19 %. In addition to improving thermostability and reuse cycles, the immobilized enzyme eliminated all ROs content from soy milk after 3 hours of operation, while for the free enzyme, the process took 5 hours.

2.3 Covalent-binding

In immobilization by covalent binding, chemical groups of the enzyme are covalently linked to the support through an activating agent, such as glutaraldehyde, which can also act as a spacer arm. When enzymes are covalently bound to a support material establishing several strong bonds between enzyme and support, a highly stable structure is formed, providing rigidity in the protein structure, making it more resistant to changes in operational conditions, and increasing enzyme reusability. On the other hand, this technique is often associated with the loss of enzymatic activity due to distortions that occur in the enzyme structure, especially in the active site [38]. Although this process can still change the structure and cause loss of activity, it shows some advantages when compared to entrapment/encapsulation, since the enzymes are not confined within the

matrix and are on the surface, facilitating substrate-enzyme interaction and product release [35]. Support materials, *e.g.* agarose, silica, porous glass or polyacrylamide, show a vast diversity of composition and structure. Sepabeads, for example, are formed by a rigid methacrylic polymer matrix and can be coated with different groups that are able to bind to amino acid side chains. Some group examples and their respective interactions are epoxy and amino-epoxy (bind to -SH, -NHR, -NH₂ and -OH groups), and ethylamino or hexamethylamino (bind to primary amines -NH₂) [29].

Çelem & Önal [2] covalently immobilized an α -galactosidase from watermelon on Sepabeads EC-HA to remove RO from soymilk. The best enzyme/support ratio was determined as 0.5 mg protein per g of support. Glutaraldehyde 0.01 % (v/v) was used to induce the binding between the enzymes and the support coating group. The immobilization process caused a significant decrease in enzyme activity and the covalent bound enzyme showed 44 % of residual activity, using raffinose as substrate. Despite the activity loss, operation costs could be reduced, since the immobilized enzyme was utilized for 18 cycles.

2.4 Cross-linking

Cross-linking methods are based on the formation of cross-links between enzymes using a cross-linking agent, such as glutaraldehyde. The bonds formed are strong and cannot be broken by variations in temperature and pH [39]. The first process in this method is the use of a precipitating agent, such as ammonium sulfate. Subsequently, a cross-linker compound is added to the pellet. The most utilized agent is glutaraldehyde, a small molecule with two aldehyde groups, one at each end of its carbon chain. The amine groups of the side chains of lysine or hydroxylysine residues react with the aldehyde groups, forming a covalent bond. This process is widely used due to its cost-effectiveness in reagents, and its relatively quick and straightforward execution, requiring less labor. Despite the common loss in activity and the risk of denaturation caused by the crosslinking agent, the number of re-use cycles often overcomes this caveat [39].

Bai et al. [40] immobilized a commercial α -galactosidase from Aladdin Biotechnology Co. by cross-linking in polyvinyl alcohol (PVA), chitosan (CS) and glycidyl-methylacrylate (GMA) gel in a directional freezing-assisted salting-out technique. The tested method increased the enzyme's tolerance to high pH and temperature values and allowed its reuse for 12 consecutive cycles, maintaining 80 % of

its initial activity. Although the immobilized enzyme showed a lower affinity for its substrates, there was reduced inhibition due to the presence of melibiose compared to the free enzyme. Furthermore, the immobilized enzyme was efficient in the degradation of raffinose and stachyose present in soy milk.

2.5 Bioaffinity

Bioaffinity procedures are based on the interaction between a ligand and an enzyme according to their physicochemical characteristics. The choice of the ligand involves factors such as binding specificity, costs and availability. Antibodies and lectins have been widely used in this immobilization method, as they can bind to enzymes selectively, recognizing specific sequences of the protein or its glycosidic group [41].

Bioaffinity-based immobilization of an α -galactosidase from tomato was first reported by Demir & Önal [11]. Under optimized conditions, a yield of 89.5 % and 72 % in enzymatic activity was observed using chitosan and Sepabeads EC-EA supports, respectively. The high yield values compared to other immobilization methods suggest that the interaction between the α -galactosidase and supports occurred selectively. Çalci & Önal [42] evaluated three methods of immobilizing the α -galactosidase from tomato on chitosan functionalized with Concanavalin-A (ConA). When derivatizing chitosan with ConA by adsorption, followed by immobilization of the enzyme on the activated support, a recovery of 64 % of the activity was observed, an optimum temperature of 50 °C and an optimum pH of 4.0, compared to the free enzyme, which showed an optimum temperature of 40 °C and optimum pH of 5.0. The loss of activity may be related to conformational changes in the enzyme structure or its active site, while immobilization based on affinity interactions increased the stability of the enzyme at higher temperatures and more acidic pH values.

3. PERSPECTIVES

Despite the constant growth in the global enzyme market, the inherent production costs remain challenging to a wide scope of applications. Immobilization of α -galactosidases from several sources showed a series of benefits regarding enzyme utilization in the industry. However, the balance between activity loss and recovery/reuse is still a challenge. One possible approach to overcome the production cost is the use of cheaper carriers to immobilize α -galactosidases. Girelli et al. [43] showed the use of agricultural residues such as corn, rice and coconut wastes to immobilize a series of enzymes, such as lipases, laccases, α -amylases and β -galactosidases. There is a giant variety of available agricultural wastes that can be tested as possible low-cost carriers for α -galactosidase immobilization.

In parallel, nano-materials, especially magnetic nanoparticles, are significantly getting more highlights as immobilization carriers, due to their ease of recovery and interactions with a great number of chemical groups. Zahirinejad et al. [44] compiled various applications of chitin, cellulose and chitosan-coated magnetic nanoparticles for immobilizing a diverse range of enzymes through adsorption, entrapment, covalent binding and cross-linking methods and they demonstrated improvements in optimum temperature and pH values. Despite the advantages, coated magnetic nanoparticles are not as cost-effective and straightforward to manufacture as conventional carriers. Evaluation and optimization are required for each enzyme of interest. Nevertheless, they show great potential for optimization and effective application in the industry.

A more assertive approach is the combination of heterologous expression and enzyme engineering with the immobilization techniques, to increase immobilization yields and/or to make the carrier-enzyme interaction more effective and stable, allowing longer times of use and/or more reuse cycles. While both approaches share the goal of increasing enzymatic performance in biotechnological applications, combining the two methodologies remains a challenge. Vahdi et al. [45] showcased the feasibility of genetically incorporating a 6X-Histidine tag into the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. The recombinant enzyme was subsequently immobilized on nickel-nitrilotriacetic acid magnetic nanoparticles, resulting in an efficient biocatalyst for biodiesel production, showing the possibility of integrating genetic engineering and enzyme immobilization to produce a robust biocatalyst. Despite being an innovative and interesting approach, there is no data in the literature showing the integration of these two

techniques for improved α -galactosidase production. Enzyme engineering strategies, such as directed evolution, DNA shuffling, and site-directed mutagenesis, are used to change several properties: specificity, stability and/or tolerance to higher temperatures and a wider range of pH values. Wang et al. [46] have successfully cloned and expressed a thermostable α -galactosidase from *Parageobacillus thermoglucosidasius* in *E. coli* BL21, which is a relatively simple and less expensive expression system. Engineering of α -galactosidases is still a worthy field of study, due to their range of applications in the ethanol, food and pharmaceutical industries.

4. REFERENCES

- ÁLVAREZ-CAO, M. E.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M. E.; BECERRA, M. **Bioconversion of beet molasses to alpha-galactosidase and ethanol.** *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 405, 2019.
- AMER, S. A.; NASER, M. A. F.; WARETH-ABDEL, A. A. A.; SALEH, A. A.; SHAFIKA, A. M. E.; FATTAH, D. M. A.; METWALLY, A. E. **Effect of dietary supplementation of alpha-galactosidase on the growth performance, ileal digestibility, intestinal morphology, and biochemical parameters in broiler chickens.** *BMC Veterinary Research*, v. 16, p. 1-13, 2020.
- BAI, X.; SUN, X.; YU, Y.; GUO, Y.; NIAN, L.; CAO, C.; CHENG, S. **Immobilization of α -galactosidase in polyvinyl alcohol-chitosan-glycidyl methacrylate hydrogels based on directional freezing-assisted salting-out strategy for hydrolysis of RFOs.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 242, p. 124808, 2023.
- BAKUNINA, I. Y.; BALABANOVA, L. A.; PENNACHIO, A.; TRINCONE, A. **Hooked on α -D-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 36, n. 2, p. 233-245, 2016.
- BAKUNINA, I.; SLEPCHENKO, L.; ANASTYUK, S.; ISAKOV, V.; LIKHATSKAYA, G.; KIM, N.; TEKUTYEVA, L.; SON, O.; BALABANOVA, L. **Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant α -galactosidase from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* KMM 701 and its C494N and D451A mutants.** *Marine Drugs*, v. 16, n. 10, p. 349, 2018.
- BANGORIA, P.; CHAKI, S.; SHAH, A. R. **Immobilization of fungal α -galactosidase on magnetic nanoparticles and hydrolysis of raffinose family oligosaccharides (RFO) in soymilk.** *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 42, n. 3, p. 388-400, 2024.
- BHATIA, S.; SINGH, A.; BATRA, N.; SINGH, J. **Microbial production and biotechnological applications of α -galactosidase.** *International journal of biological macromolecules*, v. 150, p. 1294-1313, 2020.

ÇALCI, E.; ÖNAL, S. **Comparative affinity immobilization of α -galactosidase on chitosan functionalized with Concanavalin A and its useability for the hydrolysis of raffinose.** *Reactive and Functional Polymers*, v. 172, p. 105181, 2022.

ÇELEM, E. B.; ÖNAL, S. **Removal of raffinose family oligosaccharides from soymilk by α -galactosidase immobilized on sepabeads EC-EA and sepabeads EC-HA.** *ACS Food Science & Technology*, v. 2, n. 8, p. 1266-1275, 2022.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. **Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks.** *Catalysts*, v. 8, n. 6, p. 238, 2018.

DELGADO-FERNANDEZ, P.; PLAZA-VINUESA, L.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; LAS RIVAS, B.; CORZO, N.; MUÑOZ, R.; MORENO, F. J. **Unravelling the carbohydrate specificity of MelA from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: An α -galactosidase displaying regioselective transgalactosylation.** *International journal of biological macromolecules*, v. 153, p. 1070-1079, 2020.

DEMIR, T.; ÖNAL, S. **Bioaffinity immobilization and characterization of α -galactosidase on aminophenylboronicacid derivatized chitosan and Sepabeads EC-EA.** *LWT*, v. 90, p. 547-555, 2018.

DI NARDO, G.; OLIVA, S.; FERRARI, F.; MALLARDO, S.; BARBARA, G.; CREMON, C.; ALOI, M.; CUCCHIARA, S. **Efficacy and tolerability of α -galactosidase in treating gas-related symptoms in children: a randomized, double-blind, placebo controlled trial.** *BMC gastroenterology*, v. 13, p. 1-7, 2013.

DUAN, F.; SUN, T.; ZHANG, J.; WANG, K.; WEN, Y.; LU, L. **Recent innovations in immobilization of β -galactosidases for industrial and therapeutic applications.** *Biotechnology Advances*, v. 61, p. 108053, 2022.

GENG, X.; LEI, J.; BAU, T.; GUO, D.; CHANG, M.; FENG, C.; XU, L.; CHENG, Y.; ZUO, N.; MENG, J. **Purification, Characterization, and Immobilization of a Novel Protease-Resistant α -Galactosidase from *Oudemansiella radicata* and Its Application in Degradation of Raffinose Family Oligosaccharides from Soymilk.** *Foods*, v. 11, n. 19, p. 3091, 2022.

GERMAIN, D. P. **Fabry disease.** *Orphanet journal of rare diseases*, v. 5, p. 1-49, 2010.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. **Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review.** Chemosphere, v. 244, p. 125368, 2020.

GÜRKÖK, S.; ÖGEL, Z. **Transgalactosylation for galactooligosaccharide synthesis using purified and characterized recombinant α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 overexpressed in *Aspergillus sojae*.** Food and Health, v. 5, n. 1, p. 64-76, 2019.

HU, Y.; TIAN, G.; ZHAO, L.; WANG, H.; NG, T. B. **A protease-resistant α -galactosidase from *Pleurotus djamor* with broad pH stability and good hydrolytic activity toward raffinose family oligosaccharides.** International journal of biological macromolecules, v. 94, p. 122-130, 2017.

JENKINS, D. J. A.; MIRRAHIMI, A.; SRICHAIKUL, K.; BERRYMAN, C. E.; WANG, L.; CARLETON, A.; ABDULNOUR, S.; SIEVENPIPER, J. L.; KENDALL, C. W. C.; KRIS-ETHERTON, P. M. **Soy protein reduces serum cholesterol by both intrinsic and food displacement mechanisms.** The Journal of nutrition, v. 140, n. 12, p. 2302S-2311S, 2010.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. **Enzyme immobilization by adsorption: a review.** Adsorption, v. 20, p. 801-821, 2014.

JÚNIOR, J.C.B.; VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; SOARES, N.F.F.; GUIMARÃES, V. M. **Immobilization of an alpha-galactosidase from *Debaryomyces hansenni* UFV-1 in cellulose film and its application in oligosaccharides hydrolysis.** Food and Bioproducts Processing, v. 111, p. 30-36, 2018.

KAREEM, Z. G. A.; AL-ZAMILY, O. M. Y.; AL-KHAFAJI, N. S. K. **Purification and characterization of α -galactosidase isolated from *Klebsiella pneumoniae* in the human oral cavity.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 261, p. 129550, 2024.

KATROLIA, P.; LIU, X.; LI, J.; KOPPARAPU, N. K. **Enhanced elimination of non-digestible oligosaccharides from soy milk by immobilized α -galactosidase: A comparative analysis.** Journal of food biochemistry, v. 43, n. 11, p. e13005, 2019.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** Nature protocols, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015.

KYTIDOU, K.; BEEKWILDER, J.; ARTOLA, M.; BOSCH, D.; PANNU, N.; JOHANNES, M. F. G. ***Nicotiana benthamiana* α -galactosidase A1. 1 can functionally complement human α -galactosidase A deficiency associated with Fabry disease.** Journal of Biological Chemistry, v. 293, n. 26, p. 10042-10058, 2018.

LIU, Q. P.; YUAN, H.; BENNET, E. P.; HENRISSAT, B.; SULZENBACHER, G.; CLAUSEN, H. **Identification of a GH110 subfamily of α 1, 3-galactosidases: novel enzymes for removal of the α 3Gal xenotransplantation antigen.** Journal of Biological Chemistry, v. 283, n. 13, p. 8545-8554, 2008.

MAGHRABY, Y. R.; EL-SHABASY, R. M.; IBRAHIM, A. H.; AZZAZY, H. M. E. S. **Enzyme immobilization technologies and industrial applications.** ACS omega, v. 8, n. 6, p. 5184-5196, 2023.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. **Alpha-galactosides: antinutritional factors or functional ingredients?** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 48, n. 4, p. 301-316, 2008.

MAY, O. **Industrial enzyme applications—overview and historic perspective.** Industrial enzyme applications, p. 1-24, 2019.

MODREGO, A.; AMARANTO, M.; GODINO, A.; MENDOZA, R.; BARRA, J. L.; CORCHERO, J. L. **Human α -galactosidase a mutants: Priceless tools to develop novel therapies for fabry disease.** International journal of molecular sciences, v. 22, n. 12, p. 6518, 2021.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes.** Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

NGUYEN, H.H.; KIM, M. **An overview of techniques in enzyme immobilization.** Applied Science and Convergence Technology, v. 26, n. 6, p. 157-163, 2017.

QAMAR, S. A.; ASGHER, M.; BILAL, M. **Immobilization of alkaline protease from *Bacillus brevis* using Ca-alginate entrapment strategy for improved catalytic stability, silver recovery, and dehairing potentialities.** Catalysis letters, v. 150, p. 3572-3583, 2020.

QIN, L. Q.; XU, J. Y.; WANG, P. Y.; HOSHI, K. **Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies.** Journal of nutritional science and vitaminology, v. 52, n. 6, p. 428-436, 2006.

REIS, C. L. B.; SOUSA, E. Y. A.; SERPA, J. F.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. C. S. **Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities.** Química Nova, v. 42, p. 768-783, 2019.

RIZZO, G.; BARONI, L. **Soy, soy foods and their role in vegetarian diets.** Nutrients, v. 10, n. 1, p. 43, 2018.

SANGWAN, V.; TOMAR, S. K.; SINGH, R. R. B.; SINGH, A. K.; ALI, B. **Galactooligosaccharides: novel components of designer foods.** Journal of food science, v. 76, n. 4, p. R103-R111, 2011.

SINGH, V.; SARDAR, M.; GUPTA, M. N. **Immobilization of enzymes by bioaffinity layering.** Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, p. 129-137, 2013.

SMITH, S.; GOODGE, K.; DELANEY, M.; STRUZYK, A.; TANSEY, N.; FREY, M. **A comprehensive review of the covalent immobilization of biomolecules onto electrospun nanofibers.** Nanomaterials, v. 10, n. 11, p. 2142, 2020.

VAHIDI, A. K.; YANG, Y.; NGO, T. P. N.; LI, Z. **Simple and efficient immobilization of extracellular his-tagged enzyme directly from cell culture supernatant as active and recyclable nanobiocatalyst: high-performance production of biodiesel from waste grease.** Acs Catalysis, v. 5, n. 6, p. 3157-3161, 2015.

WAGNER, J. R.; BECKER, R.; GUMBMANN, M. R.; OLSON, A. C. **Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue.** The Journal of Nutrition, v. 106, n. 4, p. 466-470, 1976.

WANG, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIU, S.; LIU, X. Y.; YU, X. J. **Whole conversion of soybean molasses into isomaltulose and ethanol by combining enzymatic hydrolysis and successive selective fermentations.** Biomolecules, v. 9, n. 8, p. 353, 2019.

WANG, Y.; WANG, C.; CHEN, Y.; CUI, M. Y.; WANG, Q.; GUO, P. **Heterologous expression of a thermostable α -galactosidase from *parageobacillus thermoglucosidasius* isolated from the lignocellulolytic microbial consortium TMC7.**

Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 32, n. 6, p. 749, 2022.

YAMAGUCHI, H.; KIYOTA, Y.; MIYAZAKI, M. **Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions.** Catalysts, v. 8, n. 5, p. 174, 2018.

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. **Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 204, p. 111774, 2021.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE POR *DEBARYOMYCES HANSENII* UFV-1 E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM LEITE DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glicine max*) e os seus alimentos derivados, devido ao seu padrão de aminoácidos equilibrado e ao seu rico perfil proteico, têm sido utilizados como substituintes de carne e leite, sendo neste último caso principalmente consumidos pela população que apresenta intolerância à lactose (RIZZO & BARONI, 2018). Além disso, o consumo de produtos à base de soja tem sido reportado por reduzir o risco de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose (PERSKY, et al., 2002; GENOVESE & LAJOLO, 2002; MESSINA, 2000). Leguminosas como a soja contêm compostos não digeríveis, conhecidos como oligossacarídeos de rafinose (ROS) que incluem rafinose, estaquiose e verbascose, que tem sido relatados como prebióticos devido aos seus efeitos positivos na saúde (VASISHTHA & SRIVASTAVA, 2013). Em contrapartida, os ROS são considerados fatores antinutricionais, que são responsáveis por causar desconforto intestinal. Os oligossacarídeos de rafinose apresentam ligações glicosídicas $\alpha - 1,6$ que não podem ser hidrolisadas devido à ausência da enzima α -galactosidase em humanos e animais (HU, et al., 2017; KATROLIA, et al., 2014); logo, quando esses oligossacarídeos, em particular rafinose e estaquiose, alcançam o intestino, são fermentados pela microbiota, produzindo gases que podem causar cólicas, inchaço, flatulência e diarreia (MARTÍNEZ – VILLALUENGA, et al., 2008; WAGNER, et al., 1976).

Uma alternativa para a remoção desses fatores antinutricionais é a aplicação da enzima α -galactosidase no processamento da soja (HU, et al., 2017; KATROLIA, et al., 2014). A α -galactosidase (EC 3.2.1.22) é uma exoglicosidase que catalisa a hidrólise de resíduos terminais de galactose ligados em $\alpha 1,6$, encontrados em rafinose, estaquiose, melibiose e em polissacarídeos como as galactomananas. As α -galactosidases são consideradas atraentes ferramentas biocatalíticas para utilização em bioprocessos em diversos setores industriais como na medicina humana, no tratamento da doença de Fabry, no setor alimentício, na síntese de prebióticos, em ração animal, dentre outras aplicações (BHATIA, et al., 2020). As α -galactosidases podem ser encontradas em vegetais (CELEM & ÖNAL, 2022; JOSEPH, et al., 2021) e microrganismos (FEI, et al., 2020; GURKÖK & ÖGEL, 2019; JÚNIOR, et al., 2018), sendo as leveduras muito utilizadas para sua produção, por apresentarem ciclos fermentativos curtos, além de produzirem altas concentrações da enzima através da utilização de meios de cultivo de baixo custo (TABORDA, et al., 2016). Ademais, as leveduras produzem α -galactosidases com maior

potencialidade à aplicação biotecnológica, principalmente por apresentarem estabilidade térmica e pH ótimo ácido, além de serem produzidas extracelularmente.

Estudos demonstram que a levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 produz a enzima α -galactosidase intra e extracelularmente (VIANA, et al., 2011; VIANA, et al., 2009). Além disso, trata-se de uma espécie encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas, como os queijos, no qual contribui para o desenvolvimento do sabor, não devendo haver restrição quanto à segurança para o seu uso no processamento de alimentos (VIANA, et al., 2009). *D. hansenii* é reconhecida pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), como um microrganismo que apresenta status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) (JEONG, et al., 2022). Os microrganismos que apresentam status QPS podem ser utilizados na sua forma viva, chegando até o consumidor, ou podem ser utilizados como organismos de produção ou biomassa morta e, neste caso, não devem ser encontradas células viáveis no produto final (BOURDICHON, et al., 2019).

Embora as α -galactosidases apresentem diversas aplicações, principalmente na indústria de alimentos, vale ressaltar que o alto custo para a obtenção da enzima limita a rentabilidade da grande maioria das aplicações. Com isso, a utilização de subprodutos de baixo custo como o soro de leite reduz o custo da enzima e contribui para a economia circular (ÁLVAREZ-CAO, et al., 2019). Além disso, por ser rico em lactose, o soro de leite pode ser utilizado como matéria prima abundante e renovável para fermentações microbianas (DOMINGUES, et al., 2010).

É de extrema importância a aplicação da α -galactosidase na indústria de alimentos, visto que sua utilização no processamento da soja é uma alternativa que pode reduzir o desconforto intestinal associado ao consumo destes alimentos, auxiliando, deste modo, no aprimoramento da saúde e na qualidade de vida do consumidor. Ademais, utilizar o soro de leite para induzir a produção da enzima α -galactosidase é um fato de extrema relevância, visto que se trata de um subproduto potencialmente poluente constantemente produzido pela indústria de laticínios (KUSHWAHA, et al., 2011). Neste contexto, verificou-se a produção da enzima α -galactosidase por *D. hansenii* UFV-1 utilizando o soro de leite como fonte de carbono. Posteriormente, objetivou-se aplicar a enzima livre em produtos de soja para avaliar a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar e comparar a produção da enzima α -galactosidase extracelular pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1, utilizando o soro de leite e diferentes meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono, caracterizar bioquimicamente a enzima obtida e aplicá-la em produtos de soja para hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose.

2.2 Objetivos Específicos

- Induzir a produção de α -galactosidase pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 utilizando o soro de leite como fonte de carbono;
- Realizar a purificação parcial da enzima;
- Realizar a caracterização bioquímica da enzima livre, avaliando o efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima;
- Aplicar e comparar as propriedades da α -galactosidase livre em produtos de soja;
- Determinar o teor de oligossacarídeos de rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. METODOLOGIA

3.1 Preparo do Soro de leite

O soro de leite proveniente do queijo muçarela foi fornecido pela indústria Laticínios Viçosa, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, e posteriormente transportado em frasco de vidro estéril ao laboratório. Em seguida, para ser utilizado para a indução da produção da α -galactosidase por *Debaryomyces hansenii* UFV-1, o soro de leite foi submetido a três condições de preparo distintas, para verificação do melhor método de preparo de soro de leite para indução da produção enzimática. Na primeira condição, o soro de leite foi filtrado em bomba à vácuo utilizando membrana de 0,45 μm e posteriormente em filtro estéril com membrana de 0,22 μm . Na segunda condição, o soro de leite foi filtrado em bomba à vácuo utilizando membrana de 0,45 μm e posteriormente autoclavado a 121 °C por 30 minutos. E na terceira condição, o soro de leite foi somente autoclavado a 121 °C por 30 minutos.

3.2 Composição do soro de leite

Para investigar o teor de lactose no soro de leite, as amostras foram aplicadas, em triplicata, em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando a coluna Biorad HPX-87 com fluxo de 0,6 mL/min em uma temperatura de 80 °C. Foram aplicados 20 μL da amostra e água MilliQ utilizada como fase móvel. A solução padrão de lactose foi preparada nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 g/L. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para a obtenção da curva padrão, correlacionando a área do pico com a concentração de lactose na solução. As retas foram obtidas por regressão linear.

O pH do soro de leite foi determinado utilizando o pHmetro de bancada Analyser modelo 350 M.

3.3 Microrganismo

O microrganismo utilizado para avaliar a produção da enzima α -galactosidase foi a levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 (VIANA, 2005), pertencente à coleção de leveduras do Laboratório de Análises Bioquímicas, da Universidade Federal de

Viçosa. A levedura foi isolada do ambiente de laticínios da região da Zona da Mata, Minas Gerais.

3.4 Manutenção da cultura da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1

D. hansenii UFV-1 foi mantida em glicerol e meio YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % de glicose e 2 % de peptona) a - 80 °C. A levedura foi ativada em meio YPD sólido (1,5 % de ágar) e mantida em câmara de incubação por 36 horas a 30 °C. As placas foram mantidas a 4 °C e o estoque foi continuamente repicado (VIANA, et al., 2009).

3.5 Meios de cultura, fontes de carbono e tempos para produção de α -galactosidases por *Debaryomyces hansenii* UFV-1

Além do soro de leite, os meios de cultura utilizados para o crescimento da levedura *D. hansenii* foram:

- Meio YP (1 % (p/v) de extrato de levedura, 2 % (p/v) de peptona) + 0,5 % lactose;
- Meio YP (1 % (p/v) de extrato de levedura, 2 % (p/v) de peptona) + 1 % galactose;
- Meio YP (1 % (p/v) de extrato de levedura, 2 % (p/v) de peptona) + 0,5 % galactose;
- Meio mineral (MM: 0,062 g KH_2PO_4 , 0,2 g K_2HPO_4 , 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 1 % galactose.

Os tempos de incubação testados para a produção das α -galactosidases pelo microrganismo foram 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas (VIANA, et al., 2009).

3.6 Cultivo de *Debaryomyces hansenii* UFV-1

A levedura *D. hansenii* mantida em placas a 4° C foi ativada em YPD líquido, em Erlenmeyers de 125 mL, sendo incubada a 200 rpm, por 12 -15h, a 30°C. Após este período, o meio foi centrifugado a 4000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células de *D. hansenii* foram inoculadas em frascos contendo soro de leite e os meios de cultura contendo as diferentes fontes de carbono, na concentração inicial de 0,15 mg de células/mL, sendo que estes frascos foram incubados nas mesmas condições descritas

acima. Nos tempos 4, 8, 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, os Erlenmeyers correspondentes foram retirados do shaker e os meios de cultivo centrifugados a 10.000 g por 40 minutos, à 4° C. O sobrenadante e as células obtidas foram congelados para posterior análise de determinação da atividade enzimática.

3.7 Extração das α -galactosidases

Como fonte das enzimas extracelulares, foi usado o sobrenadante das culturas descritas anteriormente. As células foram rompidas de acordo com a metodologia descrita por VIANA (2009), seguido do procedimento de sonicação (10 minutos). A solução de lise foi preparada com tampão acetato de sódio 0,1 M e Triton x-100 0,25 % (p/v). O extrato centrifugado foi utilizado como fonte de α -galactosidase intracelular (Figura 1).

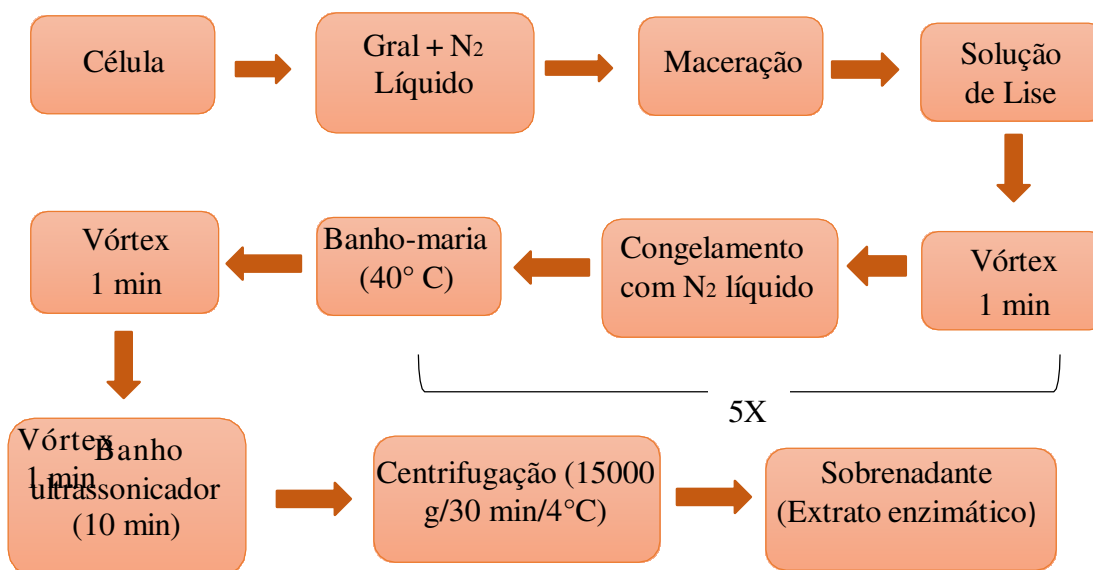


Figura 1 – Sequências das etapas de extração da α -galactosidase intracelular de *Debaryomyces hansenii*.

3.8 Determinação da atividade enzimática das α -galactosidases de *D. hansenii* UFV-1

Para a realização do ensaio de atividade da enzima α -galactosidase intracelular e extracelular foi utilizado o substrato sintético pNP α Gal (4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo). As misturas das reações continham 50 μ L de extrato enzimático, 200 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 250 μ L da solução pNP α Gal 2 mM (diluído em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0). A reação foi realizada a 40 °C por 10 minutos e foi interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ 0,5 M. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan GO, Serial 1510-00918C, utilizando um comprimento de onda de 410 nm. A curva padrão foi construída com a solução de p- nitrofenolato em diferentes concentrações. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de pNP, por minuto, nas condições de ensaio.

3.9 Determinação da concentração de proteínas nos extratos enzimáticos obtidos de *D. hansenii* UFV-1

A determinação da concentração de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford foi preparado 5 vezes concentrado utilizando as seguintes soluções: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85 % (v/v), 50 mL de etanol 95 % (v/v) e, após completa solubilização, o volume foi completado com água destilada para 200 mL, sendo essa solução posteriormente agitada por 30 min e filtrada em papel de filtro Whatman n°1.

Para determinação da quantidade de proteínas em cada amostra analisada, o ensaio foi realizado utilizando de 1 a 800 μ L de extrato enzimático intra e extracelular, 798 μ L a 0 μ L de água destilada e 200 μ L de reagente de Bradford 5x. Os componentes ficaram em contato por 15 min ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 595 nm e os valores foram aplicados na curva padrão previamente realizada variando-se os volumes em 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 μ L de albumina bovina sérica (BSA) na concentração de 0,2 mg/mL.

3.10 Purificação parcial da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1

O sobrenadante obtido do soro de leite contendo α -galactosidase extracelular foi parcialmente purificado utilizando a cromatografia de troca iônica, em uma coluna de DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado pelo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e o mesmo tampão contendo 1 M de NaCl. Todo o procedimento foi conduzido com fluxo de 4,0 mL/min. Frações de 2,5 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade de α -galactosidase foram reunidas (JÚNIOR, et al., 2018).

3.11 Determinação do grau de pureza da enzima α -galactosidase extracelular por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) contendo SDS e β - mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N, N- metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1, 5 M, pH 8,8 para o gel separador e tampão Tris/HCl 1M, pH 6,8 para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e N, N, N, N-tetrametil- etilenodiamino de sódio (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas em temperatura ambiente, a 80 V. As amostras submetidas à eletroforese foram, anteriormente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 %, lavadas com acetona refrigerada e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 5 vezes concentrado, fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

O marcador de massa molecular utilizado foi o Precision Plus Protein Standards (BIO RAD), uma mistura de 10 proteínas, com suas massas moleculares pré-definidas.

3.12 Coloração do gel de eletroforese

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum, et al. (1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético e água destilada, na proporção de 50:12: 38 em volume) por 2 horas; posteriormente foram realizadas três lavagens de 10 minutos com solução de etanol de 95 % (p/v). Os géis foram lavados por 1 minuto com solução de tiosulfato de sódio 0,02 % p/v. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada por três vezes durante 20 segundos. Depois, os géis foram incubados em solução nitrato de prata (0,2 g de nitrato de prata, 0,037 mL de formaldeído 37 % e 100 mL de água destilada) durante 20 minutos. Os géis foram lavados 3 vezes com água destilada por 20 segundos e em seguida, foram aplicados sobre a solução reveladora (2 gramas de carbonato de sódio, 1 mL da solução de tiosulfato de sódio 0,02 %, 0,025 mL de formaldeído 37 % e completar com 50 mL de água destilada) até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido acético.

3.13 Caracterização enzimática

3.13.1 Efeito do pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade da α - galactosidase livre, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.8, exceto que o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH utilizando-se tampões McIlvaine (McIlvaine, 1921), na faixa de 2,2 a 8,0.

3.13.2 Efeito da Temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase livre, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.8, exceto que o ensaio foi realizado em várias temperaturas compreendidas entre 30 e 80 °C.

3.13.3 Análise de Termoestabilidade

A estabilidade térmica da α -galactosidase livre foi testada em duas temperaturas. Alíquotas (0 -100 μ L) da enzima purificada foram pré-incubadas em solução tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 nas temperaturas de 50 e 60 °C por 0, 24, 48, 72, 96 e

120 horas. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para atividade foram conduzidos como descrito no item 3.8.

Também foi determinada a estabilidade da enzima livre durante 5, 15 e 30 dias à temperatura ambiente (25° C) e na temperatura de 4° C. As atividades da enzima foram determinadas conforme descrito no item 3.8.

3.14 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab, versão 19.

3.15 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja comercial

Para o teste de hidrólise de ROs em leite de soja comercial, alíquotas de 5 mL do leite de soja ADES, obtido do mercado local, foram transferidas para Erlenmeyers de 25 mL. Foram testadas duas concentrações da enzima α -galactosidase extracelular purificada: 0,02 U, correspondente à 100 μ L de extrato, e 0,08 U, correspondente à 400 μ L de extrato, ambos em triplicata. Como controle, volumes correspondentes de 100 e 400 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 foram adicionados ao leite de soja, em substituição à enzima purificada. Posteriormente, os tratamentos foram incubados em shaker a 100 rpm, por 4 e 6 h, a 50 °C. As amostras foram centrifugadas a 25900 g, por 30 minutos, a 4 °C, descartando-se o precipitado, e o leite foi usado para determinação da porcentagem de hidrólise dos RO.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos ROs presentes no leite de soja, essas preparações foram liofilizadas e os ROs extraídos de 20 mg do pó obtido. Os teores de ROs determinados nos extratos tratados com as enzimas foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.16 Extração de ROs

A extração de ROs no leite de soja após o tratamento enzimático foi conduzida como descrito por Saravitz et al (1987) com modificações. Também foi realizada a extração dos ROs em leite de soja não tratado, para controle. Foram pesadas 20 mg das

amostras liofilizadas em tubos tipo eppendorf para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo presente nas amostras foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter petróleo a 42 °C, por 5 minutos. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 minutos. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga Eppendorf modelo 5415 D, 14.000 g, por 20 minutos. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C e após 24 horas, os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, durante 20 minutos, e filtradas em membranas de 0,45 µm de diâmetro e armazenadas a - 20° C, para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.17 Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os ROs extraídos do leite de soja tratados e não tratados enzimaticamente foram analisados por HPLC em cromatógrafo Shimadzu série 20 A (Kyoto, Japão), equipado com detector de índice de refração RID-20A (Shimadzu, Kyoto, Japão), uma coluna GIST NH2 (Shimadzu, Kyoto, Japão) de aço inox (4,6 x 250 mm) contendo a fase estacionária o grupo aminopropil (-NH₂). A mistura acetonitrila-água (75:25) em condições isocráticas constituiu a fase móvel. As análises foram realizadas a 35 °C sob o fluxo de 1 mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. As soluções padrões glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose e estaquiose foram preparadas nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para a obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenções e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de HPLC, equipado com o programa LC Solutions versão 7 para Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo do soro de leite

Após o preparo do soro de leite em três condições distintas e, posterior cultivo de *D. hansenii* UFV-1 para a produção de α -galactosidase, foi determinado a atividade enzimática e o teor de proteínas de cada condição, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 – Determinação da atividade enzimática (U/mL) e proteínas (mg) do sobrenadante contendo α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1.

Condição	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)
Soro de leite filtrado	0,500	2,050	0,24
Soro de leite filtrado e autoclavado	0,553	0,486	1,14
Soro de leite autoclavado	0,549	0,845	0,65

Foi possível observar que a atividade enzimática de α -galactosidase manteve entre 0,5 U/mL, diferindo na concentração de proteínas nas diferentes condições testadas. A condição de preparo do soro de leite que proporcionou maior concentração de proteínas em relação as outras foi a que o soro de leite foi submetido apenas a filtração, isso provavelmente pode ser explicado devido ao fato do soro de leite não ter sido submetido ao processo de autoclavagem, ou seja, as proteínas presentes no soro não sofreram desnaturação. Em contraste, a condição em que o soro de leite apresentou menor quantidade de proteínas foi quando o mesmo foi submetido a filtração e autoclavagem, provavelmente algumas proteínas ficaram retidas nas membranas, e outras sofreram desnaturação durante o processo de autoclavagem, respectivamente. As proteínas presentes no soro de leite, provavelmente sofreram desnaturação pelo efeito da temperatura nas ligações não covalentes envolvidas na solubilização da estrutura

secundária e terciária. Quando essas estruturas na proteína são desdobradas, os grupos hidrofóbicos interagem e reduzem a ligação de água. As interações hidrofóbicas levam à agregação, seguida de coagulação e precipitação (ENGLARD & SEIFTER, 1990).

Embora a melhor atividade específica foi encontrada na condição em que o soro de leite foi filtrado e posteriormente autoclavado, vale ressaltar, que a eliminação de um processo de esterilização do soro de leite é um ganho de tempo e economia, visto que, a filtração requer a manipulação do operador constantemente, aumentando os riscos de contaminação do soro, bem como, gastos com membranas, energia e maior tempo. Com isso, a condição de preparo escolhida para o soro de leite ser utilizado na indução da α -galactosidase foi a que o soro passa somente por uma única etapa de esterilização e requer menor manipulação e tempo, que é o processo de autoclavagem.

4.2 Composição do soro de leite

O teor de lactose determinado para o soro de leite foi de 52 g/L e o pH 4,9. O soro de leite pode ser dividido em dois tipos: doce e ácido, sendo a técnica de processamento utilizada que influencia o tipo de soro. O soro de leite doce bovino normalmente apresenta um pH próximo de 6 a 7, e é coletado após a coagulação da caseína, durante a produção de queijo, por meio de coalho ou coagulação enzimática utilizando uma mistura de pepsina e quimosina (RAMA, et al., 2019; WHERRY, et al., 2019). Em contraste, o soro ácido tem um pH de aproximadamente 4,5 a 5,8. Este soro resulta da atividade de bactérias do gênero *Lactobacillus* ou da adição de ácido láctico ou ácidos minerais utilizados para coagular a caseína para a fabricação da maioria dos tipos de caseínas industriais (ARGENTA & SCHEER, 2019; GUO & WANG, 2019; RYAN & WALSH, 2016; PINTADO, et al., 2001; SISO, 1996). O teor de lactose presente em soro ácido está compreendido entre 46 e 52 g/L, enquanto em soro doce a quantidade é menor, variando de 44 a 46 g/L (GUO & WANG, 2019). Com isso, pode-se afirmar que o soro de leite utilizado no presente estudo pode ser classificado como soro ácido.

A indústria de laticínios tem tentado criar uma aplicação econômica e ambientalmente sustentável para o soro ácido, visto que este tipo de soro é altamente poluente, dificultando o seu descarte no meio ambiente sem efeitos custosos nos ecossistemas circundantes (MENCHIK, et al., 2019). Com isso, uma forma de utilizar esse subproduto de maneira sustentável é a sua aplicação para a produção de enzimas,

tornando assim o custo de produção enzimática mais econômico, além de contribuir com a economia circular.

4.3 Atividade de α -galactosidase intracelular e extracelular da cultura de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em soro de leite e em diferentes meios, fontes de carbono e tempos

As atividades das α -galactosidases intra e extracelular, obtidas após o cultivo da levedura *D. hansenii* UFV-1 em soro de leite e em diferentes meios, nos tempos de 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas, estão apresentadas nas Tabelas de 2 a 11.

Tabela 2 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o soro de leite

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
36	0,274167 $\pm$ 0,0024 A
24	0,162200 $\pm$ 0,0013 B
12	0,103133 $\pm$ 0,0005 C
48	0,065933 $\pm$ 0,0019 D
8	0,052967 $\pm$ 0,0033 E
4	0,006700 $\pm$ 0,0002 F

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o soro de leite

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
36	0,212633 $\pm$ 0,0098 A
48	0,188600 $\pm$ 0,0035 B
24	0,134800 $\pm$ 0,0080 C
12	0,021333 $\pm$ 0,0005 D
8	0,005400 $\pm$ 0,0005 D E
4	0,000600 $\pm$ 0,0001 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pela análise das Tabelas 2 e 3 é possível observar que a maior produção de α -galactosidase por *D. hansenii* UFV-1 em soro de leite ocorreu no tempo de 36 horas, tanto para a enzima extra quanto para a intracelular. A levedura *Kluyveromyces lactis* recombinante produziu uma α -galactosidase extracelular com uma atividade de 19 U/mL, utilizando soro de leite e melão de beterraba, no tempo de 120 horas (ÁLVAREZ-CAO, et al., 2018). Além disso, há relatos na literatura da utilização do soro de leite em combinação com outro(s) componente(s) para indução de outras enzimas hidrolíticas. Por exemplo, alguns autores demonstraram a produção de β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, utilizando como fontes de carbono e nitrogênio o soro de leite e o licor de milho, respectivamente, e uma maior atividade da enzima, 21,99 U/mL, foi encontrada quando se utilizou 820 mL do soro e 14,36 mL de licor de milho, por 24 horas (PERINI, et al., 2013).

Vale ressaltar que, no presente trabalho, a menor atividade enzimática de α -galactosidase pode ser explicada pelo fato do soro de leite não ter sido suplementado com nenhum outro componente. Além disso, a levedura utilizada não passou por um nenhum processo de engenharia genética, sendo utilizada na sua forma nativa. Ademais, teores de lactose diferente nos diferentes soros podem induzir a produção de quantidades diferentes da enzima de interesse.

Tabela 4 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 0,5% lactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
36	0,130867 $\pm$ 0,0060 A
24	0,092367 $\pm$ 0,0005 B
8	0,061833 $\pm$ 0,0015 C
12	0,055400 $\pm$ 0,0024 C
48	0,034333 $\pm$ 0,0001 D
4	0,006100 $\pm$ 0,0002 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 0,5% lactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
36	0,0964333 $\pm$ 0,0011 A
48	0,0923000 $\pm$ 0,0027 A
24	0,0817667 $\pm$ 0,0007 B
12	0,0490667 $\pm$ 0,0018 C
8	0,0189333 $\pm$ 0,0008 D
4	0,0017333 $\pm$ 0,0001 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As Tabelas 4 e 5 demonstram que as maiores atividades de α -galactosidase intra e extracelular foram de 0,130 e 0,096 U/mL, respectivamente, no tempo de 36 horas. Além disso, a enzima intracelular apresentou uma atividade maior em relação à extracelular. Estudos realizados por VIANA, et al., 2011 relatam que o tempo de maior

atividade da α -galactosidase intracelular, 4,88 U/mL, e extracelular, 1,28 U/mL, de *D. hansenii* UFV-1 foi no tempo de 48 horas, ao se utilizar YP + 1 % de lactose. Maiores atividades enzimáticas foram encontradas no trabalho anterior, provavelmente devido à presença de uma maior concentração de fonte de carbono utilizada.

Tabela 6 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 1% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
24	0,0589667 $\pm$ 0,0003 A
12	0,0586333 $\pm$ 0,0005 A
36	0,0502333 $\pm$ 0,0004 B
48	0,0234667 $\pm$ 0,0012 C
8	0,0155333 $\pm$ 0,0014 D
4	0,0042333 $\pm$ 0,0004 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 1% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
48	0,0406333 $\pm$ 0,0007 A
24	0,0263667 $\pm$ 0,0002 B
36	0,0072667 $\pm$ 0,0002 C
12	0,0029333 $\pm$ 0,0001 D
8	0,0012000 $\pm$ 0,0001 E
4	0,0003667 $\pm$ 0,0002 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As Tabelas 6 e 7 mostram que a enzima α -galactosidase extracelular apresentou maior atividade de 0,0406 U/mL no tempo de 48 horas, enquanto a α -galactosidase intracelular apresentou máxima atividade de 0,0589 U/mL no tempo de 24 horas. VIANA, et al., 2011 obtiveram as maiores atividades de α -galactosidase extracelular (0,97 U/mL) e intracelular (5,27 U/mL) no tempo de 48 horas, ao utilizarem o mesmo meio de cultivo.

Tabela 8 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 0,5% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
36	0,112367 $\pm$ 0,0008 A
24	0,060667 $\pm$ 0,0025 B
12	0,054300 $\pm$ 0,0034 C
48	0,034567 $\pm$ 0,0001 D
8	0,014733 $\pm$ 0,0011 E
4	0,004667 $\pm$ 0,0002 F

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 9 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo YP + 0,5% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
36	0,0381000 $\pm$ 0,0012 A
48	0,0289000 $\pm$ 0,0011 B
24	0,0140667 $\pm$ 0,0010 C
12	0,0054667 $\pm$ 0,0002 D
8	0,0018333 $\pm$ 0,0001 E
4	0,0004333 $\pm$ 0,0003 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pela análise das Tabelas 8 e 9 é possível observar que uma menor concentração da fonte de carbono galactose induziu uma maior atividade de α -galactosidase intracelular (0,112 U/mL), o que não foi observado para a α -galactosidase extracelular, que apresentou uma atividade enzimática de 0,038 U/mL. Para ambas enzimas, a melhor atividade enzimática foi encontrada no tempo de 36 horas de cultivo. Ademais, foi possível observar que as maiores atividades enzimáticas foram encontradas para α -galactosidase intracelular.

Tabela 10 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo MM + 1% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
36	0,183167 $\pm$ 0,012 A
48	0,163667 $\pm$ 0,0051 B
24	0,141467 $\pm$ 0,0015 C
12	0,064467 $\pm$ 0,0012 D
8	0,022600 $\pm$ 0,0008 E
4	0,011400 $\pm$ 0,0004 F

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 11 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, em todos os tempos testados, utilizando o meio de cultivo MM + 1% galactose

Tempos (h)	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
36	0,0993000 $\pm$ 0,0027 A
24	0,0111333 $\pm$ 0,0001 B
12	0,0039333 $\pm$ 0,0002 C
48	0,0018000 $\pm$ 0,0001 C
8	0,0015667 $\pm$ 0,0004 C
4	0,0005333 $\pm$ 0,0003 C

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As Tabelas 10 e 11 demonstram que as maiores atividades enzimáticas de α -galactosidase intra (0,183 U/mL) e extracelular (0,099 U/mL) ocorreram no tempo de 36 horas. VIANA, et al., 2011 verificaram que α -galactosidase extracelular não apresentou atividade enzimática no tempo de 36 horas, enquanto a atividade de α -galactosidase intracelular foi o dobro daquela encontrada no presente estudo, utilizando o mesmo meio de cultivo.

Após analisar as atividades enzimáticas de α -galactosidase intra e extracelular em diferentes tempos, foi possível observar que o melhor tempo para a produção de α -galactosidases intra e extracelular foi 36 horas. Posteriormente, foi avaliado qual seria o melhor substrato para a produção das α -galactosidases. As atividades das α -galactosidases intra e extracelular, obtidas após cultivo da levedura nos diferentes substratos testados, no tempo de 36 horas, estão apresentadas nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, após 36 horas, utilizando soro de leite e diferentes meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono.

Meios	Atividade da α -galactosidase extracelular (U/mL)
Soro de leite	0,213 $\pm$ 0,0098 A
MM + 1 % galactose	0,099 $\pm$ 0,0027 B
YP + 0,5 % lactose	0,096 $\pm$ 0,0011 B
YP + 1 % galactose	0,041 $\pm$ 0,0002 C
YP + 0,5 % galactose	0,038 $\pm$ 0,0012 C

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 13 – Atividade (U/mL) da α -galactosidase intracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1, após 36 horas, utilizando soro de leite e diferentes meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono.

Meios	Atividade da α -galactosidase intracelular (U/mL)
Soro de leite	0,274 $\pm$ 0,0024 A
MM + 1 % galactose	0,183 $\pm$ 0,012 B
YP + 0,5 % lactose	0,131 $\pm$ 0,0060 C
YP + 0,5 % galactose	0,112 $\pm$ 0,0008 D
YP + 1 % galactose	0,059 $\pm$ 0,0004 E

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi possível observar que o meio de cultivo que induziu a maior atividade enzimática da enzima α -galactosidase intra e extracelular foi o soro de leite, provavelmente por se tratar de um meio complexo composto por lactose (4,2 – 5 %), proteínas (0,7 – 0,9 %), minerais (0,5 – 0,6 %) e lipídeos (0,1 – 0,8 %), além de apresentar ácido láctico e vitaminas B (KOLESOVS & SEMJONOV, 2023; PIRES, et al., 2021)

que são componentes essenciais para o crescimento da levedura e consequentemente produção da enzima. Este estudo é pioneiro na indução da α -galactosidase pelo soro de leite, visto que não há dados na literatura sobre a utilização deste resíduo para indução da enzima α -galactosidase por microrganismos. Ademais, deve-se destacar que no presente estudo o soro de leite foi utilizado como única fonte de carbono e nitrogênio, sem a suplementação de qualquer outro tipo de componente. A utilização do soro de leite para a produção de enzimas apresenta grande vantagem devido ao seu baixo custo. Além disso, é uma alternativa para minimizar os impactos ambientais que esse resíduo acarreta, bem como contribuir para a economia circular.

A enzima β -galactosidase também foi produzida por *Kluyveromyces lactis* quando o soro de leite foi suplementado com extrato de levedura, obtendo uma atividade enzimática de 4418,37 U/g de célula (DE FREITAS, et al., 2020). Também foi verificada a produção de lipase, 285,82 U/mL, pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* quando o meio de cultura contendo citrato de sódio, sais minerais e biotina foi suplementado com 2 % de soro de leite, alcançando um aumento de 6,7 vezes na produção de lipase (KNOB, et al., 2020).

Para a enzima α -galactosidase extracelular, observou-se que embora YP seja um meio rico em nutrientes em contraste com MM, que contém somente sais minerais, ambos induziram atividades enzimáticas iguais, não havendo diferença entre eles. Além disso, as diferentes fontes de carbono com suas diferentes concentrações nesses meios não afetaram o valor de atividade enzimática de α -galactosidase. Ademais, vale destacar que no tempo de 36 horas o meio MM + 1 % galactose induziu atividade de α -galactosidase extracelular de 0,099 U/mL, o que não foi observado quando VIANA, et al. (2011) cultivou a mesma levedura no mesmo meio de cultivo e fonte de carbono.

No meio de cultura contendo somente extrato de levedura e peptona (YP) com diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações, foi possível observar a atividade de α -galactosidase extracelular para todos os açúcares testados. Além disso, ao utilizar a concentração de 0,5 % de lactose e galactose, no tempo de 36 h, as atividades enzimáticas foram de 0,096 e 0,038 U/mL, respectivamente, mostrando que o dissacarídeo lactose em meio YP foi o que induziu a melhor atividade enzimática. Estudos realizados por VIANA, et al. (2011) corroboram os achados deste estudo pois, ao utilizarem o meio YP com 1 % lactose e galactose, as atividades enzimáticas obtidas foram de 0,70 e 0,35 U/mL, respectivamente, ou seja, o açúcar que induziu maior atividade enzimática de α -galactosidase foi a lactose.

Para a enzima α -galactosidase intracelular, os diferentes meios com suas respectivas fontes de carbono (MM + 1 % galactose e YP + 0,5 % lactose) induziram atividades enzimáticas diferentes. O meio MM embora contenha menos nutrientes em relação ao meio YP, induziu uma maior atividade enzimática de α -galactosidase. Provavelmente isso pode ser explicado pela maior concentração do açúcar indutor, que neste caso foi a galactose. Ademais, ao utilizar MM + 1 % galactose, foi possível observar atividade enzimática de aproximadamente de 0,200 U/mL no tempo de 36 horas, valor correspondente à metade daquele encontrado por VIANA, et al. (2011), ao cultivarem a levedura neste meio contendo a mesma concentração de galactose, pelo mesmo tempo.

No meio de cultura contendo somente extrato de levedura e peptona (YP) com diferentes fontes de carbono, em diferentes concentrações, foi possível observar a atividade de α -galactosidase intracelular para todos os açúcares testados, destacando-se a lactose. Foi possível observar que, ao utilizar o mesmo meio de cultivo e a mesma concentração 0,5 % dos açúcares lactose e galactose, a atividade de α -galactosidase intracelular foi de 0,131 e 0,112 U/mL, respectivamente, no tempo de 36 horas. VIANA, et al. (2011), também encontraram que a lactose, neste meio de cultivo e neste tempo de 36 h, foi o melhor indutor de α -galactosidase em relação a galactose.

Após escolha do soro de leite como o melhor meio de cultivo para a produção das α -galactosidases por *D. hansenii* UFV-1, foi observado que o melhor tempo para a obtenção da maior atividade de α -galactosidase intra e extracelular foi 36 horas (Tabelas 3 e 4). Em outros trabalhos realizados por JÚNIOR, et al., (2018); VIANA, et al., (2009); JÚNIOR, et al., (2009), com as α -galactosidases intra e extracelulares de *D. hansenii* UFV-1, o tempo utilizado para a produção de α -galactosidases estava entre 31 e 36 horas.

A produção da enzima α -galactosidase por *D. hansenii* UFV-1 na presença das fontes de carbono galactose e lactose pode ser explicada através de um modelo de indução para o regulon GAL/MEL em leveduras, em que a galactose, ao entrar na célula, ativa os genes GAL e MEL, responsáveis por codificar a α -galactosidase intracelular, que posteriormente será secretada para o meio extracelular (VIANA, et al., 2011). Alguns modelos de indução para o regulon GAL/MEL em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* já foram propostos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2) é capaz de transportar galactose para o interior da célula por Gal2p, uma permease. Em seguida, a galactose intracelular se liga e ativa Gal3p. Posteriormente, Gal3p, na sua forma ativada, liga-se e sequestra Gal80p para o citoplasma, esgotando Gal180p no núcleo. Com isso, Gal4p, ativador

transcricional que está ligada aos promotores dos genes GAL, é liberada da ação inibitória de Gal80p e ativa a expressão de genes incluindo GAL2, GAL3 e GAL80. O aumento das concentrações de Gal2p e Gal3p resulta em uma atividade transcricional, em que cada uma dessas proteínas impõem um ciclo de feedback positivo, enquanto Gal80p impõe um ciclo de feedback negativo (ACAR, et al., 2005; BIGGAR & CRABTREE, 2001; IDEKER, et al., 2001). Em resumo, na ausência de galactose, a atividade transcricional de Gal4p é inibida por Gal3/80p (Figura 3 A). Na presença de galactose, este monossacarídeo se liga a Gal3/80p, permitindo que Gal4p seja liberada da ação inibitória de Gal80p e ative a transcrição de uma nova Gal3/80p (Figura 3 B). Gal3/80p recém- sintetizado inibe a atividade transcricional de Gal4p e, portanto, ocorre a transcrição dos genes GAL e Mel, sendo este último responsável por produzir a α -galactosidase (Figura 3 C) (SMIDTAS, et al., 2006). Entretanto, a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar o dissacarídeo lactose.

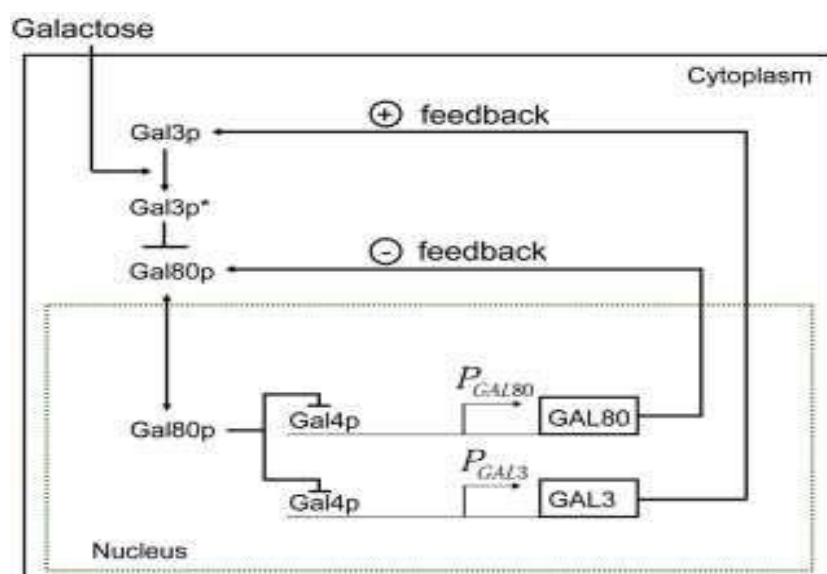


Figura 2 – Via de sinalização da galactose. Fonte: KULKARNI, et al., 2010.

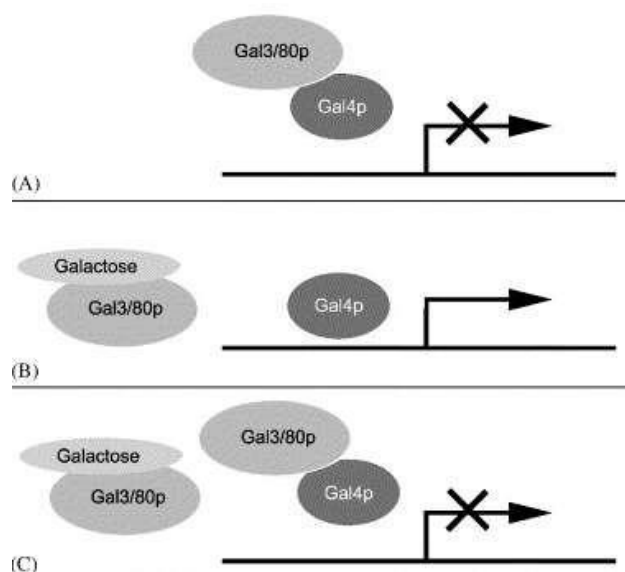


Figura 3 – Representação esquemática do circuito de indução da galactose. (A) Ausência de galactose, a atividade transcritora de Gal4p é inibida (B) Presença de galactose ativa a transcrição de uma nova Gal3/80p (C) Gal3/80p recém-sintetizado inibe a atividade transcritora de Gal4p. Fonte: SMIDTAS, et al., 2006.

Para *Kluyveromyces lactis*, levedura que pode ser encontrada em produtos lácteos, a enzima permease (Lac 12) é capaz de transportar lactose e galactose para o citoplasma da célula. A galactose transportada ou aquela oriunda da hidrólise da lactose, ativa a proteína Gal1p. Posteriormente, Gal1p ativada entra no núcleo e interage com a proteína repressora Gal80p; com isso, Gal80p deixa de inibir a enzima Gal4p (Lac 9) e a transcrição da α -galactosidase ocorre (ANDERS, et al., 2006).

Neste contexto, *D. hansenii* UFV-1, por ter sido isolada de um ambiente lácteo, quando cultivada em meios como soro de leite, YP e MM contendo lactose e galactose como fontes de carbono, provavelmente consegue transportar estes açúcares para o interior da célula através de uma permease (Lac 12). Posteriormente, a galactose ativa a proteína Gal1p que, ativada, entra no núcleo da célula e interage com Gal80p. A proteína repressora Gal80p, ao se ligar com Gal1p, libera Gal4p (Lac 9) da sua ação inibitória e ocorre a ativação da expressão dos genes GAL e MEL1, sendo este último responsável por codificar α -galactosidase intracelular e extracelular nos meios de cultivo testados.

Embora, o valor de atividade enzimática de α -galactosidase intracelular tenha sido um pouco maior, deve-se ressaltar que a escolha da α -galactosidase extracelular para as próximas etapas apresenta vantagens, visto que processos de extração enzimática não são

necessários, o que resulta em economia de tempo e energia. Com isso, ressalta-se a obtenção de uma enzima de grande interesse biotecnológico, induzida por um meio de baixo custo e em pouco tempo de cultivo.

4.4 Purificação da α -galactosidase extracelular produzida pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1

As etapas de purificação da α -galactosidase extracelular produzida por *D. hansenii* UFV-1 estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Resumo das etapas de purificação da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1.

Etapas	Volume (mL)	Atividade (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	10	7,05	4,96	1,42	1	100
Troca iônica DEAE	47	2,068	0,329	6,28	4,42	29,3

Para a purificação parcial da α -galactosidase extracelular, o extrato bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica, em coluna DEAE. Foi observado um aumento de 4 vezes na atividade específica da enzima e um rendimento de 29,3 % (Tabela 14). A utilização da troca iônica como uma única etapa de purificação da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 também foi realizada por JUNIOR, et al., (2018), no qual, ao submeter o extrato bruto liofilizado à troca iônica em coluna DEAE obteve um aumento de 28,88 vezes na atividade específica e um rendimento de 90,8 %. VIANA, et al., (2006), ao submeter o extrato bruto liofilizado contendo a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 à troca iônica, como segunda etapa de purificação, obteve um aumento na atividade específica de 16,7 vezes e um rendimento de 58,4 %.

O perfil da eluição da cromatografia de troca-iônica revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, que foi eluído durante o gradiente salino, com máxima atividade na concentração de 0,3 M de NaCl. VIANA, et al., (2006) ao trabalhar com α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1, encontrou no perfil cromatográfico somente um único pico de atividade, eluído nas concentrações de 0,45 a 0,6 M NaCl.

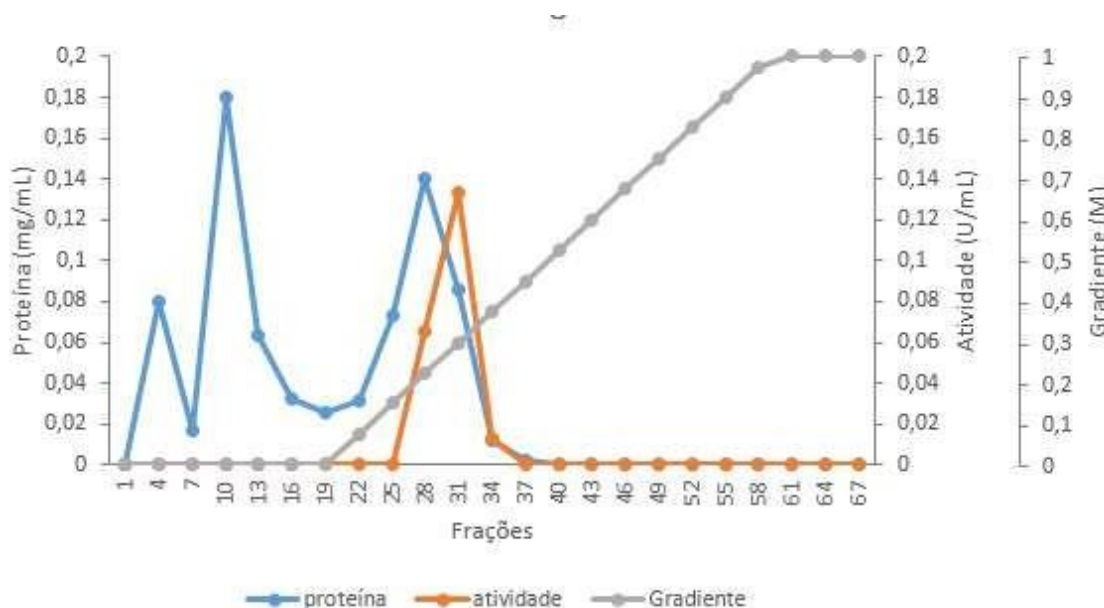


Figura 4 – Perfil cromatográfico da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1, proveniente da cromatografia de troca iônica em coluna DEAE – Sepharose. Atividade de α -galactosidase (laranja); proteína (azul); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (cinza).

Para confirmação da etapa de purificação da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1, as frações que apresentaram atividade enzimática, eluídas da coluna de DEAE- Sepharose, foram submetidas à eletroforese de gel poliacrilamida 12,5 % sob condições desnaturantes. O perfil de migração das proteínas presentes nessas amostras está apresentado na Figura 5.

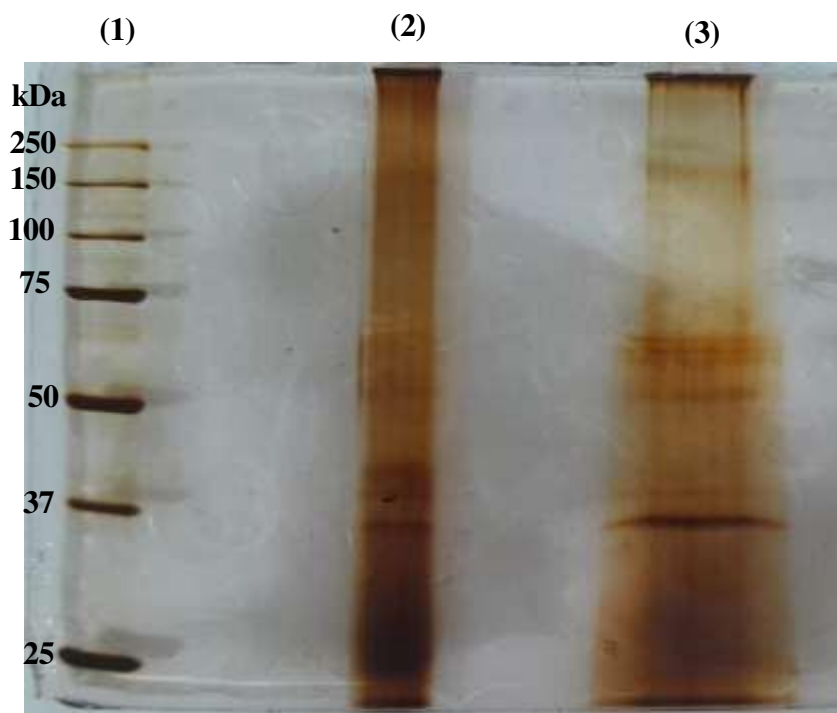


Figura 5 – Gel de eletroforese desnatante (SDS-PAGE 12,5 %) corado com nitrato de prata de amostras contendo α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1. (1) Marcador de massa molecular; (2) extrato bruto; (3) Fração enzimática proveniente da troca iônica.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida é coerente com uma única etapa de purificação utilizada. Apesar de ainda apresentar muitas proteínas, a canaleta 3 do gel evidencia a presença de quatro bandas entre 50 e 75 kD. Vale ressaltar que VIANA, et al., (2006), ao trabalharem com a enzima α -galactosidase extracelular na sua forma glicosilada, verificaram esta apresentava tamanho de 60 kD. Com isso, é possível inferir que provavelmente uma das quatro bandas proteicas é a forma glicosilada da enzima α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1.

A glicosilação presente na enzima α -galactosidase trata de uma modificação pós-traducional (PTMs) que ocorre durante a biossíntese da proteína e consiste na adição do grupo modificador glicosil a um ou mais aminoácidos na proteína. As PTMs desempenham um papel fundamental em inúmeros processos biológicos, afetando significativamente a dinâmica e estrutura das proteínas (MANN & JENSEN, 2003). Estudos realizados por VIANA, 2009 revelaram que a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 apresenta galactose e manose em sua estrutura.

4.5 Caracterização Enzimática

4.5.1 Efeito do pH

A Figura 6 mostra que atividades de α -galactosidase consideráveis, acima de 70 %, foram determinadas na faixa de pH entre 2,2 e 6,6; entretanto, o valor de atividade máxima foi encontrado em pH 4,0. Atividades menores, abaixo de 65 %, foram observadas nos valores de pH 7,0; 7,6 e 8,0.

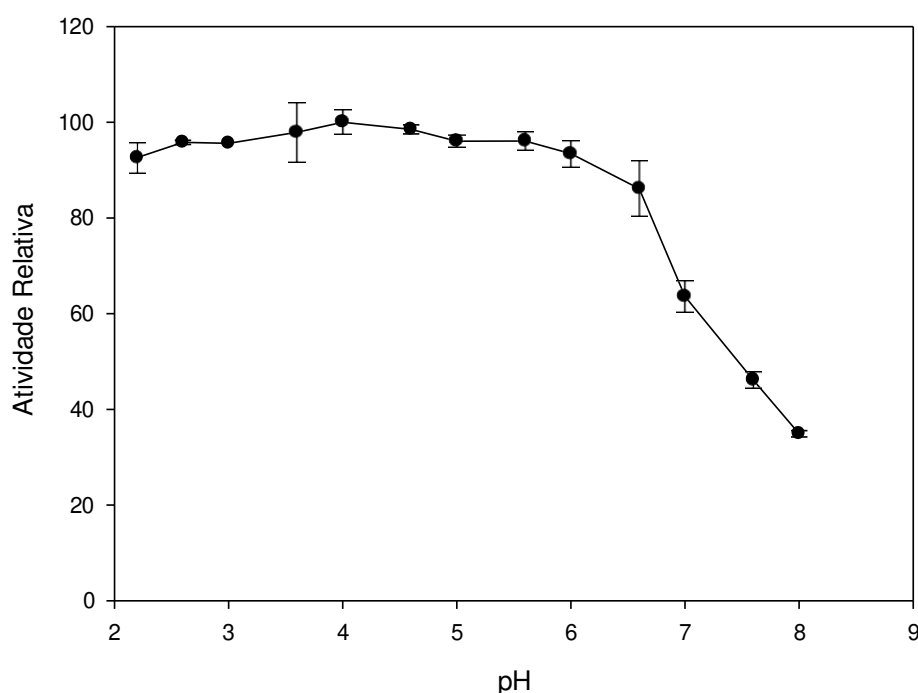


Figura 6 – Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase extracelular parcialmente purificada produzida por *D. hansenii* UFV-1.

Na figura acima foi possível observar que a atividade enzimática foi maior em faixas de pH ácido. Na presença de pH alcalino, houve uma redução na atividade enzimática, que provavelmente aconteceu devido a uma alteração no padrão de cargas da enzima. O pH pode alterar o estado de ionização dos aminoácidos básicos ou ácidos na proteína e, com isso, as ligações iônicas que mantêm a estrutura tridimensional da proteína serão afetadas, acarretando em uma alteração na função proteica e/ou inativação da enzima (KAISER, 2012).

A faixa de pH ótimo determinada para α -galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* foi 4,0 (KATROLIA, et al., 2019). Em outro estudo realizado por WANG, et al.,

(2020), verificou-se que o pH ótimo da α -galactosidase extracelular purificada de *Aspergillus oryzae* YZ1 clonado e superexpresso em *Pichia pastoris* foi de 4,66. Ademais, VIDY, et al., (2020), ao estudarem uma α -galactosidase extracelular purificada de *Aspergillus awamori*, verificaram que essa enzima apresentava atividade máxima em pH 5,5. Além disso, outros trabalhos realizados com a α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 constataram que o pH ótimo foi 5,0 (VIANA, et al., 2006). É notável que fungos e leveduras apresentam um pH ótimo ácido, o que é essencial em diversas aplicações industriais, como é o caso da α -galactosidase utilizada na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose no leite de soja, uma vez que o pH deste produto apresenta-se entre 6,4 – 6,8.

4.5.2 Efeito da Temperatura

A Figura 7 mostra que as maiores atividades de α -galactosidase, acima de 80 %, foram detectadas entre de 50 e 60 °C, e a temperatura ótima foi de 60 °C. Em temperaturas acima de 60 °C foi observado um decréscimo acentuado na atividade enzimática e, esta foi nula nas temperaturas de 70 e 80 °C, provavelmente indicando desnaturação térmica da enzima.

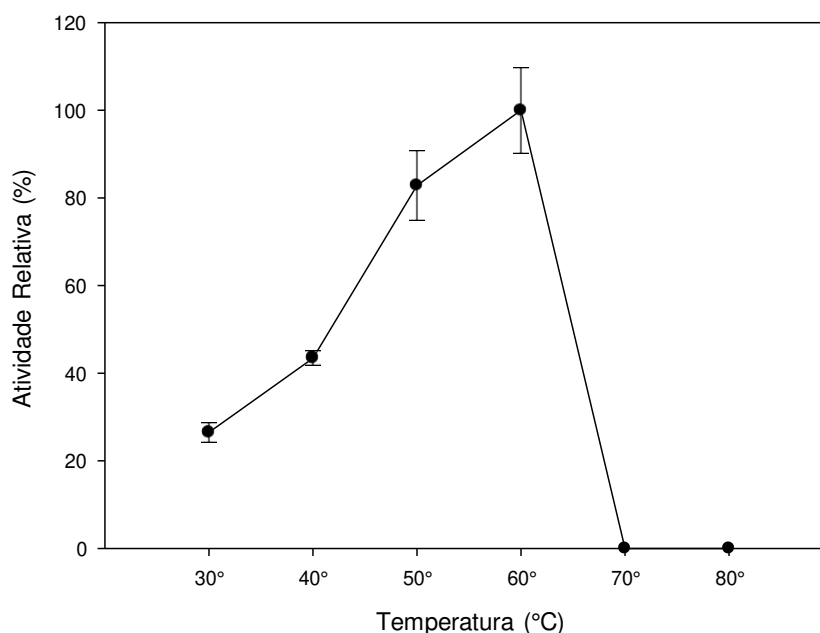


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase extracelular parcialmente purificada produzida por *D. hansenii* UFV-1.

Foi possível observar que com o aumento da temperatura, ocorreu um aumento da atividade enzimática. Tal fato ocorreu, provavelmente, porque à medida que a temperatura aumenta, ocorre um aumento da energia cinética das moléculas, o que favorece uma maior interação entre o sítio ativo da enzima e as moléculas do substrato, até que a enzima atinge sua atividade máxima. Em seguida, em temperaturas acima de 60 °C, a atividade enzimática apresentou-se nula, provavelmente devido à desnaturação e ruptura da conformação tridimensional da enzima (EED, 2012). A temperatura de máxima atividade para α -galactosidase extracelular purificada de *Aspergillus oryzae* YZ1 clonado e superexpresso em *Pichia pastoris* foi 50 °C (WANG, et al., 2020). KATROLIA, et al., (2019), verificaram que α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* apresentou temperatura ótima de 50 °C. Foi verificado que uma α -galactosidase extracelular recombinante expressa em *Pichia pastoris* apresentou atividade máxima na temperatura de 55 °C (CHEN, et al., 2015). KOTE, et al., (2020), constataram que a temperatura ótima da α -galactosidase extracelular de *Penicillium sp.* foi 60 °C. Ademais, estudos realizados por VIANA, et al., (2006) verificaram que a temperatura ótima da α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1 foi 60 °C, corroborando com os achados encontrados no presente estudo. Pelo fato de apresentar atividade enzimática em altas temperaturas, a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 apresenta grande potencial para a aplicação industrial, são utilizadas altas temperaturas em processamentos industriais.

4.5.3 Análise de Termoestabilidade

A Figura 8 mostra que α -galactosidase extracelular purificada manteve 96, 91, 94, 93 e 92 % de sua atividade original quando pré-incubada a 50 °C, nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente. A enzima, quando pré-incubada a 60° C, manteve 97, 87, 90, 94 e 90 % de sua atividade nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente.

A partir das análises estatísticas, observou-se que não houve diferença da atividade enzimática entre os tempos testados à 50 e à 60° C. Com isso, é possível afirmar que a enzima manteve sua atividade enzimática durante 5 dias de incubação nas temperaturas de 50 e 60 °C.

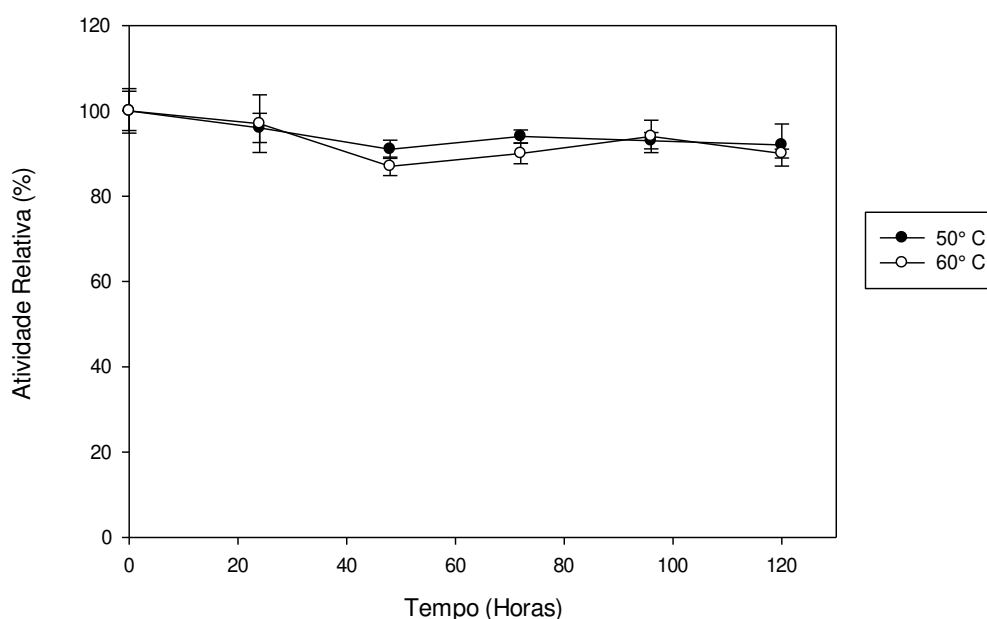


Figura 8 – Efeito da temperatura na estabilidade de α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1. As amostras enzimáticas foram pré- incubadas nas temperaturas de 50 °C (●) e 60 °C (○). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

VIANA (2005), ao estudar α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii*, observou que, a 50 °C, a enzima manteve 90 % de sua atividade original por 6 horas e que, após 18 horas de incubação, a enzima conservava 33 % de sua atividade. Na temperatura de 60 °C, a enzima manteve 91 % de sua atividade original por 2,5 horas e após 9 horas de incubação, perdeu 80 % de sua atividade. Uma α -galactosidase de *Rasamsonia emersonii* expressa em *Pichia pastoris* manteve 100 % de sua atividade original após incubação a 50 – 70 °C durante 3 horas (LU-AN, et al., 2019). Em outros estudos realizados, a α -galactosidase de *Aspergillus niger* NRC114 manteve 100 e 95 % de sua atividade original a 50 e 60 °C, respectivamente, após 2 horas de incubação (OTHMAN, et al., 2023).

Com isso, é possível afirmar que a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* é bastante termoestável e apresenta alto potencial em aplicações industriais, como na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja, visto que, esses processamentos geralmente ocorrem em temperaturas compreendidas entre 50 e 60 °C, durante algumas horas. O processamento em alta temperatura apresenta vantagens como

redução no risco de contaminação microbiana e, ao mesmo tempo, acelera o tempo de processamento.

Após o armazenamento da enzima α -galactosidase extracelular à temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4° C) foi possível observar que a enzima manteve 100 % de sua atividade original nas diferentes temperaturas testadas, durante 5, 15 e 30 dias (Figura 9). VIANA (2005) verificou que a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* manteve 94, 84 e 78 % de atividade após 30, 60 e 90 dias, respectivamente, quando armazenada na temperatura de 4° C.

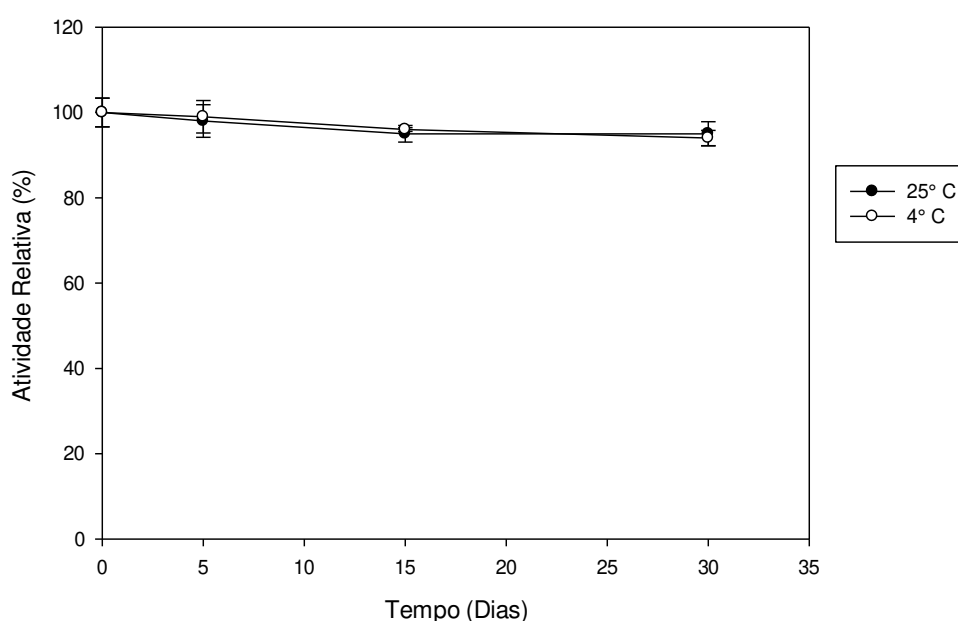


Figura 9 – Efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade de α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii* UFV-1. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 25 °C (—●—) e 4 °C (—○—). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A partir destes resultados, é possível afirmar que α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 apresenta potencial na aplicação industrial, visto que esta enzima pode ser aplicada em produtos de soja, por exemplo, sem perder sua atividade enzimática quando o produto for armazenado em temperatura de prateleira ou quando for submetido à temperaturas de refrigeração. Além disso, vale ressaltar que essa enzima pode ser transportada para uma possível aplicação sem a necessidade de refrigeração, o que é uma vantagem não somente em termos econômicos, como também na redução dos cuidados com a embalagem e transporte.

A estabilidade da enzima α -galactosidase nas diferentes temperaturas testadas provavelmente pode ser explicada pela presença de resíduos de açúcar em sua estrutura. A glicosilação de uma proteína aumenta a estabilidade do seu estado nativo, uma vez que ocorre uma redução da entropia conformacional do estado desenovelado (VIANA, 2009). Além disso, muitas enzimas podem adquirir N e O – glicosilação em diferentes locais, o que pode auxiliar na manutenção da sua estabilidade a longo prazo (RYSŁAVÁ, et al., 2013).

4.6 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii*

A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis de ROs presentes no leite de soja, em função do tempo de incubação com a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1. Os valores dos teores dos açúcares solúveis estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, após utilização de 0,02 e 0,08 U de enzima por 5 mL de leite de soja, respectivamente.

Tabela 15 – Teores de estaquiase, rafinose e sacarose após a hidrólise de ROs no leite de soja pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 na concentração de 0,004 U/mL de leite de soja.

Tempo de hidrólise (h)	Teores (mg/g) $\pm$ DP		
	Estaquiase	Rafinose	Sacarose
0	43,5 $\pm$ 0,05	18 $\pm$ 0,02	96 $\pm$ 0,04
4	40 $\pm$ 0,02	17,5 $\pm$ 0,1	98 $\pm$ 0,02
6	40 $\pm$ 0,03	17,5 $\pm$ 0,04	100 $\pm$ 0,06

Tabela 16 – Teores de estaquiose, rafinose e sacarose após a hidrólise de ROs no leite de soja pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 na concentração de 0,016 U/mL de leite de soja.

Tempo de hidrólise (h)	Teores (mg/g) $\pm$ DP		
	Estaquiose	Rafinose	Sacarose
0	43,5 $\pm$ 0,01	18,0 $\pm$ 0,05	96 $\pm$ 0,3
4	39 $\pm$ 0,04	17,5 $\pm$ 0,03	100 $\pm$ 0,2
6	36 $\pm$ 0,03	16,0 $\pm$ 0,5	100 $\pm$ 0,02

Segundo os dados apresentados nas Tabelas 15 e 16, a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 apresentou atividade sobre os ROs, confirmando o seu potencial uso na redução dos teores desses açúcares no leite de soja. Foi verificado que ao utilizar 0,02 U da enzima, obteve-se percentuais de hidrólise de 8,0 e 2,8 % de estaquiose e rafinose, respectivamente, com um aumento de 2,8 % de sacarose, no tempo de 4 horas. Ao utilizar uma quantidade de 0,08 U da enzima, os teores de hidrólise foram maiores, obtendo taxas de hidrólise de 10,3 e 3 % de estaquiose e rafinose, respectivamente, com um aumento de 4,2 % de sacarose, no tempo de 4 horas. VIANA, et al., (2006), ao avaliarem o efeito de α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 na hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose em leite de soja, verificaram que no tempo de 4 horas, estaquiose e rafinose já haviam alcançado 100 % de hidrólise, com um aumento de 6,53 % de sacarose, mas os pesquisadores utilizaram 10,5 U da enzima. A α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolisar 30,3 % dos oligossacarídeos de rafinose, no leite de soja, após 4 horas, utilizando 50 U da enzima (KATROLIA, et al., 2019).

No tempo de 6 horas, ao utilizar 0,02 e 0,08 U da enzima, a hidrólise dos oligossacarídeos foi de 8,1 e 2,8 % e 17 e 11 %, para estaquiose e rafinose, respectivamente, com um aumento de 4,2 % de sacarose. Uma α -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, após 6 horas de incubação, alcançou um percentual de hidrólise de 91 e 93 % de estaquiose e rafinose, respectivamente, no leite de soja, utilizando 52,1 U da enzima (PRASHANTH & MULIMANI, 2005).

Foi possível observar que os percentuais de hidrólise de estaquiose e rafinose foram maiores ao se utilizar uma maior quantidade de enzima. Em altas temperaturas, como as utilizadas no processamento da soja, as enzimas ganham energia cinética e isso proporciona um aumento na quantidade de colisões bem-sucedidas com as moléculas do substrato, garantindo que a hidrólise ocorra. Além disso, foi possível observar que quanto maior o tempo, maiores percentuais de hidrólise foram alcançados, isso porque quanto maior o tempo de contato entre o sítio ativo da enzima com o substrato, mais complexos enzima-substrato são formados e maior a capacidade da enzima de hidrolisar o substrato (ENRÍQUEZ, et al., 2022). Ademais, observou-se diferenças aparentes entre as taxas de hidrólise de estaquiose e rafinose, isso provavelmente é devido ao acúmulo de rafinose que é formado após a hidrólise de estaquiose (JUNIOR, et al., 2009).

Vale ressaltar que uma redução dos teores de estaquiose, tetrassacarídeo, composto por sacarose e duas moléculas de galactose, ocorre devido à ação que a enzima α -galactosidase exerce sobre a ligação α - 1,6 existente entre as duas moléculas de galactose. A enzima, ao realizar a hidrólise entre esses açúcares, libera rafinose e galactose, e, com isso, à medida que a estaquiose é hidrolisada, a rafinose é formada. A rafinose, trissacarídeo composto por sacarose e uma molécula de galactose, ao sofrer ação da enzima na ligação α - 1,6 entre glicose e galactose, leva à formação de sacarose, dissacarídeo composto por frutose e glicose com ligação α - 1,2, e galactose. Entretanto, não foi possível quantificar os teores de galactose nas condições testadas, provavelmente pela baixa concentração de enzima aplicada no experimento de hidrólise.

Embora outros autores apresentem percentuais de hidrólise de estaquiose e rafinose maiores em relação ao do presente estudo, vale ressaltar que este demonstrou que mesmo utilizando baixas quantidades em U da α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1, a enzima foi capaz de hidrolisar estaquiose e rafinose no leite de soja. Com isso, é possível afirmar que essa enzima apresenta potencial para aplicações industriais, como no processamento da soja e seus derivados.

5. CONCLUSÃO

- A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 foi capaz de produzir α -galactosidase intracelular e extracelular utilizando o soro de leite como fonte de carbono;
- A α -galactosidase extracelular apresentou pH ótimo ácido, temperatura ótima de 60° C, sendo bastante termoestável durante 5 dias em altas temperaturas, o que incentiva sua aplicação industrial;
- A α -galactosidase extracelular foi capaz de hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose presentes em leite de soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, M.; BECSKEI, A.; VAN OUDENAARDEN, A. **Enhancement of cellular memory by reducing stochastic transitions.** *Nature*, v.435, n.7039, p.228-232, 2005.
- ÁLVAREZ-CAO, M. E.; GONZALEZ-SISO, M. I.; CÉRDAN, M. E.; BECERRA, M. **Bioconversion of beet molasses to alpha-galactosidase and ethanol,** *Frontiers* v. 10, p. 430260, 2019.
- KOLESOVS, S.; SEMJONOV, P. **Microalgal conversion of whey and lactose containing substrates: current state and challenges.** *Biodegradation*, v. 34, n. 5, p. 405-416, 2023.
- ANDERS, A.; LILIE, H.; FRANKE, K.; STELLING, J.; GILLES, E. D.; BREUNIG, K. D. **The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding.** *Journal of biological chemistry*, v. 281, n. 39, p. 29337-29348, 2006.
- ARGENTA, A. B.; SCHEER, A. D. P. **Membrane separation processes applied to whey: A review.** *Food Reviews International*, v. 36, n. 5, p. 499-528, 2020.
- BIGGAR, S. R.; CRABTREE, G. R. **Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses.** *The embo Journal*, v. 20, p. 3167 – 3176, 2001.
- BHATIA, S.; SINGH, A.; BATRA, N.; SINGH, J. **Microbial production and biotechnological applications of α – galactosidase.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 150, n.1, p. 1294 -1313, 2020.
- BOURDICHON, F.; LAULUND, S.; TENNING, P. **Inventory of microbial species with a rationale: a comparison of the IDF/EFFCA inventory of microbial food cultures with the EFSA Biohazard Panel qualified presumption of safety.** *FEMS microbiology letters*, v. 366, n. 5, p.48, 2019.
- ÇELEM, E. B.; ÖNAL, S. **Removal of raffinose Family oligosaccharides from soymilk by α -galactosidase immobilized on Sepabeads EC-EA and Sepabeads EC-HA.** *Acs Food Science e Technology*, v. 2, p. 1266 – 1275, 2022.
- CHEN, Z.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LIU, Y.; LI, Y. **High-level expression of a novel α -galactosidase gene from *Rhizomucor miehei* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme.** *Protein expression and purification*, v. 110, p. 107-114, 2015.

- DE FREITAS, M. F. M.; HORTÊNCIO, L. C.; ALBUQUERQUE, T. L.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. **Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564**. Bioprocess and biosystems engineering, v. 43, p. 711-722, 2020.
- DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M. R.; OLIVEIRA, C. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation**. Bioengineered bugs, v. 1, n. 3, p. 164-171, 2010.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Isoflavones in soy –based foods consumed in Brazil: levels, distribution and estimated intake**. J Agric Food Chem, v. 50, p. 5987 – 5993, 2002.
- GUO, M.; WANG, G. **History of whey production and whey protein manufacturing**. Whey protein production, chemistry, functionality, and applications, p. 1-12, 2019.
- GÜRGÖK, S.; ÖGEL, ZB (2019) **Transgalactosylation for galactooligosaccharide synthesis using purified and characterized recombinant α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 overexpressed in *Aspergillus sojae***. Food Health v. 5, n. 1, p.64-76, 2019.
- HU, Y.; TIAN, G.; ZHAO, L.; WANG, H.; NG, T. B. **A protease-resistant α -galactosidase from *Pleurotus djamor* with broad pH stability and good hydrolytic activity toward raffinose family oligosaccharide**. Int. J. Biol. Macromol, v. 94, p. 122-130, 2017.
- IDEKER, T.; THORSSON, V.; RANISH, J. A.; CHRISTMAS, R.; BUHLER, J.; ENG, J. K.; BUMGARNER, R.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; HOOD, L. **Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network**. Science, v. 292, p. 929-934, 2001.
- JEONG, D. M.; YOO, S. J.; JEON, M. S, et al. **Genomic features, aroma profiles, and probiotic potential of the *Debaryomyces hansenii* species complex strains isolated from Korean soybean fermented food**. Food Microbiology, v. 105, p. 104011, 2022.
- JÚNIOR, J. C. B.; VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; SOARES, N. F. F.; GUIMARÃES, V. M. **Immobilization of an alpha-galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 in cellulose film and its application in oligosaccharides hydrolysis**. Food and Bioproducts processing, v. 111, p. 30-36, 2018.

- JUNIOR, W. C. S.; REZENDE, S. T.; VIANA, P. A.; FALKOSKI, L.; REIS, A. P.; MACHADO, S. G.; BARROS, E. G. B.; GUIMARÃES, V. M. **Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilised in alginate.** Food chemistry, v. 114, n. 2, p. 589-593, 2009.
- KATROLIA, P.; RAJASHEKHARA, E.; YAN, Q.; JIANG, Z. **Biotechnological potential of microbial α -galactosidases.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 34, n. 4, p. 307-317, 2014.
- KATROLIA, P.; LIU, X.; LI, J.; KOPPARAPU, N. K. **Enhanced elimination of non-digestible oligosaccharides from soy milk by immobilized α -galactosidase: A comparative analysis.** Journal of Food Biochemistry, v. 43, n. 11, 2019.
- KNOB, A.; IZIDORO, S. C.; LACERDA, L. T.; RODRIGUES, A.; LIMA, V. A. **A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 24, p. 101565, 2020.
- KOTE, N.; MANJULA, A. C.; VISHWANATHA, T.; PATIL, A. G. G. **High-yield production and biochemical characterization of α -galactosidase produced from locally isolated *Penicillium sp.*** Bulletin of the National Research Centre, v. 44, p. 1-10, 2020.
- KULKARNI, V. V.; KAREENHALLI, V.; MALAKAR, P.; PAO, L. Y.; SAFONOV, M. G.; VISWANATHAN, G. A. **Stability analysis of the GAL regulatory network in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*.** BMC bioinformatics, v. 11, p. 1-8, 2010.
- LU –AN, J.; ZHANG, W. X.; WU, W. P.; CHEN, G. J.; LIU, W. F. **Characterization of a highly stable α -galactosidase from thermophilic *Rasamsonia emersonii* heterologously expressed in a modified *Pichia pastoris* expression system.** Microbial Cell Factories, v. 18, p. 1-13, 2019.
- MARTÍNEZ - VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. **Alpha-galactosides: antinutritional factors or functional ingredients?** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 48, n. 4, p. 301-316, 2008.
- MESSINA, M. **Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT).** European Journal of Cancer, v.36, suppl 4, p. 71–72, 2000.
- OTHMAN, A. M.; ELSHAFEI, A. M.; ELSAYED, M. A.; IBRAHIM, G. E.; HASSAN, M. M.; MEHANNA, N. S. **Biochemical characterization and insights into the potency**

of the acidic *Aspergillus niger* NRC114 purified α -galactosidase in removing raffinose family oligosaccharides from soymilk yogurt. BMC biotechnology, v. 23, n. 1, p. 3, 2023.

PERINI, B. L. B.; SOUZA, H. C. M.; KELBERT, M.; APATI, G. P.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S. **Production of β -galactosidase from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.** Chemical engineering, v. 32, 2013.

PERSKY, V. W.; TURYK, M. E.; WANG, L.; FREELS, S.; JUNIOR, R. C.; BARNES, S.; JUNIOR, J. E.; SEPKOVIC, D. W.; BRADLOW, H. L.; POTTER, S. **Effect of soy protein on endogenous hormones in postmenopausal women.** The American journal of clinical nutrition, v. 75, n. 1, p. 145-153, 2002.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. **Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses.** Food Science and Technology International, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.

PIRES, A F.; MARNOTES, N. G., RUBIO, O. D.; GARCIA, A. C.; PEREIRA, C. D. **Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey.** Foods, v. 10, n. 5, p. 1067, 2021.

PRASHANTH, S. J.; MULIMANI, V. H. **Soy milk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate.** Process Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 1199-1205, 2005.

RIZZO, G.; BARONI, L. **Soy, soy foods and their role in vegetarian diets.** Nutrients, v. 10, n. 1, p. 43, 2018.

RYAN, M. P.; WALSH, G. **The biotechnological potential of whey.** Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v. 15, p. 479-498, 2016.

SISO, MI González. **The biotechnological utilization of cheese whey: a review.** Bioresource technology, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

SMIDTAS, S.; SCHÄCHTER, V.; KÉPÈS, F. **The adaptive filter of the yeast galactose pathway.** Journal of theoretical biology, v. 242, n. 2, p. 372-381, 2006.

TABORDA, P. C. S. A.; CARDOSO, L. A. C.; KARP, S. G. **α -Galactosidases: characteristics, production and immobilization.** Journal of Food & Nutrition Research, v. 55, n. 3, 2016.

VIANA, P. A. **Caracterização cinético- bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2005.

- VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; PASSOS, F. M. L.; MACHADO, S. G.; MAITAN, G. P.; COELHO, V. T. S.; GUIMARÃES, V. M. **α -Galactosidases production by *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. Food Science and Biotechnology, v. 20, n. 3, p. 601-606, 2011.
- VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; MARQUES, V. M.; TREVIZANO, L. M.; PASSOS, F. M.L.; OLIVEIRA, M. G. A.; BEMQUERER, M. P.; OLIVEIRA, J. S.; GUIMARÃES, V. M. **Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 54, n. 6, p. 2385-2391, 2006.
- VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; PASSOS, F. M. L.; OLIVEIRA, J. S.; TEIXEIRA, K. N.; SANTOS, A. M. C.; BEMQUERER, M. P.; ROSA, J. C.; SANTORO, M. M.; GUIMARÃES, V. M. ***Debaryomyces hansenii* UFV-1 intracellular α -galactosidase characterization and comparative studies with the extracellular enzyme**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 57, n. 6, p. 2515-2522, 2009.
- VIDY, C. H.; KUMAR, B. S. G.; CHINMAYEE, C. V., SINGH, S. A. **Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori***. International journal of biological macromolecules, v. 156, p. 885-895, 2020.
- WAGNER, J. R.; BECKER, R.; GUMBMANN, M. R.; OLSON, A. C. **Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue**. The Journal of Nutrition, v. 106, n. 4, p. 466-470, 1976.
- WANG, J.; YANG, X.; YANG, Y.; LIU, Y.; PIAO, X.; CAO, Y. **Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* YZ1 and its application in hydrolysis of raffinose family oligosaccharides from soymilk**. International journal of biological macromolecules, v. 158, p. 708-720, 2020.

CAPÍTULO 3

**TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE DE
DEBARYOMYCES HANSENII UFV-1 E HIDRÓLISE DOS
OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM PRODUTO DE SOJA PELA
ENZIMA IMOBILIZADA**

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos que atendem às necessidades da indústria devido à sua alta especificidade, seletividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Em contrapartida, a utilização da enzima na sua forma livre não permite separá-la do meio em que se encontra, além de estar sujeita à desnaturação e inativação. No intuito de contornar essas limitações, a imobilização enzimática vem sendo utilizada (BASSO & SERBAN, 2019). Enzimas imobilizadas são definidas como aquelas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas (HASSAN, et al., 2019). A imobilização protege a enzima de tensões ambientais como temperatura, pH, solventes e inibidores, além de oferecer vantagens como capacidade de reutilização, operação contínua dos processos e em alguns casos ocorre a melhoria das propriedades enzimáticas, como estabilidade e atividade (PEREIRA, 1999).

Os principais métodos disponíveis de imobilização de enzimas são: aprisionamento, encapsulamento, adsorção, ligação covalente e reticulação (WAHBA & HASSAN, 2015). Embora não exista uma matriz universal, algumas características como resistência à compressão e ao ataque microbiano, hidrofiliidade, inércia em relação a enzimas, biocompatibilidade, fácil acesso e baixo custo devem ser encontradas em qualquer material considerado como suporte ou matriz de imobilização. A escolha adequada de uma matriz ou suporte garante a eficácia do sistema de imobilização, preservando a atividade e a estabilidade da enzima (DU, et al., 2019; ZDARTA, et al., 2018; BAYAZIDI, et al., 2018).

A fabricação de materiais enzimaticamente ativos por tecnologia de imobilização amplia a perspectiva de aplicação tanto do biocatalisador quanto do biomaterial utilizado como suporte. Nos últimos anos, os biopolímeros derivados naturalmente têm atraído grande atenção das indústrias devido à sua abundância e às propriedades versáteis como biodegradabilidade, flexibilidade, biocompatibilidade, renovabilidade, disponibilidade de numerosos sítios reativos para incorporar novas funcionalidades e não toxicidade. A utilização de biopolímeros apresenta diversas vantagens em termos de estabilidade e melhor desempenho biocatalítico, fornecendo um microambiente biocompatível ao redor da enzima para tendências de reações ideais (BILAL & IQBAL, 2019). Um outro tipo de suporte que oferece baixa toxicidade e fácil separação por campo magnético externo são

as partículas magnéticas que devido às suas grandes áreas superficiais e propriedades físico-químicas únicas, permitem maior carga enzimática. Além disso, permitem um revestimento homogêneo da enzima e possibilidade de co-imobilização (RHIM, et al., 2013).

É importante destacar que as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em diversas aplicações industriais, como na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose, na clarificação de sucos, além da possibilidade de serem utilizadas em embalagens de alimentos, que é a perspectiva de aplicação para prolongar a vida útil e melhorar a qualidade dos alimentos embalados. Ademais, na indústria de alimentos, a enzima imobilizada pode ser utilizada em batelada ou processos contínuos, o que é uma de suas vantagens em relação a enzimas em solução (ÇELEM & ÖNAL, 2022; PRAMANIKI, et al., 2019; DATTA, et al., 2013; RHIM, et al., 2013; NESTORSON, et al., 2008).

Neste contexto, a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 foi imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas, utilizando a imobilização do tipo microencapsulação e ligação covalente, respectivamente. Embora a enzima imobilizada em partículas magnéticas não tenha sido utilizada na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose, vale ressaltar que esse tipo de imobilização é muito interessante, visto que o suporte pode ser separado do meio no qual se encontra através da aplicação de um campo magnético externo. Além disso, vale destacar que atualmente há poucos relatos na literatura utilizando a imobilização de α -galactosidase em partículas magnéticas. A escolha da enzima imobilizada em alginato de cálcio para aplicação na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em leite de soja comercial, foi feita devido à facilidade da técnica, baixo custo e não toxicidade do suporte em alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Imobilizar α -galactosidase extracelular produzida por *Debaryomyces hansenii* UFV-1, utilizando diferentes técnicas de imobilização, caracterizar bioquimicamente as enzimas imobilizadas, e aplicar a enzima imobilizada em produtos de soja para hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose.

2.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e em partículas magnéticas
- Realizar a caracterização da enzima imobilizada, avaliando o efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima;
- Aplicar e comparar as propriedades da α -galactosidase imobilizada em produto de soja;
- Determinar o teor de oligossacarídeos de rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. METODOLOGIA

3.1 Imobilização da α - galactosidase extracelular em alginato de cálcio

O protocolo utilizado para a imobilização da enzima α - galactosidase secretada por *D. hansenii* UFV-1 foi o mesmo descrito por KATROLIA, et al., (2019), com algumas modificações. Foram misturados 2,0 mL da enzima parcialmente purificada com 4,0 mL da solução de alginato de sódio em uma determinada proporção. Essa mistura foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma seringa hipodérmica, em 12 mL da solução de CaCl_2 para a formação das esferas de alginato de cálcio contendo a enzima imobilizada, que permaneceram na solução de CaCl_2 a 4 °C, no intuito de promover a formação do retículo. As esferas de alginato de cálcio foram mantidas em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, a 4 °C.

3.1.1 Determinação da atividade enzimática de α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio

Para a realização do ensaio de atividade da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio, foi utilizado o substrato sintético pNP α Gal (4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo). As misturas das reações continham a enzima imobilizada em alginato de cálcio, 250 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μL da solução pNP α Gal 2 mM, diluído em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi realizada à 40 °C, por 30 minutos, e foi interrompida pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 0,5 M. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 410 nm. A curva padrão foi construída com a solução de p- nitrofenolato em diferentes concentrações. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de pNP, por minuto, nas condições de ensaio.

3.1.2 Efeito das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio na atividade de α -galactosidase

Para avaliar o efeito das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio utilizadas durante a formação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase, foram testadas as concentrações de 3 % (m/v) de alginato com 2 % (m/v) de CaCl_2 (KATROLIA, et al., 2019) e 2 % (m/v) de alginato com 0,1 M de CaCl_2 (JÚNIOR, et al., 2009). Após a formação das esferas, a atividade da α -galactosidase foi quantificada conforme o item 3.1.1. Para a expressão dos resultados, foi realizado o cálculo do rendimento relativo da atividade de α -galactosidase imobilizada, de acordo com a equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{Atividade da enzima imobilizada} / \text{atividade da enzima solúvel}) \times 100.$$

O estudo da relação alginato: cloreto de cálcio foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.1.3 Efeito da relação enzima: alginato na atividade de α - galactosidase

Para estudar o efeito da relação enzima: alginato utilizada durante a formação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase, foram testadas as proporções de 2 mL da enzima para cada 2 e 4 mL do alginato na concentração de 3 % (m/v). Após a formação das esferas, a atividade da α -galactosidase foi quantificada conforme o item 3.1.1.

O estudo da relação enzima: alginato foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.1.4 Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase

Depois de formadas, as esferas de alginato de cálcio foram mantidas em solução de CaCl_2 2 % (m/v) por 12 e 24 horas. As esferas foram então lavadas e armazenadas no

tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A determinação da atividade da α -galactosidase foi realizada conforme descrito no item 3.1.1.

O estudo do tempo de reticulação foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.1.5 Efeito do número de esferas de alginato de cálcio ensaiadas na atividade de α -galactosidase

Para melhor quantificação da atividade α -galactosidase contida nas esferas, foram testados diferentes números de esferas de alginato de cálcio no ensaio de atividade enzimática. Assim, foram testadas 2, 4 e 6 esferas sendo que o ensaio seguiu os mesmos passos do item 3.1.1.

O estudo do número de esferas de alginato de cálcio a serem ensaiadas foi feito por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.1.6 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase

Para avaliar o efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas esferas de alginato de cálcio, o ensaio de atividade enzimática com o substrato sintético pNP α Gal, descrito no item 3.1.1 foi realizado sob agitação manual lenta e sob nenhuma agitação, utilizando-se um banho termostático.

O estudo do efeito da agitação foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.2 Imobilização da α -galactosidase extracelular em partículas magnéticas

A síntese das partículas magnéticas foi realizada de acordo com a metodologia de FARTA, 2022. Para a síntese de magnetita foi pesado 8,109 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4,170 g de FeSO_4 e adicionado em 400 mL de água destilada. Essa solução foi mantida a um aquecimento de 60 °C sob agitação e gás nitrogênio durante 30 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 18,75 mL de NH_4OH 28 % à mistura e observou-se que a solução de alaranjada se tornou preta, coloração característica da magnetita. Em seguida completou-

se o volume para 500 mL com água destilada, mantendo a solução sob o nitrogênio e aquecimento a 60 °C por 20 minutos. A solução foi separada por decantação magnética e lavou-se o precipitado com água destilada 3x; posteriormente a solução foi armazenada em geladeira.

Para a obtenção da sílica com centro de partículas magnéticas foram misturados 50 mL de álcool etílico 95 % P.A, 1 mL de água destilada e 1,5 g do produto obtido no processo anterior e a solução foi submetida ao sonificador por 30 minutos. Em um béquer separado, foram misturados 1,5 mL de TEOS (tetraetoxissilano) e 2 mL de NH₄OH 28 %, mantidos sob agitação à 40 °C durante 20 minutos. Posteriormente, a mistura de amônia e TEOS foi adicionada juntamente com as partículas de ferro e essa solução foi mantida sob agitação por 6 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo de agitação, a solução foi lavada com álcool etílico 95 % consecutivamente e isolada por separação magnética

Para a adição de grupamentos amino na sílica com centro de partículas magnéticas, foram adicionados 2 mL de APTES (3-Aminopropyl-triethoxisilano) no material decantado obtido pelo processo anterior, que foi mantido sob agitação por 12 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi lavada 3x com tampão acetato de sódio 50 Mm pH 5,0 por 3x e o material isolado por separação magnética.

Posteriormente, foram adicionados 60 mL de glutaraldeído 2 % (v/v) a 25 °C nas partículas obtidas no processo anterior e estas mantidas sob agitação durante 2 horas. Por conseguinte, a solução foi lavada 3x com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e o material decantado obtido constitui as partículas prontas para serem utilizadas na imobilização.

Após todo este procedimento descrito, as partículas magnéticas foram pesadas e colocadas em contato com 1 mL da solução da enzima α -galactosidase parcialmente purificada. Posteriormente, enzima e as partículas foram deixadas no gelo durante um determinado tempo e, após esse tempo de contato, a atividade da α -galactosidase foi quantificada conforme o item 3.2.1.

3.2.1 Determinação da atividade enzimática de α -galactosidase extracelular imobilizada em partículas magnéticas

Para a realização do ensaio de atividade da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada em partículas magnéticas, foi utilizado o substrato sintético pNP α Gal (4-

nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo). As misturas das reações continham as partículas magnéticas contendo a enzima α -galactosidase extracelular, 250 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L da solução pNP α Gal 2 mM, diluído em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi realizada à 40 °C, por 30 minutos, e foi interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ 0,5 M. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 410 nm. A curva padrão foi construída com a solução de p- nitrofenolato em diferentes concentrações. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de pNP, por minuto, nas condições de ensaio.

3.2.2 Efeito da relação enzima: partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase

Para estudar o efeito da relação enzima: partículas magnéticas durante o processo de imobilização na atividade da α -galactosidase, foram testadas proporções de 0,15; 0,3; 0,6 e 1,0 grama de partículas para cada 1 mL da solução da enzima parcialmente purificada. Após a imobilização, a atividade da α -galactosidase foi quantificada conforme o item 3.2.1. Para a expressão dos resultados, foi realizado o cálculo da eficiência relativa da atividade de α -galactosidase imobilizada, de acordo com a equação 2:

Eficiência de imobilização (%) = (Atividade da enzima imobilizada / atividade da enzima solúvel) x 100.

O estudo da relação enzima: partículas foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.2.3 Efeito da relação entre o tempo de contato da enzima com as partículas na atividade de α -galactosidase

Para estudar o efeito da relação do tempo de contato da enzima com as partículas na atividade da α -galactosidase durante o processo de imobilização, a mistura foi deixada no gelo por diferentes tempos: 0,5; 2; 4 e 12 horas. Após a imobilização, a atividade da α -galactosidase foi quantificada conforme o item 3.2.1.

O estudo da relação do tempo de contato da enzima com as partículas no gelo foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.2.4 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase

Para avaliar o efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas partículas magnéticas, o ensaio de atividade com o substrato sintético pNP α Gal, descrito no item 3.2.1 foi realizado sob agitação manual lenta e sem agitação, utilizando-se um banho termostático.

O estudo do efeito da agitação no ensaio de atividade de α -galactosidase contida nas partículas magnéticas foi realizado por comparação dos dados relativos às médias das atividades enzimáticas utilizando ANOVA seguida do teste Tukey para médias ($\alpha=0,05$) no software Minitab.

3.3 Caracterização enzimática

3.3.1 Efeito do pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade da α -galactosidase imobilizada, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.1.1 e 3.2.1, exceto que o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH utilizando-se tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921), na faixa de 2,2 a 8,0.

3.3.2 Efeito da Temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase imobilizada, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.1.1 e 3.2.1, exceto que o ensaio foi realizado em diferentes temperaturas compreendidas entre 30 e 80 °C.

3.3.3 Análise de Termoestabilidade

A estabilidade térmica da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas foi testada em duas temperaturas, 50 e 60 °C, por 0, 1, 2, 3, 4 e 10 horas. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para atividade foram conduzidos como descrito no item 3.1.1 e 3.2.1 sendo a atividade enzimática de α -galactosidase da enzima imobilizada no tempo 0 considerada como 100 %.

Também foi determinada a estabilidade da enzima imobilizada durante 5, 15 e 30 dias à temperatura ambiente (25° C) e na temperatura de 4 °C. As atividades da enzima foram determinadas conforme descrito no item 3.1.1 e 3.2.1, sendo a atividade enzimática de α -galactosidase da enzima imobilizada no tempo 0 considerada como 100 %.

3.4 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio

Para o teste de hidrólise dos ROs em leite de soja comercial, alíquotas de 5 mL do leite de soja ADES, obtido do mercado local, foram transferidas para Erlenmeyers de 25 mL. Foram utilizadas 100 esferas de alginato de cálcio contendo a enzima α -galactosidase extracelular purificada, o que correspondeu à concentração de 0,02 U de enzima, em triplicata. O controle foi feito nas mesmas condições, porém, utilizando 100 esferas de alginato de cálcio contendo somente tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. As misturas foram incubadas em shaker a 100 rpm, por 4 e 6 h, à 50 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 25900 g, por 30 minutos, a 4 °C, descartando-se o precipitado, e o sobrenadante foi usado para determinação da porcentagem de hidrólise dos ROs.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos ROs presentes no leite de soja, essas preparações foram liofilizadas e os ROs extraídos de 20 mg do pó obtido. Os teores de ROs determinados nos extratos tratados com a enzima imobilizada foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

3.5 Extração de ROs

A extração de ROs do leite de soja após o tratamento enzimático foi conduzida como descrito por Saravitz et al (1987), com modificações. Também foi realizada a extração dos ROs em leite de soja não tratado, para controle. Foram pesados 20 mg das amostras liofilizadas em tubos tipo eppendorf para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo presente nas amostras foi retirada com 4 extrações utilizando 1 mL de éter petróleo a 42 °C, por 5 minutos. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 minutos. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga Eppendorf modelo 5415 D, 14.000 g, por 20 minutos. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C e, após 24 horas, os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e as amostras foram centrifugadas a 14000 g, durante 20 minutos, filtradas em membranas de 0,45 µm de diâmetro armazenadas à - 20° C, para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.6 Determinação do teor de oligossacarídeos de rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os ROs extraídos do leite de soja tratados e não tratados enzimaticamente foram analisados por HPLC em cromatógrafo Shimadzu série 20 A (Kyoto, Japão), equipado com detector de índice de refração RID-20A (Shimadzu, Kyoto, Japão), uma coluna GIST NH2 (Shimadzu, Kyoto, Japão) de aço inox (4,6 x 250 mm) contendo como fase estacionária o grupo aminopropil (-NH₂). A mistura acetonitrila-água (75:25) em condições isocráticas constituiu a fase móvel. As análises foram realizadas a 35 °C sob o fluxo de 1mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. As soluções padrões glicose, frutose, galactose, sacarose, rafinose e estaquiose foram preparadas nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L. Cada solução foi injetada no cromatógrafo para a obtenção das curvas padrão, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com

os tempos de retenções e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de HPLC, equipado com o programa LC Solutions versão 7 para Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito das concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio na atividade de α -galactosidase

A Tabela 17 mostra que não houve diferença significativa na atividade enzimática de α -galactosidase após o processo de imobilização utilizando as diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio.

Tabela 17 – Atividade enzimática de α -galactosidase utilizando diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio.

Concentração de alginato (%)	Atividade enzimática (U/bead)	Concentração de CaCl ₂ (%)	Atividade enzimática (sobrenadante) (U/mL)
2	0,00033 $\pm$ 0,0002 A	1	0,02340 $\pm$ 0,0010 A
3	0,00027 $\pm$ 0,0004 A	2	0,02336 $\pm$ 0,0012 A

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Antes da imobilização, a atividade de α -galactosidase era 0,506 U e, após a imobilização, a atividade foi de 0,0732 U (valor obtido multiplicando a atividade de 0,0003 U/bead pelo número de beads formadas, que neste caso foram 244) e 0,069 U (valor obtido multiplicando a atividade de 0,0003 U/bead pelo número de beads formadas, que neste caso foram 230), correspondendo a um percentual de imobilização de 14,5 e 13,6 %, respectivamente, ao utilizar as concentrações de 3 % de alginato de sódio e 2 % de CaCl₂ e 2 % de alginato de sódio e 0,1 M de CaCl₂.

A α -galactosidase de *A. oryzae*, ao ser imobilizada em alginato de sódio na concentração de 3 %, obteve um rendimento de imobilização de 45,5 %, porém, vale destacar que neste estudo o glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante (NAGANAGOUDA & MULINAMI, 2006). É possível observar que a atividade de α -galactosidase reduziu após o processo de imobilização, e isso pode estar relacionado com as baixas taxas de difusão do substrato e do produto pela malha formada (FLORIDO, et al., 2001; JORDÃO, et al., 2001). Ou seja, devido ao alto grau de reticulação da rede tridimensional do alginato de cálcio, o acesso do substrato à enzima, bem como a formação do produto, se tornam mais difíceis, visto que o gel de alginato funciona como uma barreira para o acesso do substrato à enzima e para a saída do produto ao meio reacional. Além disso, a imobilização em alginato apresenta desvantagens como a lixiviação da enzima da matriz, devido à alta porosidade do polímero (SHANKAR, et al., 2011). Alguns autores relatam o uso de glutaraldeído 1 % para evitar esse tipo de problema (PRASHANTH & MULINAI, 2005), no entanto, essa desvantagem pode ser recompensada pela reutilização da enzima imobilizada.

É possível observar que a imobilização da α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio resultou em 85,5 e 86,4 % de perda de atividade da enzima, utilizando 3 % de alginato de cálcio e 2 % de CaCl_2 e 2 % de alginato e 0,1 M de CaCl_2 , respectivamente. Ao imobilizar a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* utilizando o alginato de sódio na concentração de 3 %, a perda de atividade foi de 54,5 % (PRASHANTH & MULINAI, 2005). JÚNIOR, et al., (2009) também relatam que, ao imobilizar as células de *D. hansenii* UFV-1 em alginato de sódio na concentração de 2 % e 0,1 M de cloreto de cálcio, obtiveram uma redução de 20 vezes na atividade de α -galactosidase. Foi verificado que um maior rendimento de α -galactosidase de *Streptomyces griseolobus* foi obtido ao utilizar o alginato de sódio na concentração de 3 %, pois concentrações mais baixas de alginato levaram à formação de esferas mais frágeis com maior chance de ocorrer a lixiviação da enzima para o meio (ANISHA & PREMA, 2008). Além disso, vale ressaltar que a concentração ideal de alginato de sódio pode diferir em relação ao produto de interesse e ao organismo (NAMPOOTHIRI & PANDEY, 1998). A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que não houve diferença na atividade da enzima imobilizada após o processo de imobilização ao utilizar 3% de alginato e 2% de CaCl_2 e 2% de alginato e 0,1 M de CaCl_2 . Com isso, no intuito de evitar a lixiviação da enzima para o meio, bem como a formação de *beads* mais frágeis, visto que essas teriam que ser resistentes para posterior aplicação biotecnológica,

foi escolhida a condição de maior concentração de alginato de sódio, que neste caso foi de alginato de sódio 3 % e CaCl_2 2 %.

4.1.1 Efeito da relação enzima: alginato na atividade de α -galactosidase

Antes do processo de imobilização, a atividade enzimática de α -galactosidase era de 0,5 U e, após a imobilização, utilizando as proporções de 1:1 e 1:2 de enzima e de alginato de sódio, a atividade da enzima imobilizada foi de 0,056 e 0,0693 U, respectivamente. Isso é equivalente a um percentual de recuperação da atividade enzimática de 11,3 e 14 %, respectivamente, para as proporções de 1:1 e 1:2, de enzima e de alginato de sódio, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a estatística utilizando ANOVA seguido do teste Tukey para avaliar a atividade de U/bead das diferentes concentrações testadas (Tabela 18).

Tabela 18 – Atividade enzimática de α -galactosidase imobilizada (U/bead) utilizando diferentes concentrações de alginato de sódio (3%) e cloreto de cálcio 2%.

Concentração	Atividade enzimática (U/bead)
1:1	0,00040 $\pm$ 0,0001 _A
1:2	0,00036 $\pm$ 0,0002 _A

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi possível observar que, estatisticamente, os valores de atividade enzimática (U/bead) não diferiram entre si. No entanto, a proporção de 1:2 foi escolhida, visto que esta condição resultou na formação de uma maior quantidade de beads contendo a enzima imobilizada, o que é vantajoso para a aplicação industrial, pois quanto mais enzima atuando sobre o substrato, provavelmente maior será o percentual de hidrólise obtido (ENRÍQUEZ, et al., 2022).

Ao imobilizar as células de *D.hansenii* UFV-1 utilizando as proporções de 1 grama de alginato de sódio para 4 gramas de células, foi observado que ocorreu uma redução de 20 vezes na atividade da α -galactosidase (JÚNIOR, et al., 2009). Outro estudo demonstrou que, ao imobilizar α -galactosidase de *A. oryzae*, a proporção de 4 mL de

alginate de sódio para 1 mL de enzima levou à perda de 54,5 % da atividade da α -galactosidase (PRASHANTH & MULINAI, 2005).

4.1.2 Efeito do tempo de reticulação das esferas de alginato de cálcio na atividade de α -galactosidase

Após a formação das esferas de alginato, estas foram mantidas em solução de cloreto de cálcio 2 %, por 2 e 12 horas, para formação da rede tridimensional do gel de alginato de cálcio, e os valores de atividade enzimática podem ser visualizados na Tabela 19.

Tabela 19 – Efeito do tempo de reticulação na atividade de α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1

Tempo de reticulação (h)	Atividade enzimática (U/bead)
2	0,00033 $\pm$ 0,0005 A
12	0,00020 $\pm$ 0,0012 B

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como observado, a atividade enzimática foi melhor quando o tempo de reticulação foi menor. Segundo JUNIOR, et al., (2009) quanto maior o tempo de reticulação em cloreto de cálcio, maior a estabilidade das esferas de alginato, devido ao fortalecimento da rede tridimensional do gel formado. Em contrapartida, a obtenção de uma atividade enzimática maior em apenas 2 horas de reticulação é vantajosa, pois está associada à economia de tempo e energia, visto que, durante o processo de reticulação é necessário que haja agitação constante, e isso só é possível através da utilização de um agitador magnético elétrico.

4.1.3 Efeito do número de esferas de alginato de cálcio ensaiadas na atividade de α -galactosidase

A Tabela 20 mostra os valores de atividade da α -galactosidase imobilizada com a utilização de 2, 4 e 6 esferas de alginato de cálcio no ensaio de atividade enzimática.

Tabela 20 - Efeito do número de esferas de alginato ensaiadas na atividade da α -galactosidase

Número de esferas	Atividade enzimática (U/bead)
2	0,0003667 $\pm$ 0,00011 A B
4	0,0004000 $\pm$ 0,00020 A
6	0,0003000 $\pm$ 0,00012 B

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pela análise da Tabela 20 foi possível observar que ao utilizar 4 e 6 esferas de alginato, as atividades enzimáticas foram estatisticamente iguais à condição que utilizou 2 esferas. A utilização de quatro esferas no ensaio enzimático fornece mais vantagens em relação à utilização de duas esferas, uma vez que, quanto maior o número de esferas contendo a enzima imobilizada, maior será o contato entre enzima e substrato, o que consequentemente gerará uma maior quantidade de produto formado. Além disso, pode-se observar que a atividade enzimática obtida pela utilização de quatro esferas foi maior quando se utilizou seis esferas. Assim, adotou-se 4 esferas como sendo o número ideal para a realização dos ensaios de atividade de α -galactosidase. Outro estudo demonstrou que 4 esferas de alginato de cálcio contendo células de *D. hansenii* UFV1 também foram utilizadas para quantificar a atividade de α -galactosidase (JÚNIOR, 2009).

4.1.4 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio

Para avaliar o efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas esferas de alginato de cálcio, foi realizado o ensaio com agitação e sem agitação e os valores de atividade enzimática são observados na Tabela 21.

Tabela 21 - Efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas esferas de alginato

Condição do ensaio	Atividade enzimática (U/bead)
Sem agitação	0,0003940 $\pm$ 0,00003 A
Com agitação	0,0004197 $\pm$ 0,0002 A

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A atividade de α -galactosidase imobilizada não apresentou diferenças quando o ensaio foi realizado com agitação e em repouso. Geralmente, a agitação favorece a entrada do substrato e a saída do produto das esferas de alginato de cálcio (JUNIOR, 2006). No entanto, no presente estudo o ensaio realizado em agitação não repercutiu em maiores valores de atividade de α -galactosidase, provavelmente devido ao fato da agitação ter sido realizada manualmente, não fornecendo uma condição homogênea para o sistema e, conseqüentemente, não garantindo o maior acesso do substrato à enzima, bem como a maior formação do produto.

4.2 Caracterização enzimática da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio

4.2.1 Efeito do pH

A Figura 10 mostra que atividades de α -galactosidase consideráveis, acima de 80 %, foram determinadas na faixa de pH entre 2,2 e 4,6; em pH 5,0 e 5,6 ocorre um aumento de atividade de mais de 90 %. O valor de atividade máxima foi encontrado em pH 6,0 e,

posteriormente, a atividade enzimática reduz nas demais faixas entre 6,6 e 7,0, com um seguido aumento nos valores de pH 7,6 e 8,0.

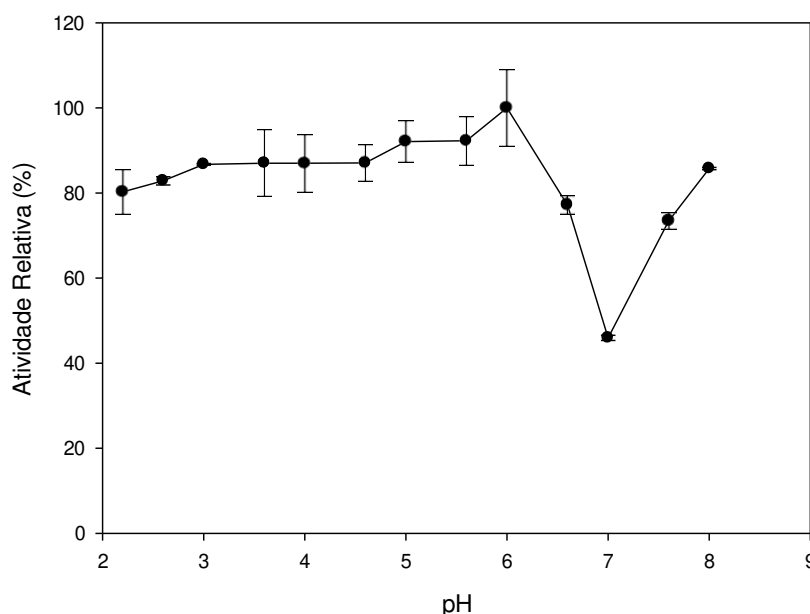


Figura 10 – Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio.

Pela análise da Figura 10 foi possível observar que a enzima imobilizada apresentou atividade enzimática em faixas de pH ácido, com uma atividade ótima em pH 6,0, ao contrário, da enzima livre que foi 4,0. Enzimas imobilizadas em alginato de cálcio geralmente podem apresentar valores de pH ótimos mais ácidos em relação ao da enzima livre, e esse fato pode ser explicado em parte pela presença de cargas positivas de Ca^{+2} no suporte (JÚNIOR, et al., 2009). As *beads*, ou hidrogéis de alginato com formato esférico de escala macroscópica, são formadas quando o alginato dissolvido com a enzima líquida entra em contato com uma solução contendo cátions divalentes como o Ca^{2+} . Em relação à reticulação, os íons Ca^{2+} interagem com os blocos G do alginato, levando à formação de uma estrutura *eggs-box* (“caixa de ovo”) (MARTINS, et al., 2017). Posteriormente, foi possível observar que, ao ser submetida a faixas de pH próximas da neutralidade, a atividade enzimática reduziu. Provavelmente, nessas faixas, a enzima sofreu alguma alteração no padrão de cargas (KAISER, 2012).

JÚNIOR, et al., 2009 ao imobilizar as células contendo α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio, verificou que o pH ótimo foi 4,0, enquanto das células não imobilizadas foi 4,5. Em outros estudos, a enzima α -galactosidase de *A.*

oryzae na sua forma livre e imobilizada em alginato de cálcio alcançou pH ótimo de 4,0 (KATROLIA, et al., 2019). Em contraste, neste estudo o pH ótimo da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio foi 6,0, e o da enzima livre foi 4,0, o que é algo vantajoso especialmente visando a aplicação da enzima imobilizada na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose no leite de soja, visto que o pH deste produto é de 6,4 – 6,8.

4.2.2 Efeito da Temperatura

A Figura 11 mostra que a atividade enzimática da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio foi de 40 e 70 %, nas temperaturas de 30 e 40 °C, respectivamente, e a temperatura de máxima atividade foi 50 °C. Em seguida, foi obtido uma atividade de 45 % na temperatura de 60 °C. Em temperaturas acima de 60 °C foi observado um decréscimo acentuado na atividade enzimática e esta foi nula nas temperaturas de 70 e 80 °C.

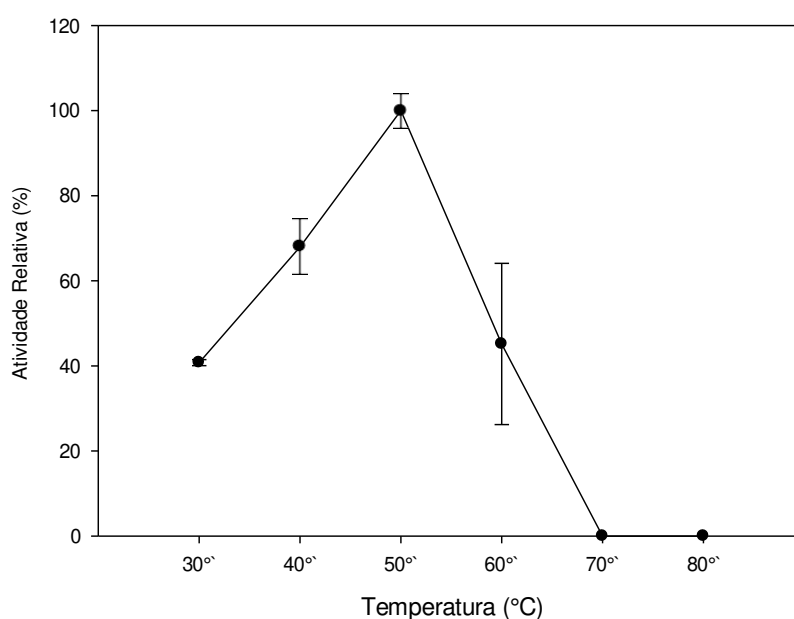


Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio.

Foi verificado que a α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 contida nas células imobilizadas em alginato de cálcio apresentou temperatura ótima de 70 °C, enquanto a enzima contida nas células livres apresentou máxima atividade em 60 °C (JÚNIOR, et al., 2009). A α -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em alginato de cálcio apresentou temperatura ótima a 57 °C, enquanto para a enzima livre a máxima atividade se deu em

50 °C (PRASHANTH & MULINAI, 2005). Com a imobilização, espera-se que a temperatura ótima da enzima aumente, visto que o sítio ativo fica protegido da desnaturação pelo calor. No entanto, no presente estudo este fato não foi observado, pois a enzima imobilizada apresentou temperatura ótima a 50 °C e a livre a 60 °C. Em um estudo realizado por KATROLIA, et al., (2019), a α -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em alginato de cálcio apresentou temperatura ótima em 45 °C, enquanto a enzima livre teve máxima atividade em 50 °C. Embora a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio não tenha apresentado temperatura ótima maior em relação à sua forma livre, vale ressaltar que sua aplicação na forma imobilizada também apresenta potencial em aplicações industriais, principalmente devido às possíveis reutilizações da enzima imobilizada.

4.2.3 Análise de Termoestabilidade

A Figura 12 mostra que a α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio manteve 84, 56, 37, 34 e 7,4 % de sua atividade original quando pré-incubada a 50 °C nos tempos 1, 2, 3, 4 e 10 h, respectivamente. Na temperatura de 60 °C, a α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio manteve 78, 54, 36, 35 e 6,3 % de sua atividade original nos tempos 1, 2, 3, 4 e 10 h, respectivamente.

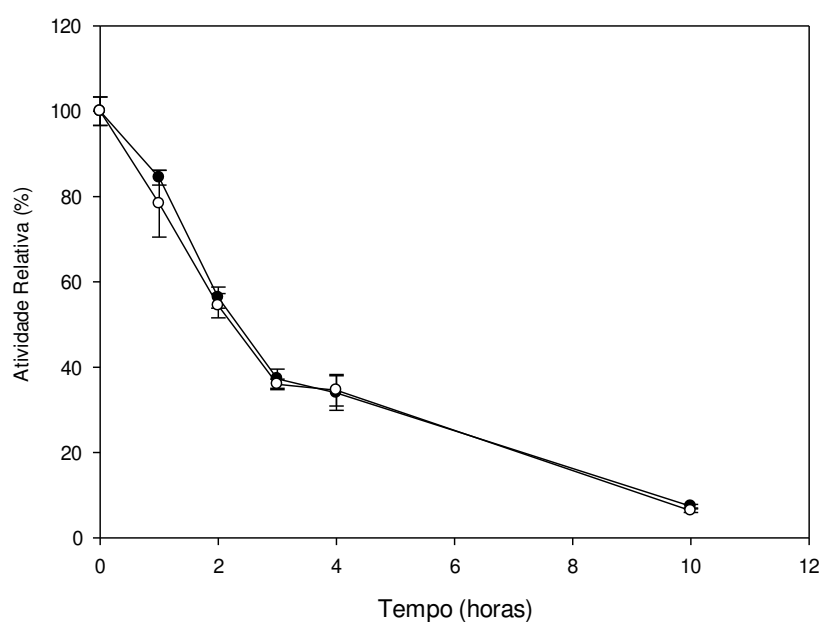


Figura 12: Efeito da temperatura na estabilidade de α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio. As amostras enzimáticas foram pré-

incubadas nas temperaturas de 50 °C (—●—) e 60 °C (—○—). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A partir da análise da Figura 12 observou-se que, com o decorrer do tempo, a atividade da enzima imobilizada reduziu e isso provavelmente pode ser devido ao extravasamento da enzima do sistema, visto que uma das desvantagens da imobilização em alginato é a lixiviação da enzima da matriz, devido à alta porosidade do polímero (SHANKAR, et al., 2011).

Foi possível observar que nas temperaturas de 50 e 60 °C, a atividade de α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio reduziu com o decorrer do tempo. A α -galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1 imobilizadas em alginato de cálcio apresentou aumento na atividade quando incubada a 60 e 70 °C, em vários períodos de tempo. Além disso, mesmo após 72 horas de incubação a 60 e 70 °C, a atividade da α -galactosidase contida nas células imobilizadas foram de 113 e 57 %, respectivamente (JÚNIOR, et al., 2009). A α -galactosidase de *A. oryzae*, ao ser imobilizada em alginato de cálcio e incubada na temperatura de 50 °C, reteve 71, 92 e 94 % de atividade após 24, 12 e 8 horas de incubação, respectivamente (PRASHANTH & MULINAI, 2005).

Embora com o decorrer do tempo a α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio tenha se apresentado menos termooestável nas temperaturas de 50 e 60 °C do que a enzima livre, é importante destacar que nos tempos 2, 4 e 6 horas, a enzima ainda apresentava atividade enzimática, o que é compatível com os tempos de ensaio de hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em leite de soja.

Após o armazenamento da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio à temperatura ambiente (25 °C) foi possível observar que a enzima manteve 13,8, 9,1 e 7,1 % de sua atividade original durante 5, 15 e 30 dias, respectivamente. Em temperatura de refrigeração (4° C), a α -galactosidase imobilizada manteve 38,1, 21,1 e 21,2 % de sua atividade original durante 5, 15 e 30 dias, respectivamente (Figura 13).

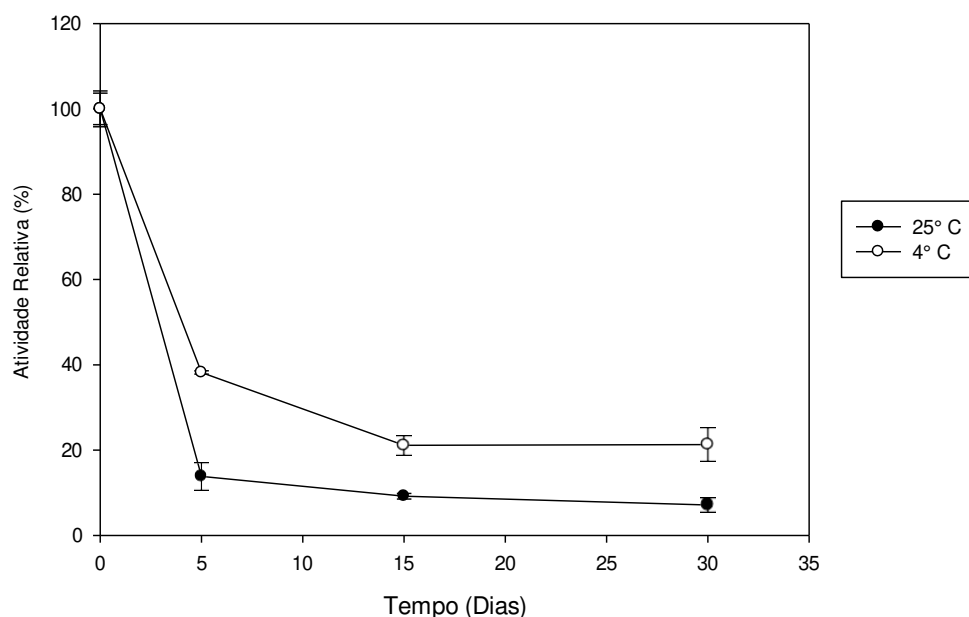


Figura 13 – Efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade de α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio. As amostras enzimáticas foram pré- incubadas nas temperaturas de 25 °C (—●—) e 4 °C (—○—). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

Foi possível observar que em temperaturas mais baixas, α -galactosidase apresentou atividades maiores. Foi verificado que a atividade da α -galactosidase contida nas células imobilizadas de *D. hansenii* manteve 89 % de sua atividade original quando armazenada à 4 °C, após 45 dias (JÚNIOR, 2006).

Apesar da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio ter apresentado redução na atividade enzimática, ressalta-se que esta enzima apresenta potencial na aplicação industrial, principalmente em temperaturas de refrigeração. Tal fato é de extrema importância, por exemplo, para uma possível aplicação que será realizada a longa distância, visto que, a enzima imobilizada consegue chegar até o comprador retendo 38 e 21 % de sua atividade com 5 e 15-30 dias de transporte, respectivamente. Embora esse fato seja uma desvantagem em aspectos econômicos, bem como exigindo mais cuidados com o armazenamento e transporte, vale destacar que essa limitação pode ser contornada pela possibilidade de reutilização da enzima.

4.3 Efeito da relação enzima: partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase

A Tabela 22 mostra que a maior atividade enzimática de α -galactosidase após a imobilização em partículas magnéticas foi obtida quando se utilizou 0,6 gramas de partículas magnéticas.

Tabela 22 – Atividade enzimática de α -galactosidase imobilizada utilizando diferentes quantidades de partículas magnéticas.

partículas magnéticas (g)	Atividade enzimática (U)
0,15	0,0053 $\pm$ 0,002 B
0,3	0,0063 $\pm$ 0,0005 B
0,6	0,0142 $\pm$ 0,0031 A
1,0	0,0062 $\pm$ 0,0004 B

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Antes da imobilização, a atividade enzimática era de 0,098 U e, após a imobilização, foi possível observar que a eficiência de imobilização foi de 5,4; 6,4; 14,5 e 6,3 %, utilizando 0,15; 0,3; 0,6 e 1,0 g de partículas magnéticas, respectivamente.

Foi possível observar que a α -galactosidase imobilizada apresentou baixa atividade enzimática. Deve-se ressaltar que maiores atividades enzimáticas são obtidas quando os aminoácidos do sítio ativo não estão envolvidos na ligação com o suporte. Além disso, a atividade da enzima imobilizada covalentemente depende da forma e do tamanho do suporte, composição do material e das condições específicas durante a imobilização (CAO, et al., 2005). Foi possível observar que com o aumento da quantidade de suporte, ou seja, quanto mais partículas magnéticas em gramas, maior foi a eficiência de imobilização. No entanto, observou-se uma redução na eficiência de imobilização ao aumentar a quantidade de partículas para 1 grama e, provavelmente, isso pode ser devido à grande quantidade de suporte para enzima, levando a uma perda na estabilidade enzimática.

A L-asparaginase de *E.coli* foi imobilizada em nanopartículas de ferro e obteve 60 % de eficiência de imobilização. Antes e após a imobilização as atividades obtidas

foram 10 e 6 U, respectivamente (ALAM, et al., 2021). A L-asparaginase de *Bacillus aryabhattai* foi imobilizada em nanopartículas de ferro e, ao utilizar 1 mL da enzima (72 U), foi possível observar uma eficiência de imobilização de 25,58 %. Após a imobilização a enzima apresentou 18,42 U utilizando 0,035 gramas de nanopartículas (ALAM, et al., 2018).

4.3.1 Efeito da relação entre o tempo de contato da enzima com as partículas magnéticas na atividade de α -galactosidase imobilizada

Durante o processo de imobilização em partículas magnéticas, o tempo de contato entre a α -galactosidase e as partículas magnéticas foi variado, no intuito de verificar qual seria o tempo que forneceria a melhor atividade da enzima imobilizada (Tabela 23).

Tabela 23 – Relação entre o tempo de contato enzima e partículas magnéticas e sua influência na atividade de α -galactosidase imobilizada

Tempo de contato enzima e partículas magnéticas (horas)	Atividade enzimática (U)
0,5	0,00610 $\pm$ 0,0004 A
2	0,00460 $\pm$ 0,0012 A
4	0,00535 $\pm$ 0,0001 A
12	0,00200 $\pm$ 0,0003 B

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que estatisticamente não houve diferença na atividade da enzima imobilizada para os tempos de 0,5; 2 e 4 horas. Com isso, foi determinado que durante o processo de imobilização, o tempo de contato entre a enzima e as partículas magnéticas seria 0,5 hora, o que fornece vantagens devido à economia de tempo. Em pouco tempo de contato entre a enzima e as partículas magnéticas observou-se atividade de α -galactosidase imobilizada, provavelmente devido ao tipo de ligação envolvida entre suporte e enzima, visto que a ligação covalente normalmente proporciona estabilidade à enzima (JOSEPH, et al., 2020).

Em contraste, durante o processo de imobilização de L-asparaginase de *Bacillus aryabhattai*, ALAM, et al., (2018) determinaram que o tempo de contato entre a enzima e as nanopartículas ocorresse *overnight*.

4.3.2 Efeito da agitação na determinação da atividade de α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas

Para avaliar o efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas partículas magnéticas, foi realizado o ensaio com agitação e sem agitação, e os valores de atividade enzimática são observados na Tabela 24.

Tabela 24 - Efeito da agitação sobre a atividade da α -galactosidase contida nas partículas magnéticas.

Condição do ensaio	Atividade enzimática (U)
Sem agitação	0,0054 $\pm$ 0,00040 ^A
Com agitação	0,0053 $\pm$ 0,00021 ^A

Estatística realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nesse tipo de imobilização realizada por ligação covalente, não é necessário que o substrato atravesse o suporte para então alcançar o sítio ativo da enzima, visto que a enzima aderida ao suporte fica em contato direto com o substrato; logo, os fatores repouso e agitação não interferiram na atividade da enzima imobilizada.

4.4 Caracterização Enzimática da α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas

4.4.1 Efeito do pH

A Figura 14 mostra atividades de α -galactosidase imobilizada consideráveis, acima de 85 %, na faixa de pH entre 2,2 e 2,6. Atividades acima de 92 % foram encontradas entre os valores de pH 3,0 e 6,0. O valor de atividade máxima foi encontrado

em pH 4,0. Em pH 6,6 a atividade relativa foi de 89 %, e a atividade de α -galactosidase imobilizada ficou abaixo de 77 % na faixa de pH compreendida entre 7,0 e 8,0.

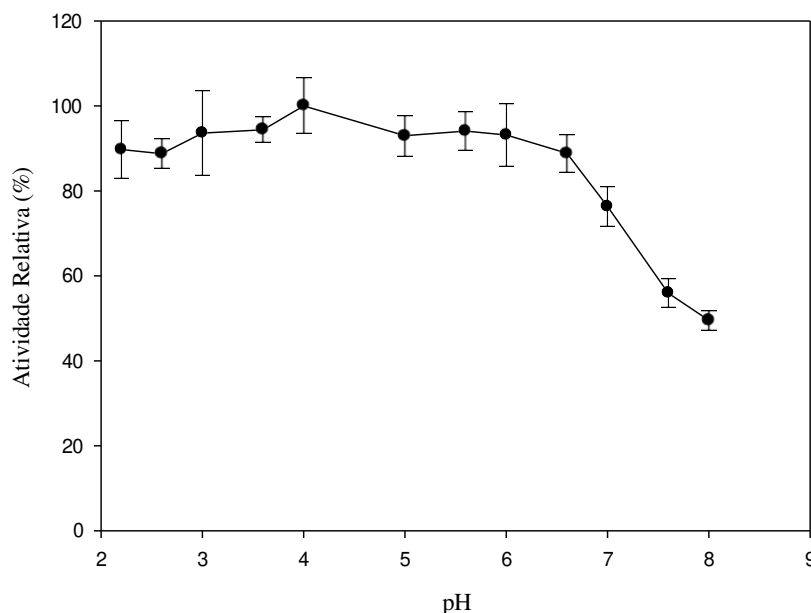


Figura 14 – Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas.

É possível observar que a α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas apresentou atividade em uma ampla faixa de pH e, além disso, apresentou maior estabilidade nos valores de pH testados do que a enzima livre. Ademais, sua atividade máxima foi encontrada em pH 4,0, sendo o mesmo da enzima livre.

A maior estabilidade da α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas em relação à enzima livre, em diferentes faixas de pH, provavelmente se deve ao fato da ligação covalente realizada entre enzima e suporte, que pode ter restringido mudanças conformacionais, levando assim a uma maior atividade relativa em uma ampla faixa de pH (CHENG, et al., 2020). De modo geral, o comportamento da enzima é afetado pelo microambiente ao redor do sítio ativo e os pH ótimos das enzimas imobilizadas podem mudar devido às propriedades (cargas residuais e superfície) da matriz sólida e da enzima ligada (SINGH, et al., 2014; MOSAFA, et al., 2013). Além disso, observou-se que a enzima apresentou maiores atividades enzimáticas em valores de pH ácidos, com posterior redução em faixas próximas do pH alcalino. Isso provavelmente ocorreu, pois, o pH pode alterar o estado de ionização dos aminoácidos ácidos ou básicos na proteína,

levando a uma alteração na estrutura tridimensional da enzima e acarretando, consequentemente, na desnaturação e/ou inativação enzimática (KAISER, 2012).

A α -galactosidase de *Vigna mungo* imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana apresentou pH ótimo de 4,0 e maiores atividades enzimáticas em relação à enzima livre nas faixas de pH entre 3,0 e 6,0 (JOSEPH, et al., 2020).

A lacase de *R. vernicifera*, ao ser imobilizada em nanopartículas magnéticas de cobre, apresentou pH ótimo de 4,0 (PATEL, et al., 2023). A lipase de *Candida rugosa*, quando imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, manteve sua atividade em todas as faixas de pH testadas (3,0 a 11,0) (KUO, et al., 2012).

4.4.2 Efeito da Temperatura

A Figura 15 mostra que as maiores atividades de α -galactosidase imobilizada, acima de 90 %, foram detectadas em 30 °C, e a temperatura ótima foi de 40 °C. Em temperaturas acima de 40 °C foram observadas atividades relativas de 84, 72, 61 e 36 % nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C, respectivamente.

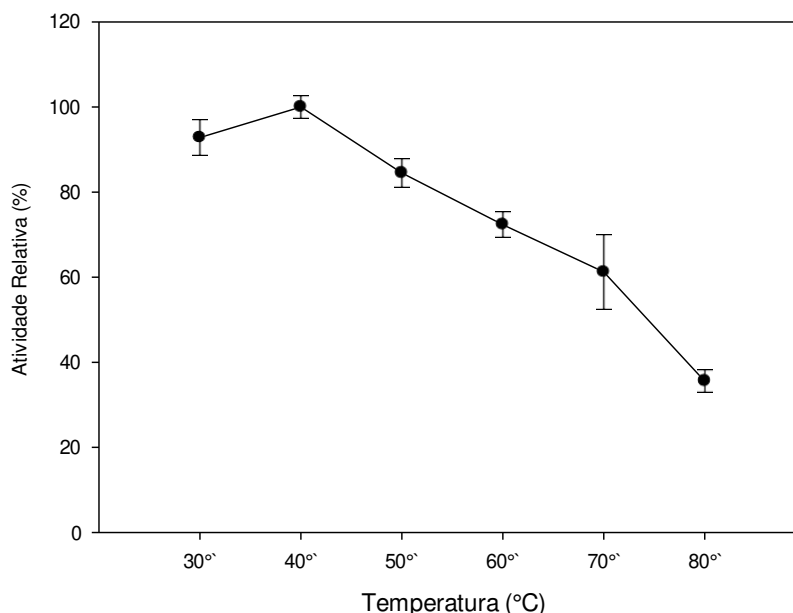


Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas.

A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que a α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas foi ativa em uma ampla faixa de temperatura, e mais estável que a enzima livre e a enzima imobilizada em alginato de cálcio. Isso provavelmente se deve ao fato da ligação covalente existente entre enzima e partículas magnéticas, fornecendo assim maior estabilidade à enzima, sendo esta uma das vantagens da técnica de imobilização (JOSEPH, et al., 2020). Apesar da enzima estar em contato direto com o meio reacional, uma temperatura ótima mais baixa em relação à enzima livre, provavelmente é resultante da alteração estrutural da enzima em função do processo de imobilização (PATEL, et al., 2023).

JOSEPH, et al (2020) ao imobilizar α -galactosidase de *Vigna mungo* em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, observou que a temperatura ótima foi de 80 °C e a da enzima livre de 55 °C. PATEL, et al (2023) verificaram que a lacase de *R. vernicifera*, ao ser imobilizada em nanopartículas magnéticas de cobre, apresentou temperatura ótima de 45 °C. Outros autores, ao realizarem a imobilização da tirosinase de *Pseudomonas sp.* EG22 utilizando nanopartículas magnéticas revestidas de celulose, obtiveram uma temperatura ótima de 35 °C (EL-AZIZ, et al., 2024).

Embora a enzima imobilizada em partículas magnéticas tenha apresentado uma temperatura ótima que não é a utilizada no processamento de soja, vale ressaltar que essa enzima apresenta potencial industrial, visto que, nas temperaturas utilizadas na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose, 50 e 60 °C, a enzima apresentou 84 e 72 % de atividade enzimática, respectivamente.

4.4.3 Análise de Termoestabilidade

A Figura 16 mostra que a α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas manteve 83, 79, 72, 67 e 35 % de sua atividade original quando pré- incubada a 50 °C nos tempos 1, 2, 3, 4 e 10 h, respectivamente. Na temperatura de 60 °C, a α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas manteve 75, 67, 60, 32 e 8,0 % de sua atividade original nos tempos 1, 2, 3, 4 e 10 h, respectivamente.

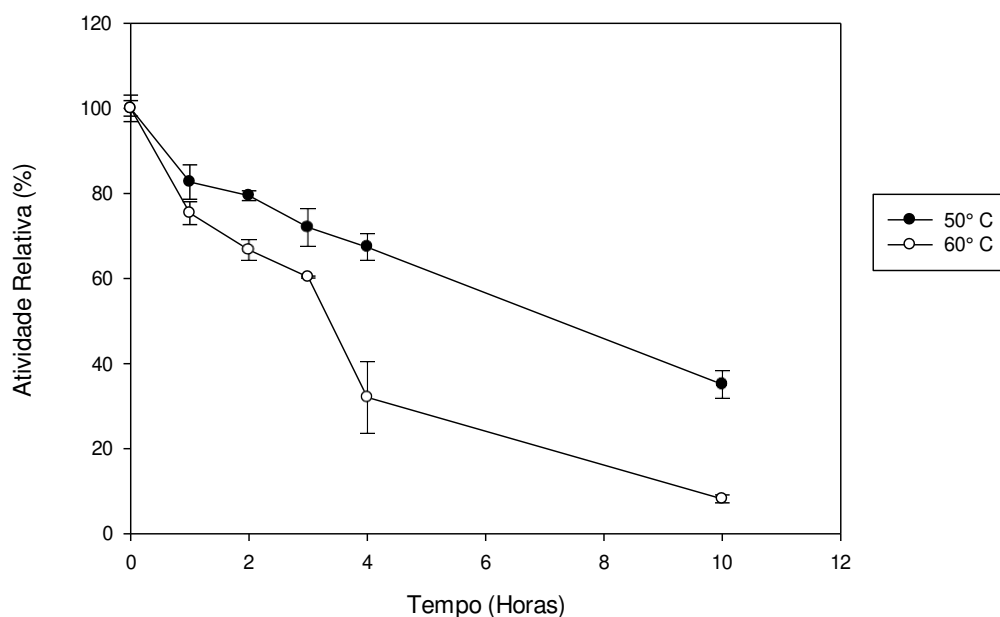


Figura 16: Efeito da temperatura na estabilidade de α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 50 °C (—●—) e 60 °C (—○—). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A partir dos resultados apresentados foi possível observar que a enzima imobilizada em partículas magnéticas apresentou maior estabilidade em relação à enzima imobilizada em alginato de cálcio, nas temperaturas testadas. Além disso, foi possível observar que nas temperaturas de 50 e 60 °C, a atividade de α -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas reduziu com o decorrer do tempo. Em um estudo realizado por ORHAN & UYGUN, (2020) foi verificado que a enzima L-asparaginase de *E.coli* imobilizada em nanopartículas magnéticas, ao ser submetida a uma temperatura de 55 °C durante 10 horas, manteve 50 % de sua atividade. KUO, et al (2012) verificaram que a lipase livre e imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, ao ser submetida a 60 °C durante 1 hora, reteve 21 e 76 % de sua atividade, respectivamente.

Após o armazenamento da enzima α -galactosidase extracelular imobilizada em partículas magnéticas à temperatura ambiente (25 °C), foi possível observar que a enzima manteve 78, 57,6 e 40,7 % de sua atividade original durante 5, 15 e 30 dias, respectivamente. Em temperatura de refrigeração (4 °C), a α -galactosidase imobilizada

manteve 96,3, 93,4 e 92 % de sua atividade original durante 5, 15 e 30 dias, respectivamente (Figura 17).

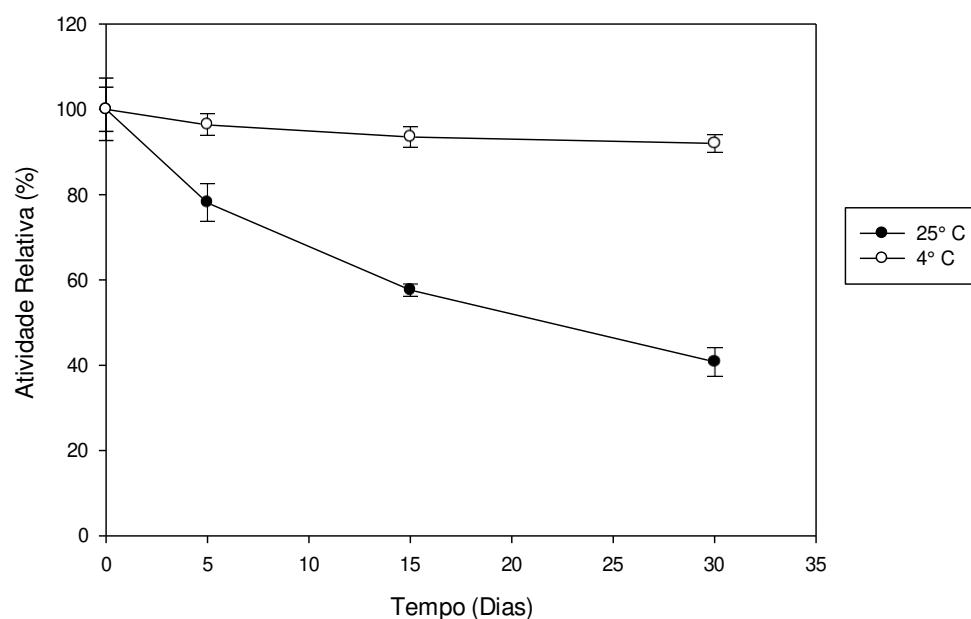


Figura 17 – Efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade de α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em partículas magnéticas. As amostras enzimáticas foram pré- incubadas nas temperaturas de 25 °C (●) e 4 °C (○). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

Foi possível observar que em temperaturas mais baixas, a α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas apresentou atividades maiores. Em contrapartida, a lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana, ao ser armazenada a 25 °C durante 3, 7, 10 e 13 dias, manteve a atividade total sob todas as condições de armazenamento (KUO, et al., 2012). Em um outro estudo, a lacase imobilizada em nanopartículas de cobre, ao ser incubada 4 °C durante 30 dias, reteve 92,2 % de atividade enzimática, enquanto a enzima livre perdeu 92,8 % de sua atividade (PATEL, et al., 2023).

Vale ressaltar que α -galactosidase imobilizada em partículas magnéticas também apresenta potencial na aplicação industrial, pois a imobilização nesse tipo de suporte permite que a enzima seja recuperada através de um campo magnético, podendo a enzima ser reutilizada após vários ciclos. Em contrapartida, durante o processo de imobilização, o glutaraldeído é utilizado em uma das etapas do processo. Pelo fato do glutaraldeído ser

considerado tóxico, o seu uso apresenta limitações na indústria alimentícia. A partir disso, a enzima imobilizada em alginato de cálcio foi escolhida para ser aplicada na hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose em leite de soja, visto que, se trata de um biopolímero de baixo custo e atóxico.

4.5 Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) em leite de soja pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio

A eficiência da hidrólise de oligossacarídeos de rafinose (ROs) foi avaliada pela redução dos níveis de ROs presentes no leite de soja, em função do tempo de incubação com a α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio. Os valores dos teores dos açúcares solúveis estão apresentados na Tabela 25, após utilização de 0,02 U da enzima imobilizada em 5 mL de leite de soja.

Tabela 25– Teores de estaquiose, rafinose e sacarose após a hidrólise de ROs pela α -galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio com atividade enzimática de 0,004 U/mL de leite de soja.

Tempo de hidrólise (h)	Teores (mg/g) $\pm$ DP		
	Estaquiose	Rafinose	Sacarose
0	45,5 $\pm$ 0,01	16,5 $\pm$ 0,05	100 $\pm$ 0,3
4	44,0 $\pm$ 0,04	23,5 $\pm$ 0,03	125 $\pm$ 0,2
6	40,5 $\pm$ 0,03	24,0 $\pm$ 0,5	126 $\pm$ 0,02

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25, a enzima α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio apresentou atividade sobre os ROs, confirmando o seu potencial na redução dos teores desses açúcares no leite de soja. Foi verificado que, ao utilizar 0,02 U da enzima imobilizada, o percentual de hidrólise foi de 3,3 e 42 %, de estaquiose e rafinose, respectivamente, com um aumento de 25 % de sacarose no tempo de 4 horas. No tempo de 6 horas, foi possível observar que o percentual de hidrólise foi de 11 e 45 % para estaquiose e rafinose, respectivamente, com um aumento de 26 % de

sacarose. Em concordância, os teores de sacarose, produto da hidrólise dos ROs pela α -galactosidase, aumentaram discretamente, indicando principalmente a atividade de α -galactosidase e não de invertase no processo.

Foi possível observar que a enzima imobilizada promoveu melhor redução nos teores de ROs quando comparada à enzima livre, considerando a mesma carga enzimática. Provavelmente, a obtenção de melhores resultados pode ter sido devido aos benefícios fornecidos pela imobilização, em que a enzima fica protegida de agentes externos do meio e consegue desempenhar sua atividade catalítica com maior eficiência. Além disso, embora a enzima esteja confinada ao suporte, a agitação provavelmente aumentou o contato entre a enzima imobilizada nas esferas de alginato e as moléculas de substrato, obtendo assim maiores taxas de hidrólise (JÚNIOR, et al., 2018). Ademais, quanto maior o tempo em constante agitação, maior será o acesso do substrato à enzima e, conseqüentemente, maior será a quantidade de produto formado.

Quando se utilizou 0,05 U da α -galactosidase contida nas células de *D. hansenii* UFV-1 imobilizadas com alginato de cálcio para hidrólise dos ROs em leite de soja, verificou-se percentuais de hidrólise de 25,57 e 93,23 % de rafinose e estaquiose, respectivamente, após um período de 3 horas de incubação; atingindo um percentual de hidrólise de 100 % para estaquiose e rafinose após 6 horas em uma temperatura de 60 °C (JÚNIOR, et al., 2009). Ao utilizar 50 U da α -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em alginato de cálcio em leite de soja, foi observado uma taxa de hidrólise de 96,2 e 97,6 % dos ROs, após 2 e 4 horas de incubação, respectivamente, em uma temperatura de 50 °C (KATROLIA, et al., 2019).

A partir destes resultados, é possível afirmar que a enzima α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* UFV-1 imobilizada em alginato de cálcio apresenta potencial na aplicação industrial, pois além de hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose em leite de soja, essa enzima também pode ser reutilizada nos próximos ciclos. Ademais, destaca-se que a enzima em estudo é proveniente de uma levedura não patogênica e o tipo de material utilizado para a imobilização da enzima é um produto não tóxico e de baixo custo, permitindo assim sua aplicação no setor alimentício. A imobilização da enzima nesse tipo de biopolímero, além de proporcionar à indústria de alimentos uma redução nos custos dos processos, salientará a responsabilidade ambiental e sustentável relacionada ao descarte destes biocatalisadores.

5. CONCLUSÃO

- A α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas apresentou pH ótimo ácido, o que favorece sua aplicação na hidrólise dos ROs em leite de soja;
- A temperatura ótima da α -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas foi de 50 e 40 °C, respectivamente;
- A α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio e partículas magnéticas apresentou atividades nas temperaturas de 50 e 60 °C durante 1, 2, 3, 4 e 10 horas, o que é de extrema relevância, pois são nessas temperaturas e entre estes tempos que ocorre a hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose;
- A α -galactosidase extracelular imobilizada em alginato de cálcio foi capaz de hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose presentes em leite de soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, S. **Application of immobilized enzymes in the food industry.** In: **Enzymes in food biotechnology.** Academic Press, 2019. p. 711-721.
- ALAM, S.; AHMAD, R.; PRANAW, K.; MISHRA, P.; KHARE, S. K. **Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system.** Bioresource technology, v. 269, p. 121-126, 2018.
- ALAM, S.; NAGPAL, T.; SINGHAL, R.; KHARE, S. K. **Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications.** Bioresource Technology, v. 339, p. 125599, 2021.
- ANISHA, G. S.; PREMA, P. **Cell immobilization technique for the enhanced production of α -galactosidase by *Streptomyces griseolobus*.** Bioresource technology, v. 99, n. 9, p. 3325-3330, 2008.
- BASSO, A.; SERBAN, S. **Industrial applications of immobilized enzymes—A review.** Molecular Catalysis, v. 479, p. 110607, 2019.
- BAYAZIDI, P.; ALMASI, H.; ASL, A. K. **Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties.** International journal of biological macromolecules, v. 107, p. 2544-2551, 2018.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. **Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization.** International journal of biological macromolecules, v. 130, p. 462-482, 2019.
- ÇELEM, E. B.; ÖNAL, S. **Sepabeads EC-EP immobilized α -galactosidase: Immobilization, characterization and application in the degradation of raffinose-type oligosaccharides.** Process Biochemistry, v. 116, p. 136-147, 2022.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials.** 3 Biotech, v. 3, p. 1-9, 2013.
- DU, Y.; GAO, J.; ZHOU, L.; MA, L.; HE, Y.; ZHENG, X.; HUANG, Z.; JIANG, Y. **MOF-Based Nanotubes to Hollow Nanospheres through Protein-Induced Soft-Templating Pathways.** Advanced Science, v. 6, n. 6, p. 1801684, 2019.
- EL-AZIZ, S. M. A.; FARAAG, A. H. I.; IBRAHIM, A. M.; ALBRAKATI, A.; BAKKAR, M. R. **Tyrosinase enzyme purification and immobilization from *Pseudomonas* sp. EG22 using cellulose coated magnetic nanoparticles:**

- characterization and application in melanin production.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 40, n. 1, p. 10, 2024.
- FLORIDO, E. B.; GARCIA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L.; AZAOLA, A. **Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis.** Process Biochemistry, v. 37, n. 5, p. 513-519, 2001.
- HASSAN, M. E.; YANG, Q.; XIAO, Z.; LIU, L.; WANG, N.; CUI, X.; YANG, L. **Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications.** 3 Biotech, v. 9, n. 12, p. 1-16, 2019.
- JORDÃO, R. E.; BRANDI, I. V.; PASSOS, F. M. L. **Stabilization of the activity of β -galactosidase in permeabilized immobilized cells for hydrolysis of lactose in milk.** Journal of food biochemistry, v. 25, n. 3, p. 257-266, 2001.
- JOSEPH, J. E.; MARY, P. R.; HARITHA, K. V.; PANWAR, D.; KAPOOR, M. **Soluble and cross-linked aggregated forms of α -galactosidase from *Vigna mungo* immobilized on magnetic nanocomposites: Improved stability and reusability.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 193, p. 238-256, 2021.
- JUNIOR, W. C. S.; REZENDE, S. T.; VIANA, P. A.; FALKOSKI, L.; REIS, A. P.; MACHADO, S. G.; BARROS, E. G. B.; GUIMARÃES, V. M. **Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilised in alginate.** Food chemistry, v. 114, n. 2, p. 589-593, 2009.
- KATROLIA, P.; LIU, X.; LI, J.; KOPPARAPU, N. K. **Enhanced elimination of non-digestible oligosaccharides from soy milk by immobilized α -galactosidase: A comparative analysis.** Journal of Food Biochemistry, v. 43, n. 11, 2019.
- KUO, C. H.; LIU, Y. C.; CHANG, C. M. J.; CHEN, J. H.; CHANG, C.; SHIEH, C. J. **Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles.** Carbohydrate Polymers, v. 87, n. 4, p. 2538-2545, 2012.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. **Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk.** Process Biochemistry, v. 41, n. 8, p. 1903-1907, 2006.
- NAMPOOTHIRI, M.; PANDEY, A. **Immobilization of *Brevibacterium* cells for the production of L-glutamic acid.** Bioresource technology, v. 63, n. 1, p. 101-106, 1998.
- NESTORSON, A.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; JARNSTRO, L.; LEUFV, A. **Enzyme immobilization in latex dispersion coatings for active food packaging.** Packaging Technology and Science: An International Journal, v. 21, n. 4, p. 193-205, 2008.

- ORHAN, H.; UYGUN, D. A. **Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles for cancer treatment**. Applied biochemistry and biotechnology, v. 191, p. 1432-1443, 2020.
- PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C.; LEE, J. K. **Laccase immobilization on copper-magnetic nanoparticles for efficient bisphenol degradation**. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 33, n. 1, p. 127, 2023.
- PRASHANTH, S. J.; MULIMANI, V. H. **Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate**. Process Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 1199-1205, 2005.
- RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. **Bio-nanocomposites for food packaging applications**. Progress in polymer science, v. 38, n. 10-11, p. 1629-1652, 2013.
- SARAVITZ, D. M.; PHARR, D. M.; CARTER, T. E. **Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes**. Plant Physiology, v. 83, p. 185 – 189, 1987.
- SHANKAR, S. K.; PRAVEEN KUMAR, S. K.; MULIMANI, V. H. **Calcium alginate entrapped preparation of α -galactosidase: Its stability and application in hydrolysis of soymilk galactooligosaccharides**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 9, p. 1399-1405, 2011.
- WAHBA, M. I.; HASSAN, M. E. **Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-galactosidase**. Biopolymers, v. 103, n. 12, p. 675-684, 2015.
- ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. **A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility**. Catalysts, v. 8, n. 2, p. 92, 2018.