

ESTUDO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE D-TAGATOSE CATALISADA POR L-ARABINOSE ISOMERASE

Ravena Casemiro Oliveira ¹
Luciana Rocha Barros Gonçalves ²

RESUMO

A D-Tagatose é um açúcar raro com baixo valor calórico, similar a sacarose possuindo 92% do seu poder de dulçor, porém com apenas 38% do valor calórico, aproximadamente 1,5 Kg.cal-1. É considerado um agente anti-hiperglicemante, devido a sua baixa absorção e metabolização pelo organismo humano. Além disso, possui vários benefícios, como o seu alto potencial antidiabético para o tratamento de diabetes tipo II e efeito prebiótico. A D-Tagatose pode ser produzida através do método enzimático a partir da D-Galactose utilizando como biocatalisador a enzima L-arabione isomerase, A enzima L-AI utilizada nesse trabalho foi obtida de *Enterococcus faecium* expressa em *Escherichia coli*. Com o intuito de otimizar a produção de D-Tagatose, por processos biológicos, a reação de isomerização foi estudada. Realizou-se um planejamento experimental do tipo 2³ com 3 repetições no ponto central para analisar e encontrar as melhores condições de pH, temperatura e concentração inicial de substrato que promovem a maior conversão de D-Galactose em D-Tagatose. A concentração de D-Tagatose produzida foi determinada pelo método colorimétrico utilizando espectrofotômetro. Os resultados mostraram que existe uma forte influência da temperatura e do pH sob a reação enzimática. O planejamento experimental resultou no ponto ótimo de produção de D-Tagatose nas condições de 55 °C, pH 5,6 e concentração de substrato de 164 mM, obtendo um rendimento de 29,77 %. Com isso, conclui-se que as condições reacionais são capazes de alterar a velocidade da reação enzimática apesar do seu equilíbrio já é bem definido.

Palavras-chave: Adoçante, D-Tagatose, L-Arabinose Isomerase, Isomerização, D-Galactose.

INTRODUÇÃO

A relação entre dieta e incidência de doenças crônicas tem levado a mudança nos hábitos alimentares e a busca por estilos de vida mais saudáveis. Além disso destaca-se o potencial dos alimentos para manter ou melhorar o estado de saúde dos consumidores. Esses alimentos são chamados de alimentos funcionais.

Alimentos funcionais são definidos como aqueles que fornecem benefícios adicionais aos da alimentação ao consumidor, podendo reduzir o risco de doenças, entretanto não podem ser destinados ao tratamento de doenças agudas ou à utilização de cuidados paliativos (BALDISSERA et al., 2011; JONES, 2002).

¹ Doutoranda do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará - UFC, ravenacasmiro@alu.ufc.br;

² Professora orientadora: Dra., Universidade Federal do Ceará - UFC lrg@ufc.br.

Dentro do mercado de alimentos funcionais, pode-se destacar a busca por adoçantes de baixa caloria visando a substituição da sacarose presente na alimentação. Existe uma extensa diversidade de adoçantes e edulcorantes menos calóricos no mercado, entretanto, ainda não foi produzido um adoçante que apresente tanto as propriedades similares às da sacarose, em termos de doçura, sabor, cor e odor quanto um baixo valor calórico. A D-Tagatose surge então como uma alternativa promissora. A D-Tagatose não possui sabor residual e apresenta 92% do poder de dulçor quando comparada com a sacarose, porém com apenas 38% do valor calórico, aproximadamente $1,5 \text{ Kg}\cdot\text{cal}^{-1}$. (FUJIMARU; PARK; LIM, 2012; LAKSMI et al., 2018; MEN et al., 2014; SON et al., 2018).

A D-Tagatose é um monossacarídeo, epímero da frutose e uma cetohexose natural, classificada como GRAS – Generally Recognized As Safe pela FDA – US Food and Drug Administration, ou seja, é considerada uma substância segura (MEN et al., 2014; XU et al., 2016). Por ser um substituto da sacarose, possuindo sabor e poder de doçura semelhantes, porém com menos valor calórico, a D-Tagatose pode ser utilizada na indústria de alimentos, na produção de bebidas, sucos de frutas, doces, entre outros. (GUO et al., 2018; XU et al., 2011).

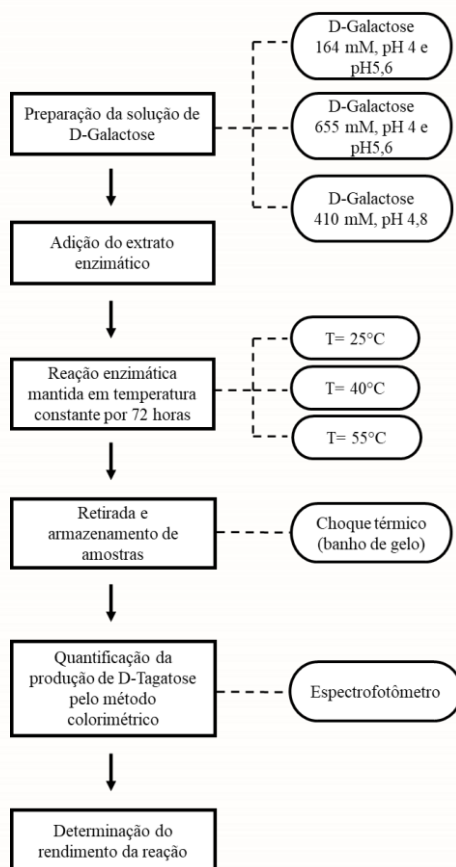
O trabalho tem como objetivo o estudo das condições da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose utilizando a L-arabinose isomerase como biocatalisador visando o aumento do rendimento dessa reação. Para isso, serão estudados os efeitos do pH, temperatura e concentração inicial de substrato sob o equilíbrio da reação através de um planejamento experimental.

METODOLOGIA

O planejamento experimental escolhido para encontrar as melhores condições de produção da D-Tagatose foi do tipo 2^3 com 3 repetições no ponto central.

A quantidade de D-Tagatose produzida foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método ácido sulfúrico cysteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Após quantificada a D-Tagatose, pode-se então determinar o rendimento da reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose. A Figura 1 a seguir mostra o fluxograma do processo de obtenção da D-Galactose.

Figura 1 – Fluxograma representativo do processo de produção da D-Tagatose a partir da reação de isomerização da D-Galactose por rota enzimática.



FONTE: Elaborada pela autora.

O rendimento da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose foi determinado através da razão entre a quantidade de produto obtido e a quantidade que teoricamente seria obtida (conversão reacional de 100%). O rendimento pode ser obtido como descrito na Equação 1 abaixo:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{[Tag]}{[Galac]_{inicial}} * 100 \quad (1)$$

Onde: [Tag] é a concentração de D-Tagatose produzida (mM) e [Galac]_{inicial} é a concentração inicial de D-Galactose (mM) utilizada como substrato.

DESENVOLVIMENTO

A D-Tagatose possui vários benefícios para saúde. Por ser pouco absorvida e metabolizada pelo organismo humano, a D-Tagatose possui alto potencial antidiabético para o

tratamento de diabetes tipo II, causando perda de peso e aumento da lipoproteína de alta densidade, sendo assim, considerado um agente anti-hiperglicemante (Donner et al., 2010). Possui efeito prebiótico regulando a flora intestinal, prevenção de cáries dentárias, tratamento de obesidade, baixo colesterol e prevenção do câncer de colo (LU; LEVIN; DONNER, 2008; SALONEN et al., 2012; XU et al., 2011). Alguns trabalhos mostram que a D-Tagatose pode ser considerada um agente anti-biofilme e anti-halitose (LAKSMI et al., 2018; OH, 2007).

A D-Tagatose é produzida através da reação de isomerização da D-Galactose por rota química utilizando catalisador de cálcio, possuindo assim algumas desvantagens, como produção de subprodutos indesejáveis, geração de rejeito químico e necessidade de complexas etapas de purificação do produto. Assim, a produção de D-Tagatose a partir de D-Galactose, por rota enzimática, usando L-arabinose isomerase (L-AI) como biocatalisador tem sido estudada intensivamente nos últimos anos (HUNG et al., 2014; KIM et al., 2015, 2017; LAKSMI et al., 2018; LIU et al., 2014; MEN et al., 2014; TORRES et al., 2014; XU et al., 2011, 2012).

No entanto, a produção de D-Tagatose via rota enzimática ainda possui algumas desvantagens, como por exemplo, uma baixa produtividade para escala industrial (SHIN et al., 2016). As enzimas não são plenamente utilizadas em escala industrial devido à instabilidade de suas estruturas ocasionada, principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em condições desnaturantes (pH e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos) (RODRIGUES, 2009; SOUSA, 2015).

Visando amenizar os percalços da rota enzimática e aumentar a conversão da reação de isomerização de D-Galactose em D-Tagatose vários estudos sobre a modificação genética da enzima L-arabinose isomerase foram realizados. O estudo da modificação genética da enzima L-arabinose isomerase utilizada nesse trabalho foi realizado por Manzo e colaboradores, 2019.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos sobre a modificação genética da L-AI com o intuito de aumentar a produção de D-Tagatose, a reação ainda possui um baixo valor de conversão. Uma outra alternativa é então realizar o estudo das condições reacionais e do equilíbrio da reação, algo que é pouco abordado na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intervalo de concentração de substrato utilizado no planejamento experimental foi obtido a partir de uma possível concentração do soro e verificados na curva de solubilidade da D-Galactose em soro de leite. O intervalo de temperatura foi obtido através dos ensaios preliminares, já a faixa de pH utilizada no planejamento experimental foi baseada em estudos de Manzo et al. (2019).

O planejamento experimental com os seus fatores, níveis e as respostas encontradas para cada ensaio é descrita na Tabela 1 a seguir. Os experimentos foram realizados em duplicata, com exceção do ponto central que foi realizado em triplicata, sendo um total de 19 experimentos realizados.

Tabela 1 – Planejamento Experimental com efeitos e seus níveis naturais, resposta e rendimento obtido para cada experimento.

Exp	Tratamento	Efeito Fatorial			Resposta	
		Temp (°C)	Conc. Galactose (mM)	pH	Conc. Tagatose (mM)	Rendimento (%)
1	0	25	164	4	0,27 ± 0,02	0,17 ± 0,02
2	Temp	55	164	4	0,54 ± 0,36	0,33 ± 0,21
3	Conc	25	655	4	0,44 ± 0,14	0,07 ± 0,02
4	Temp*Conc	55	655	4	1,12 ± 0,06	0,17 ± 0,01
5	pH	25	164	5,6	12,89 ± 0,68	7,86 ± 0,42
6	Temp*pH	55	164	5,6	48,81 ± 1,77	29,77 ± 1,08
7	Conc*pH	25	655	5,6	24,51 ± 1,25	3,74 ± 0,19
8	Temp*Conc*pH	55	655	5,6	65,97 ± 1,54	10,07 ± 0,23
9	Pto central	40	410	4,8	13,38 ± 0,06	3,26 ± 0,01
10	Pto central	40	410	4,8	13,47 ± 0,34	3,28 ± 0,08
11	Pto central	40	410	4,8	15,44 ± 0,06	3,77 ± 0,01

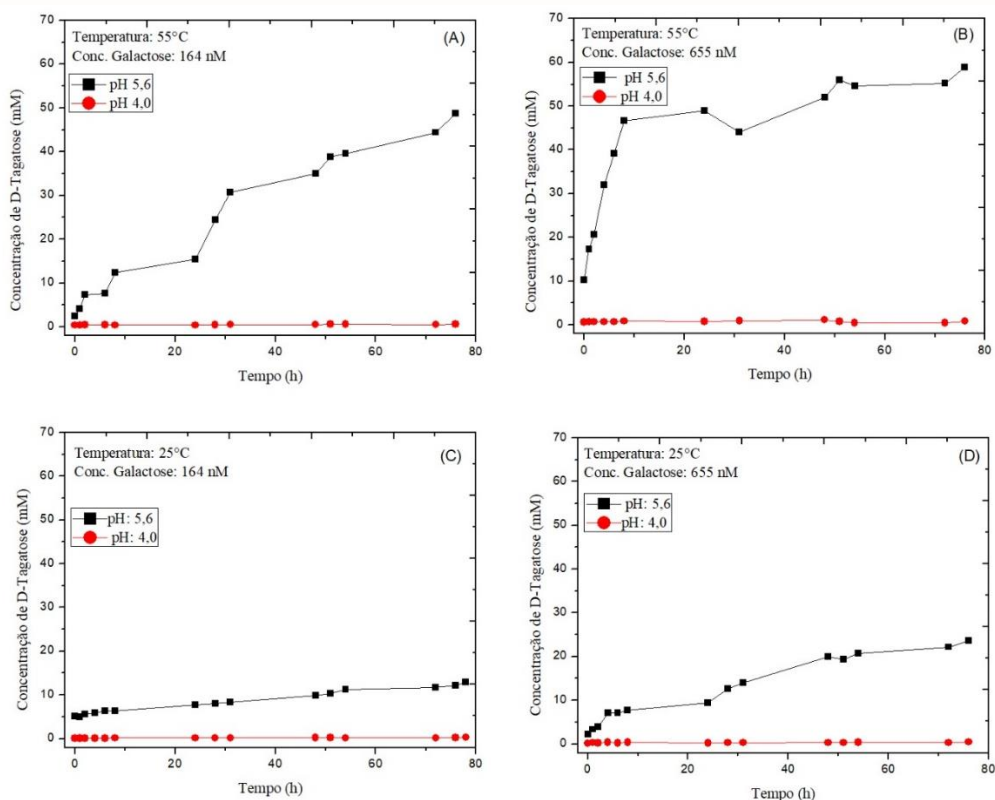
FONTE: Elaborada pela autora.

Pode-se notar que o aumento da concentração de substrato favorece a produção de D-Tagatose, porém o mesmo não acontece com o rendimento. Isso se dá porque o rendimento é definido como razão entre a quantidade de produto obtido e a quantidade que teoricamente

seria obtida e o aumento da concentração de D-Galactose aumenta a quantidade teórica de D-Tagatose produzida, porém não altera significativamente a quantidade de fato obtida.

Além disso, é possível perceber que existe um aumento significativo na concentração de D-Tagatose obtida quando ocorre um aumento no pH. Esse comportamento é observado quando comparados os experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 da Tabela 7. O aumento da temperatura também favorece a produção de D-Tagatose (experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8 da Tabela 7). As Figuras 2 (A); (B); (C) e (D) a seguir mostram claramente esse comportamento.

Figura 2 – Concentração de D-Tagatose produzida em função do tempo reacional para: (A) reação a 55 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (B) reação a 55 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (C) reação a 25 °C, concentração de substrato de 164 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●); (D) reação a 25 °C, concentração de substrato de 655 mM, pH 5,6 (■) e pH 4,0 (●).



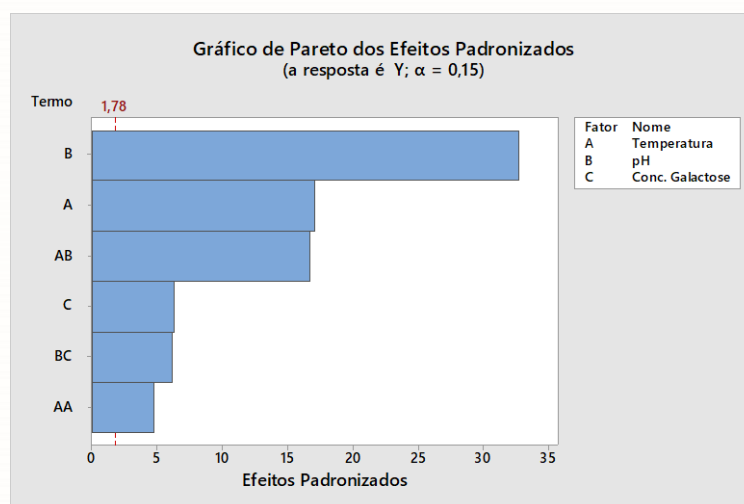
FONTE: Elaborada pela autora.

É notório o aumento da produção de D-Tagatose tanto com o aumento do pH da reação quanto com o aumento da temperatura (Figura 2). Isso ocorre provavelmente porque a temperatura ambiente a energia cinética das moléculas da enzima é menor do que em temperaturas mais elevadas, diminuindo a agitação e possibilidade de choques entre si que

favorecem a reação. Uma baixa conversão da reação em pH 4,0 já era esperada com base nos estudos e resultados obtidos por Manzo et al. 2019.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2 e com auxílio do software Minitab® 18 pode-se avaliar estatisticamente os resultados obtidos. A Figura 3, mostra o gráfico de Pareto para os fatores utilizados no planejamento experimental.

Figura 3 – Gráfico de Pareto para os efeitos lineares e quadráticos do modelo obtido para o planejamento experimental.



FONTE: Elaborada pela autora.

A partir da análise do gráfico de Pareto (Figura 3) percebe-se que todos os fatores escolhidos influenciam na reação, uma vez que todos os efeitos cruzam a linha de referência (1,78). Estes fatores são estatisticamente significativos ao nível 0,05 com os termos do modelo atual, sendo pH e temperatura os parâmetros que mais afetam, comprovando o resultado visto na Tabela 2. Essa influência já era prevista, uma vez que as enzimas são bastante sensíveis a mudanças de pH e temperatura.

A Equação 2 a seguir, representa a equação de regressão obtida no software Minitab® 18 a partir das respostas do planejamento experimental.

$$[Tagatose] = 95,0 - 5,025 Temp - 15,83 pH - 0,0718[Galactose] + 0,02321Temp^2 + 0,7961Temp * pH + 0,01805pH * [Galactose] \quad (2)$$

Onde [Tagatose]: é a concentração de D-Tagatose (mM) produzida ao final da reação; Temp é a temperatura (°C) na qual a reação ocorre; pH é o pH no qual a reação é mantida

e [Galactose] é a concentração de D-Galactose (mM) utilizada como substrato na reação enzimática.

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os efeitos utilizados no planejamento experimental e o ajuste do modelo obtido, respectivamente.

Tabela 2 – Valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os efeitos utilizados no planejamento experimental

	GL	Valor $F_{\text{calculado}}$	Valor F_{tabelado}	Valor-P
Modelo	6	292,60	19,353	0,000
Linear	3	471,50	19,164	0,000
Temperatura	1	294,63	18,513	0,000
pH	1	1078,00	18,513	0,000
Conc. Galactose	1	41,85	18,513	0,003
Quadrado	1	22,85	18,513	0,009
Temperatura*Temperatura	1	22,85	18,513	0,009
Interação com 2 Fatores	2	159,14	19,000	0,000
Temperatura*pH	1	280,56	18,513	0,000
pH*Conc. Galactose	1	37,71	18,513	0,004
Erro	4			
Falta de ajuste	2	2,83		0,261
Erro puro	2	*	*	*
Total	10			

FONTE: Elaborada pela autora.

Percebe-se que todos os efeitos são significantes para um nível de confiança de 5%, visto que o Valor-P para todos os efeitos é menor do que 0,05. Isso também pode ser visto através do teste F, uma vez que todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram maiores do que F_{tabelado} . Essa significância pode ser confirmada através do coeficiente de determinação, R^2 , do modelo obtido, que comprova que a equação obtida (Equação 2) consegue descrever bem os dados e também pode ser representativa para novos ensaios devido ao valor do R^2 (pred) ser próximo a 100%. Além disso, um baixo valor de S mostra que o modelo representa bem os resultados encontrados. A Tabela 8 a seguir apresenta os dados dos coeficientes de determinação do modelo obtido.

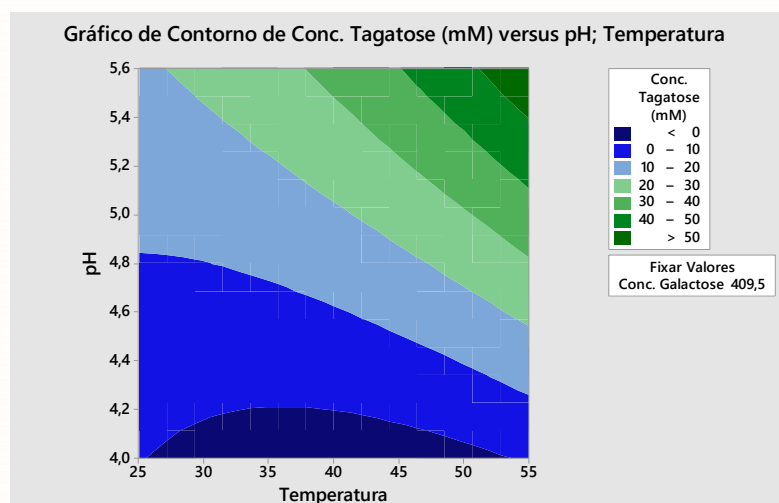
Tabela 3 – Coeficiente de determinação (R^2), ajustado (aj) e predito (pred) e valor S para o modelo obtido.

S	R^2	R^2 (aj)	R^2 (pred)
1,61326	99,77%	99,43%	97,18%

FONTE: Elaborada pela autora.

Com o objetivo de verificar como a variável resposta, concentração de D-Tagatose produzida, se relaciona com as variáveis manipuladas, pH e Temperatura, construiu-se o gráfico de contorno, representado na Figura 4.

Figura 4 – Gráfico de contorno para a resposta obtida do planejamento experimental.

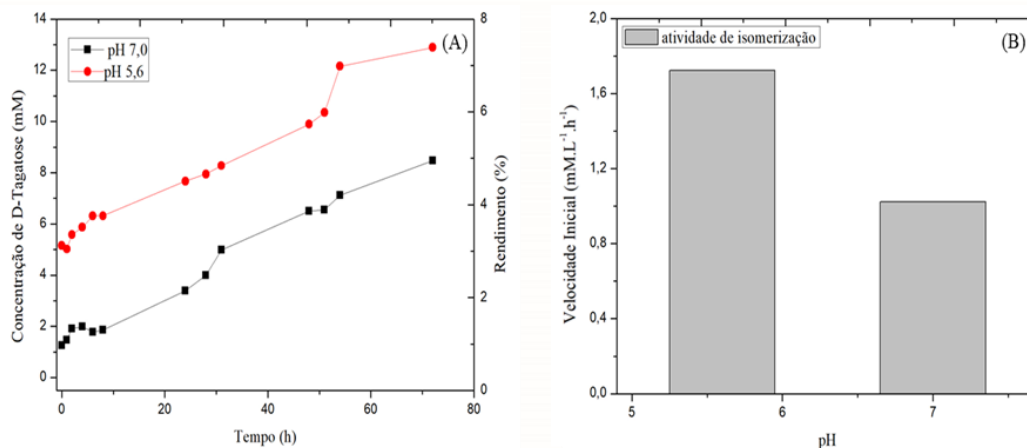


FONTE: Elaborada pela autora.

Analisando o gráfico de contorno (Figura 4) verifica-se que o aumento de pH e temperatura favorecem a produção de D-Tagatose, sendo o ponto extremo do planejamento experimental a condição mais favorável para a reação enzimática. Como os ensaios preliminares de temperatura mostraram que ocorre uma perda significativa da atividade catalítica da enzima a 60 °C, admitiu-se como ponto ótimo de operação a temperatura de 55 °C.

Com o intuito de verificar se um valor de pH acima de 5,6 favorece a reação, realizou-se um ensaio com a reação em pH 7,0. A reação foi mantida na temperatura de 25 °C durante 72 horas. A Figura 5 a seguir mostra o perfil de produção de D-Tagatose para a reação em pH 5,6 e 7,0.

Figura 5 – (A) Concentração de D-Tagatose produzida e rendimento obtido em função do tempo reacional para as reações em pH 7,0 (■) e em pH 5,6 (●) e (B) atividade de isomerização para as reações em pH 5,6 e pH 7,0. Reação a 55°C, concentração de substrato 164 mM.



FONTE: Elaborada pela autora.

Como houve uma menor produção de D-Tagatose para reação em pH 7,0, admitiu-se como ponto ótimo o pH 5,6. Pode-se perceber, com auxílio da Figura 5, que na reação ocorrendo em pH 7,0 tem-se uma menor atividade de isomerização ocasionando uma menor produção de D-Tagatose e conseqüentemente um menor rendimento da reação. Logo, assumiu-se temperatura de 55 °C, pH 5,6 e concentração de D-Galactose de 164 mM como as condições ótimas. Todos os ensaios a seguir foram realizados nesta condição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Torna-se evidente a influência da temperatura e do pH na reação enzimática, bem como a influência da concentração inicial de substrato no rendimento obtido, alcançando o ponto ótimo de produção de D-Tagatose para a reação ocorrendo nas condições de 55 °C, pH 5,6 e concentração de substrato de 164 mM, obtendo um rendimento de 29,77 %.

De maneira geral, conclui-se que as condições reacionais alteram a velocidade da reação enzimática, porém o seu equilíbrio já é bem definido e se faz necessário um estudo termodinâmico mais aprofundado para tentar conseguir o seu deslocamento.

REFERÊNCIAS

BALDISSERA, Ana Carolina et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1497-1512, 19 out. 2011. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1497>.

DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 192, n. 2, p. 583–587, 1951.

FUJIMARU, Tomomi; PARK, Jin-hee; LIM, Juyun. Sensory Characteristics and Relative Sweetness of Tagatose and Other Sweeteners. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 77, n. 9, p.323-328, 21 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02844.x>.

HUNG, Xing-guang et al. Characterization of a thermophilic l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 83, p.121-128, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.026>

JONES, Peter J.. Clinica nutrition: 7. Functional foods - more than just nutrition. **Cmaj**. [Canadá], v. 166, n. 12, p. 1555-1563. 11 jun. 2002.

KIM, Ho Myeong et al. Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 175, p.128-134, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.050>.

LAKSMI, Fina Amreta et al. Improved substrate specificity for D-galactose of L-arabinose isomerase for industrial application. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1866, n. 11, p.1084-1091, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.09.002>

LIU, Yi et al. Efficient Production of d-Tagatose Using a Food-Grade Surface Display System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 28, p.6756-6762, 8 jul. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf501937j>.

LU, Y.; LEVIN, G. V.; DONNER, T. W. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s.l.], p.109-134, 17 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00799.x>.

MANZO, Ricardo Martín et al. Biochemical Characterization of Heat-Tolerant Recombinant l-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 Strain with Feasible Applications in d-Tagatose Production. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], p.1-15, 27 mar. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00161-x>.

MEN, Yan et al. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: Cloning, overexpression and characterization of l-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 169, n. 2-3, p.171-178, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.001>

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

RODRIGUES, Roberta da Silva Bussamara. **Produção de caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais**. 2009. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SALONEN, Noora et al. D-Tagatose production in the presence of borate by resting *Lactococcus lactis* cells harboring *Bifidobacterium longum* l-arabinose isomerase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.489-497, 18 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-012-0805-2>.

SHIN, Kyung-chul et al. Increased Production of Food-Grade d-Tagatose from d-Galactose by Permeabilized and Immobilized Cells of *Corynebacterium glutamicum*, a GRAS Host, Expressing d-Galactose Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 43, p.8146-8153, 21 out. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03588>.

SON, Yang-ju et al. Anti-blooming effect of maltitol and tagatose as sugar substitutes for chocolate making. **Lwt**, [s.l.], v. 88, p.87-94, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.018>.

SOUSA, Marylane de. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-Tagatose por L-Arabinose Isomerase**. 2015. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015

TORRES, Pedro R. et al. Purification of an l-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 102, p.99-105, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.023>

XU, Zheng et al. Construction and co-expression of polycistronic plasmids encoding thermophilic l -arabinose isomerase and hyperthermophilic β -galactosidase for single-step production of d -tagatose. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 109, p.28-34, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.015>.

XU, Zheng et al. Production of d-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 Cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 166, n. 4, p.961-973, 28 dez. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9484-8>