

AMANDA ROCHA MORTOZA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE EXPRESSA POR
FUNGO ISOLADO DO BIOMA CERRADO BRASILEIRO VISANDO À APLICAÇÃO
COMO SUPLEMENTO DIGESTIVO

Brasília, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA ROCHA MORTOZA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE EXPRESSA POR
FUNGO ISOLADO DO BIOMA CERRADO BRASILEIRO VISANDO À APLICAÇÃO
COMO SUPLEMENTO DIGESTIVO

Dissertação apresentada como requisito para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Brasília
2012

AMANDA ROCHA MORTOZA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE EXPRESSA POR
FUNGO ISOLADO DO BIOMA CERRADO BRASILEIRO VISANDO À APLICAÇÃO
COMO SUPLEMENTO DIGESTIVO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 07 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB
Presidente

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Borin
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

Prof^a. Dr^a. Janice Lisboa De Marco
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho, abrindo muitas portas e por me dar saúde e coragem todos os dias para alcançar meus objetivos.

Aos amores da minha vida, meus pais Iara e Reginaldo, meu irmão Enzo e minha avó Lady, pelo carinho, por apoiarem minhas decisões e por compreenderem a minha ausência.

À Professora Pérola pela orientação prestada durante a elaboração deste estudo, pelas sugestões, pela amizade, pelo respeito e disposição constante.

À Professora Jussara, tia e amiga, pelo grande incentivo, auxílio e conselhos repletos de sabedoria.

Aos Professores Edivaldo Ximenes do Laboratório de Enzimologia, Maria de Fátima Borin e Luiz Alberto Simeoni do Laboratório de Farmacologia Molecular, Damaris Silveira do Laboratório de Controle de Qualidade, pela maneira ética que utilizam e disponibilizam o espaço e a estrutura dos laboratórios de pesquisa, pela atenção e colaboração à nossa pesquisa.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB pelos ensinamentos.

Ao Pesquisador Cristiano Lacorte, a minha amiga e colega Juliane Viana Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, que com todo carinho dedicaram parte do seu tempo para ajudar no desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas Paula Monteiro, Ivelone Maria de Carvalho, Gabriela Werneck, Luiz Vale, Félix Siqueira, Paula Jaramillo, Gilvan Caetano, Adelson Joel da Silva, Marísia Cortes e Margarete Lima pela colaboração e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Ciências da Saúde pelo apoio, incentivo e bons momentos que passamos juntos.

Aos amigos Juliane Viana, Maria Cecília Santana, Ana Cláudia Arantes, Jonathan Lobo e Alexandre Motta que foram de grande valor para minha adaptação nesta cidade e com quem vivi momentos inesquecíveis e vão estar presentes no meu coração e na minha vida daqui para frente.

A todos os amigos queridos de Goiânia que sempre apoiaram as minhas escolhas e que estiveram do meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida. Amo vocês!

À FAPDF e ao INCT-if pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa. Ao CNPq pela bolsa de pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“O Caminho certo é o que melhor servir ao nosso aprendizado, à nossa autodescoberta, e não aquele que os outros decidem para nós.”

Teresa de Calcutá

RESUMO

Lactase é o nome popularmente utilizado para a enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23). As β -galactosidases são encontradas na natureza em vegetais, animais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com sua origem. A literatura apresenta várias enzimas produzidas por fungos e outros microrganismos com ação de interesse biológico que foram purificadas e caracterizadas. Com a melhoria no conhecimento e na purificação de enzimas, novas possibilidades de processos industriais e aplicações na saúde humana surgiram. Neste contexto, a β -galactosidase é uma importante enzima produzida por microrganismos que desperta grande interesse à saúde, pois quando ausente no organismo dos mamíferos a lactose consumida não é digerida. A ingestão oral direta da β -galactosidase por pessoas intolerantes a lactose é uma forma diferente de aplicação da β -galactosidase, visando à digestão da lactose do leite e seus derivados. Além da ingestão da β -galactosidase, esta enzima também está sendo aplicada na indústria de laticínios para hidrolisar a lactose do leite obtendo-se, assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose. Esta aplicação dá origem a novas pesquisas nesta área, na procura de β -galactosidase com características favoráveis ao ambiente gástrico ou indicadas para o uso industrial. Neste trabalho o fungo *Aspergillus foetidus* isolado do Cerrado expressou a enzima β -galactosidase em meio líquido contendo resíduo de soja como fonte de carbono após sete dias de fermentação a 28°C. A enzima produzida extracelularmente foi purificada por sistema micelar de duas fases aquosas. A melhor condição de purificação foi obtida com sistema formado por 8%(p/p) Triton X-114, 10%(p/p) caldo fermentado e 28°C como temperatura de incubação. Nesta condição, 89,8% da atividade enzimática adicionada ao sistema foi recuperada na fase pobre em micelas. A caracterização bioquímica da enzima presente na fase pobre em micela revelou um pH ótimo igual a 2,6 e uma temperatura ótima igual a 60°C, valores que favorecem a aplicação industrial da β -galactosidase purificada.

Palavras-chave: β -galactosidase; intolerância a lactose; lactase; *Aspergillus foetidus*.

ABSTRACT

Lactase is the name popularly used for the enzyme β -galactosidase (EC3.2.1.23). β -galactosidases are found naturally in plants, animals and microorganisms, and their characteristics vary according to their origin. The literature contains several enzymes produced by fungi and other microorganisms which shows biological activity. Such enzymes have been purified and characterized. With growing knowledge and greater enzyme purification, new possibilities for applications in industrial processes and human health have emerged. In this context, the β -galactosidase is an important enzyme produced by microorganisms that attracts great interest to health, because when absent in the body of mammals the ingested lactose is not digested. The direct oral intake of β -galactosidase by lactose intolerant people is a different form of application of the enzyme in order to digest lactose present in milk and dairy products. Besides the intake of β -galactosidase, this enzyme is also being applied in the dairy industry to hydrolyze the lactose in milk yielding foods with lactose low levels, improving the solubility and digestibility of milk and dairy products, which is ideal for lactose intolerant consumers. This application gives rise to new research in this area, in the search for β -galactosidase with favorable characteristics to the gastric environment or suitable for industrial use. In this work the fungus *Aspergillus foetidus* isolated from the Cerrado expressed the enzyme β -galactosidase in liquid medium containing soybean waste as carbon source after seven days of fermentation at 28 °C. The enzyme produced in the medium was purified by aqueous two-phase micellar system. The best condition was obtained in a purification system consisting of 8% (w/w) Triton X-114, 10% (w/w) fermentation broth and 28 °C as incubation temperature. In this condition, 89.8% of enzyme activity added to the system was recovered in the micelle-poor phase. The biochemical characterization of the enzyme present in the micelle-poor phase revealed an optimum pH equal to 2.6 and an optimum temperature equal to 60 °C, favoring the industrial application of purified β -galactosidase.

Keywords: β -galactosidase; lactose intolerance; lactase; *Aspergillus foetidus*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema representando a atividade catalítica da β -galactosidase frente à molécula de lactose (36).....7
- Figura 2: Vista do tetrâmero da β -galactosidase. Cada cor representando um domínio, incluindo os peptídeos de cor laranja. Domínio 1, azul; domínio 2, verde; domínio 3, amarelo; domínio 4, roxo; domínio 5; vermelho. As tonalidades mais claras e mais escuras de uma determinada cor são usadas para distinguir o mesmo domínio em diferentes subunidades. Os cátions de metal em cada um dos sítios ativos são mostrados como esferas: Na^+ , verde e Mg^{++} , azul (36).....9
- Figura 3: Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de agentes tensoativos são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Nota-se que, como indicado pelas setas, as micelas e as moléculas de tensoativos que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível.....18
- Figura 4: Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo C10E14. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas, e com o aumento da temperatura se separa em uma fase rica em micelas coexistindo com uma fase pobre em micelas (66).....19
- Figura 5: Curva binodal de uma solução aquosa do tensoativo Triton X-114 baseada em experimentos realizados por Lopes (2006) (81). C_d = concentração do tensoativo na fase pobre em micelas; C_c = concentração do tensoativo na fase rica em micelas; V_c = comprimento do segmento de reta da linha de amarração (tie-line) compreendido entre C_d e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases e cujo valor é proporcional ao volume da fase rica em micelas; V_d = comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_c e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases e cujo valor é proporcional ao volume da fase pobre em micelas.20
- Figura 6: Dosagem das atividades enzimáticas em meio líquido contendo diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono.36
- Figura 7: Curva de indução com as atividades específicas em cada dia da fermentação.....37
- Figura 8: Eletroforese em gel de acrilamida/Bis-acrilamida, revelado com Coomassie Blue. Padrão de massa molecular (1), Extrato Bruto (2). A curva de regressão linear utilizada para estimar o massa molar das proteínas **eluidas neste gel foi $y = 0,0027x + 0,3888$, $R^2 = 0,8634$**38
- Figura 9: Determinação dos valores de pH ótimo para enzimas presentes no sobrenadante do extrato bruto após sete dias de fermentação em meio contendo casca de soja.39
- Figura 10: Determinação dos valores de temperatura ótima para enzimas presentes no sobrenadante do extrato bruto após sete dias de fermentação em meio contendo casca de soja. A: pH do substrato igual a 3,0; B: pH do substrato igual a 4,6 e C: pH do substrato igual a 7,0.40

Figura 11: Determinação da estabilidade da enzima β -galactosidase no extrato bruto a 30 °C por 8 horas.	41
Figura 12: Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, corado com Comassie blue. As amostras das frações aplicadas foram: Padrão de massa molar (1), Extrato Bruto (2), >100 kDa (3), >30 kDa (4), <30 kDa (5). As bandas protéicas reveladas possuem aproximadamente 160 kDa, 110 kDa, 77 kDa, 71 kDa e 55 kDa	43
Figura 13: Zimograma para atividade da β -galactosidase revelado com X-Gal. Linha 1: padrões de massa molar conhecido. Linha 2: banda proteica de aproximadamente 75 kDa com atividade enzimática característica da enzima β -galactosidase na presença do substrato X-Gal.....	44
Figura 14: Ilustração do sistema micelar Triton X-114/Tampão fosfato pH 7,0 de duas fases aquosas preparado a 2,0%(p/p) de Triton X-114 e mantido em banho a 30°C por 2 horas.....	46
Figura 15: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por <i>Aspergillus foetidus</i> em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 4,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).....	47
Figura 16: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por <i>Aspergillus foetidus</i> em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 6,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).....	48
Figura 17: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por <i>Aspergillus foetidus</i> em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 8,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).....	48
Figura 18: Gráfico de superfície de resposta para R(%) em função da temperatura e concentração de Triton X-114, considerando a adição de 10,0% (p/p) de caldo fermentado ao SMDFA.....	50
Figura 19: Efeito do pH na enzima β -galactosidase presente na fase pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.....	51
Figura 20: Efeito da temperatura na enzima β -galactosidase presente na fase pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.....	52
Figura 21: Determinação da estabilidade da enzima β -galactosidase na fração pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas de lactases expressas por micorganismos.....	8
Tabela 2: Preparo das soluções tampões.....	27
Tabela 3: Níveis dos fatores utilizados no planejamento estatístico completo 23 empregado para estudar a influência das variáveis temperatura, concentração de Triton X-114 e concentração de β -galactosidase presente no caldo fermentado.....	33
Tabela 4: Descrição da atividade enzimática da β -galactosidase e a concentração proteica total nas frações obtidas após separação fracionada por membranas de 100 kDa e 30 kDa	43
Tabela 5: resultados do modelo de regressão adotado, utilizando o método dos Mínimos Quadrados Ordinários.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de amônio
BDA	Agar batata dextrose
BIS	Bis-Acrilamida
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Concentração Micelar Crítica
Cd	Concentração de biomolécula na fase pobre em micelas
C _i	Concentração de biomolécula inicial
C _c	Concentração de biomolécula na fase rica em micelas
EV	Volume de exclusão
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
K _p	Coefficiente de partição
Log PM	Logaritmo do massa molar
N _{ag}	Número de agregação
PAS	Poliacrilato de sódio
PEG	Polietilenoglicol
R	Razão volumétrica entre as fases
R%	Recuperação da enzima β -galactosidase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SMDFA	Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas
T	Temperatura
T _c	Temperatura crítica
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
V _c	Volume na fase rica em micelas
V _d	Volume na fase pobre em micelas
V _i	Volume inicial
\emptyset _c	Frações volumétricas de tensoativo na fase rica em micelas
\emptyset _d	Frações volumétricas de tensoativo na fase pobre em micelas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. INTOLERÂNCIA A LACTOSE	3
2.2. A ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE	6
2.3. APLICAÇÕES DE β -GALACTOSIDASES	10
2.4. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	12
2.4.1. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas	16
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	23
4.2. MANUTENÇÃO DOS FUNGOS	23
4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	23
4.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO	24
4.5. DOSAGEM DE β -GALACTOSIDASE	24
4.5.1. Preparo das soluções	24
4.5.2. Ensaio da atividade enzimática de β -galactosidase	25
4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL	26
4.6.1. Preparo das soluções	26
4.6.2. Ensaio da quantificação de proteínas totais	26
4.7. EFEITO DA TEMPERATURA E PH VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE TERMICA	26
4.7.1. Preparo das soluções	27
4.8. SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO	28
4.9. ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	29
4.9.1. Condições de Corrida	29
4.9.2. Preparo dos géis desnaturantes (SDS-PAGE)	29
4.9.2.1. Gel Concentrador	30
4.9.2.2. Gel separador	30
4.9.3. Preparo das amostras	30
4.9.4. Coloração com Azul de Coomassie	31
4.9.5. Determinação da massa molar	31
4.9.6. Zimograma	31
4.10. AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO TRITON X-114 NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE	32
4.11. ENSAIOS DE PARTIÇÃO EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS	32
4.12. METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
4.13. ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO DIFERENTES RESÍDUOS COMO FONTES DE CARBONO	36
5.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO	38

5.3.	SEPARAÇÃO FRACIONADA POR MENBRANAS DE 30 kDa E 100 kDa	42
5.4.	APLICAÇÃO DO SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS	45
5.5.	PARTIÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE NO SISTEMA MICELAR TRITON X-114/TAMPÃO FOSFATO	45
5.5.1.	Efeito da temperatura e pH sobre a enzima β -galactosidase	50
5.5.2.	Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase	52
6.	CONCLUSÃO	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos na manufatura de produtos industriais reflete o conceito de microbiologia industrial (1). O interesse nessa área da biotecnologia está principalmente direcionado a aplicação de conhecimentos científicos básicos para expansão e desenvolvimento de bioprodutos com potencial comercial, como enzimas, antibióticos, vitaminas, aromas, produtos lácteos, cerveja, vinho, bioinseticidas, biocombustíveis entre outros (2). Dentre as vantagens da utilização de microrganismos na geração destes produtos, está a relativa simplicidade dos experimentos com microrganismos, com adequada velocidade de crescimento e grande diversidade de atividades bioquímicas. Estes fatores os tornam um bom modelo experimental para o estudo da genética e produção de biomoléculas aplicadas a diversas áreas da indústria (1, 3, 4). Sendo que, entre os bioprodutos de interesse, merecem destaque aqueles produzidos por fungos, em especial as enzimas. Do ponto de vista industrial, fungos são microrganismos especialmente valorizados, porque as enzimas por eles produzidas, normalmente, são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (4).

A literatura apresenta várias enzimas produzidas por fungos e outros microrganismos com ação de interesse biológico que já foram purificadas e caracterizadas. Com a melhoria no conhecimento e na purificação de enzimas, novas possibilidades de processos industriais e aplicações na saúde humana vêm surgindo (5).

O desenvolvimento de técnicas e metodologias para separação e purificação de compostos de origem biológica, principalmente proteínas, tem sido essencial para os recentes avanços no desenvolvimento da indústria biotecnológica. Entretanto, sua purificação industrial é dificultada, dentre outros fatores, pela baixa concentração e alta sensibilidade térmica, o que geralmente obriga o uso de técnicas de custo elevado, como processos cromatográficos. Com isso, o custo final dos processos é elevado, dificultando o acesso a estes produtos de grande aplicação nos campos alimentício e terapêutico (6).

A extração líquido-líquido usando Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) tem sido utilizada com grande sucesso em processos de separação, concentração e purificação de proteínas. Esta técnica apresenta varias vantagens

aos métodos de separação tradicionais, visto que o sistema utilizado no processo extrativo apresenta alto teor de água em cada fase (entre 70% e 90%), resultando em um ambiente ameno para o trabalho com um componente biologicamente ativo, o qual preserva a sua estabilidade molecular, possibilitando o seu processamento neste meio. Neste contexto, a β -galactosidase é uma importante enzima produzida por microrganismos que pode ser purificada em sistema micelar deduas fases aquosas (7).

A enzima β -galactosidase desperta grande interesse à saúde humana, pois quando ausente no organismo humano a lactose consumida não é digerida. Isso é chamado de intolerância a lactose.

A intolerância à lactose é o tipo mais comum de intolerância a carboidratos e acomete cerca de 75% da população adulta mundial, representando a primeira vista, um obstáculo ao consumo de alimentos derivados do leite. Dessa forma, a ingestão diária recomendada de alguns nutrientes pode não ser atingida, aumentando o risco de doenças, especialmente no que se refere à osteoporose (8). Dado esse contexto, diversos estudos tem sido conduzidos e alternativas tem sido propostas com o objetivo de garantir aos indivíduos intolerantes à lactose ingestões adequadas dos nutrientes abundantes nos alimentos lácteos (9).

Em vários estudos a ingestão de leite com a lactose hidrolisada tem reduzido os sintomas em pessoas intolerantes a esse carboidrato. A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição ou com um teor reduzido desse carboidrato (10).

Além disso, existem produtos utilizados como suplementos alimentares para o tratamento de indivíduos intolerantes a lactose. Esses produtos são comercializados em forma de cápsula ou comprimidos. Mas esses produtos comercializados não são idealmente adequados para a hidrólise da lactose *in vivo* (11).

Assim, este estudo propõe produzir e purificar uma β -galactosidase expressa por fungos filamentosos do Bioma Cerrado que seja eficiente para amenizar os sintomas da intolerância à lactose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INTOLERÂNCIA A LACTOSE

A lactose (beta-galactosil-1,4-glicose) é um dissacarídeo (β -galactosídeo) composto de glicose e galactose. A única fonte natural desse carboidrato é o leite dos mamíferos que possuem placenta. Ela constitui a primeira fonte de carboidrato para os bebês de mamíferos. Esse carboidrato é sintetizado nas células epiteliais das glândulas mamárias (12), mediante uma reação que depende de duas proteínas, a alfa-lactalbumina e a enzima N-acetil-galactosil-transferase (13). Sua concentração no leite varia segundo a espécie, sendo, por exemplo, de cerca de 7% no leite humano.

A lactose tem como característica baixa solubilidade em água (15 a 20%) e baixo poder adoçante quando comparada a outros açúcares. Quando comparada a sacarose, é cerca de dez vezes menos solúvel e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior (14).

Juntamente com as substâncias minerais como fósforo, sódio e cloretos, participa da atividade osmótica do leite. A retirada da lactose pode reduzir mais de 50% o ponto de congelamento do leite (10).

A molécula de lactose contém um sítio ativo em cada monômero de sua estrutura, o que a torna sensível a modificações enzimáticas ou químicas, sendo esta uma característica comum aos carboidratos (15).

Fisiologicamente, a lactose é uma substância energética e seus monossacarídeos entram na constituição de cerebrosídeos, abundantes na massa cerebral e mielina nervosa. No organismo humano age como uma promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês. Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução da radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (15).

Para ser absorvida a lactose tem que ser hidrolisada para produzir os monossacarídeos glicose e galactose, que então, são absorvidos por transporte ativo pelas células epiteliais intestinais (16). Essa reação é realizada pela enzima β -galactosidase.

No intestino delgado humano existem, normalmente, três enzimas com atividade beta-galactosidásica, denominadas neutra, beta-galactosidase ácida e hetero-beta-galactosidase. Para a hidrólise da lactose, a beta-galactosidase mais importante é a lactase neutra, que age em pH ótimo igual a 6,0 e tem massa peso molar de próximo a 280 kDa (17).

A lactase neutra está presente no bordo estriado do enterócito e possui atividade máxima nas células diferenciadas das vilosidades intestinais, e quase nula nas células das criptas assim como todas as dissacaridasas. As outras duas beta-galactosidasas, beta-galactosidase ácida lisossômica e hetero-beta-galactosidase citoplasmática, não têm ação na hidrólise da lactose. A lactase neutra é enzima característica do intestino de quase todos os mamíferos em sua primeira infância e apresenta maior atividade no duodeno e no jejuno proximal. As poucas espécies de mamíferos que não produzem lactose no leite também não possuem lactase intestinal (18, 19).

Uma das características mais interessantes da lactase neutra é a correlação entre sua atividade e o desenvolvimento intestinal. Assim, na espécie humana, ela já está presente no terceiro mês de vida intra-uterina e sua atividade atinge o máximo durante o período perinatal. A partir do desmame ela diminui, sendo que o adulto possui atividade da lactase 10 a 20 vezes menor que o recém-nascido. Essa diminuição é fisiológica em todos os mamíferos, exceto em alguns grupos étnicos humanos e, possivelmente, em alguns outros primatas (18).

Na ausência da β -galactosidase a lactose não é digerida. Sendo assim, quando estes alimentos são consumidos pelo homem e não existe a presença da β -galactosidase em concentrações suficientes no organismo, a lactose conforme passa pelo cólon é fermentada por bactérias havendo produção de ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente láctico e acético (20) e libera gases, como o hidrogênio, o dióxido de carbono, o nitrogênio e o metano (21). O fato dos produtos da ação das bactérias acidificarem o meio, aumentando a osmolaridade e as contrações peristálticas do músculo circular do cólon, diminuindo a reabsorção de água pelo intestino grosso resulta em diversos sintomas. Esses sintomas são cólicas, flatulência, desconforto abdominal e diarreia osmótica (9). Esse processo é chamado de intolerância a lactose, uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como deficiência de lactase do adulto. Ela ocorre devido aos baixos níveis, ou até a ausência da atividade da enzima β -galactosidase no aparelho

digestivo, conseqüência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade (22). A forma congênita de deficiência de lactase é muito rara. Enquanto a não persistência de lactase do tipo adulto é muito comum e afeta cerca de três quartos da população mundial, onde 25% são brasileiros. Há informações que o número de afetados pode ser de até 75% da população mundial, prevalecendo entre americanos e asiáticos (23).

A intolerância a lactose pode ser primária ou secundária. A malabsorção primária de lactose, que pode ser congênita ou adquirida, consiste de deficiência pura da atividade da lactase neutra com mucosa intestinal normal, e valores normais de todas as outras enzimas intestinais, isto é, as outras dissacaridases e as outras duas beta-galactosidases (24, 25).

A intolerância à lactose congênita é uma condição primária, onde há ausência total de lactase neutra desde o nascimento (19). É rara, tem determinação genética, sendo, provavelmente, um caráter autossômico recessivo (26). O quadro clínico aparece nos primeiros dias de vida e se caracteriza por diarreia grave que pode levar à desidratação e à desnutrição (25).

A intolerância à lactose adquirida é também condição primária, em que a atividade da lactase, que é normal ao nascimento, diminui durante a infância e adolescência e permanece muito baixa durante a vida adulta. A diminuição chega a níveis de 5 a 10% em relação ao nascimento e pode ocorrer desde os seis meses até os 20 anos de idade (27). É condição freqüente e transmitida hereditariamente de modo autossômico recessivo. A intolerância à lactose do adulto não é condição anômala, mas sim o estado normal dos mamíferos inclusive a maioria dos homens. É chamada também de malabsorção ontogenética da lactose (28).

A intolerância à lactose secundária de lactose pode ocorrer secundariamente às alterações da estrutura histológica do intestino delgado. Sabe-se que a atrofia da mucosa intestinal leva a uma redução da atividade de todas as dissacaridases, mas a mais atingida é a lactase que chega a 19% do valor normal. A melhora histológica é acompanhada da normalização das dissacaridases com exceção da lactase, pois esta enzima pode demorar semanas ou meses para voltar aos níveis anteriores (18).

A deficiência de lactase pode ser identificada por vários métodos, cada um dos quais apresenta vantagens e desvantagens. Assim, a deficiência de lactase pode ser diagnosticada diretamente mediante dosagem da atividade da enzima na

mucosa intestinal e, indiretamente, por vários métodos baseados na sobrecarga de lactose - curva glicêmica, pesquisa de substâncias redutoras nas fezes, glicose e pH fecal, dosagem da lactosúria e medida do hidrogênio molecular expirado. A presença de sintomas gastrointestinais após a sobrecarga da lactose correlaciona-se geralmente, com a deficiência de lactase e possibilita o diagnóstico de intolerância à lactose (18).

A redução ou eliminação de leite e derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína, riboflavina e cálcio (29, 30). A intolerância é aliviada quando há o consumo exógeno de suplementos contendo a enzima β -galactosidase concomitante a ingestão de produtos derivados de leite. As principais enzimas exploradas para uso nos suplementos são obtidas de fungos que geralmente são reconhecidos como sendo seguros (GRAS), como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (31-33).

Tais preparações tradicionais são invariavelmente vendidas como cápsulas ou tabletes que contém apenas enzimas, e tais enzimas não são otimamente adaptadas aos ambientes do estômago ou do intestino delgado.

2.2. A ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE

Lactase é o nome popularmente utilizado para a enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23). Essa enzima é classificada como uma hidrolase com capacidade de transferase para grupos galactosila. A lactase possui duas atividades catalíticas. Primeiramente a lactase catalisa o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4glc) para formar glicose e galactose, enriquecendo o produto hidrolisado com galactooligossacarídeos (34, 35). Depois essa enzima converte a lactose em outro dissacarídeo a alolactose. A enzima é bastante específica para o açúcar na posição galactosil, mas é habilitada para hidrolisar β -D-galactopiranosídeos com uma ampla variedade de aglicona. Por essa particularidade a alolactose é finalmente convertida pela enzima em galactose e glicose (Figura 1)(36).

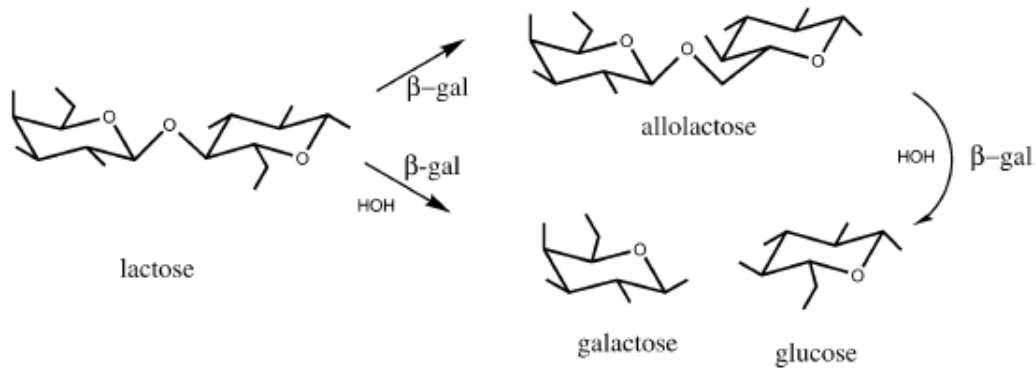


Figura 1: Esquema representando a atividade catalítica da β -galactosidase frente à molécula de lactose (36).

As β -galactosidases são encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, animais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com sua origem (37). Ela pode ser produzida por fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo os fungos filamentosos e as leveduras as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais (38).

A possibilidade de explorar a atividade da β -galactosidase surgiu com a introdução de diversos substratos com propriedades cromogênicas. Alguns exemplos de substratos incluem X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) e ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) (36).

As propriedades das β -galactosidases dependem de diversos fatores e variam de acordo com microrganismo produtor (Tabela 1). A lactase extraída da *Escherichia coli* possui a maior massa molecular (520 KDa a 850 KDa), enquanto as de menor massa molecular foram extraídas de *Saccharoyces fragilis* (201 KDa) e *Aspergillus oryzae* (90 KDa) (31). A temperatura e o pH ótimos diferem de acordo com a fonte de obtenção de cada enzima e também de acordo com o método de preparação comercial. O método de imobilização da enzima e o tipo de suporte também podem influenciar as condições ótimas de operação (31).

Tabela 1: Características bioquímicas de lactases expressas por micorganismos.

Fontes	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molar (kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,6	35	135
<i>Echerichia coli</i>	7,2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 – 65	
<i>Bacillus SP</i>	6,8	65	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 – 45	
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 – 57	530
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 – 7,5	55	500 – 600
<i>Mucor pusillus</i>	4,5 – 6,0	60	
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 – 5,5	80	570

Fonte: Modificado (31).

A β -galactosidase teve a sua estrutura determinada primeiramente, como um cristal monocíclico com quatro tetrâmeros independentes em uma unidade assimétrica (36). Outra forma de cristal foi identificada, esse era formado por único tetrâmero em uma unidade assimétrica (39). Os tetrâmeros da β -galactosidase são compostos por quatro cadeias de polipeptídeos, cada uma contendo 1023 aminoácidos (40).

A estrutura cristalina da β -galactosidase é indicada por um tetrâmero com simetria pontal 222 com dimensões de 175x135x90Å ao longo dos eixos de ordem 2. Essa estrutura consiste de quatro subunidades idênticas do tipo α 4 (Figura 2), os monômeros são compostos de cinco domínios e 50 resíduos adicionais no N-terminal. A participação desse segmento amino-terminal no estabelecimento da interface entre duas subunidades está de acordo com a observação de que cada monômero ativo é formado por elementos de duas subunidades diferentes. Este fenômeno é conhecido como α complementação (36). O primeiro domínio corresponde a um barril de fitas β . O segundo domínio apresenta uma conformação fibronectina-III típica e é responsável pelo reconhecimento e pelo estabelecimento

da interface com o monômero vizinho. No terceiro domínio encontram-se o sítio catalítico e o metal divalente coordenado. O quarto domínio é similar ao segundo. O quinto domínio é formado por um sanduíche de fitas β e contribui com o resíduo W 999 (W = TRP) no sítio ativo (Figura 2)(36, 41).

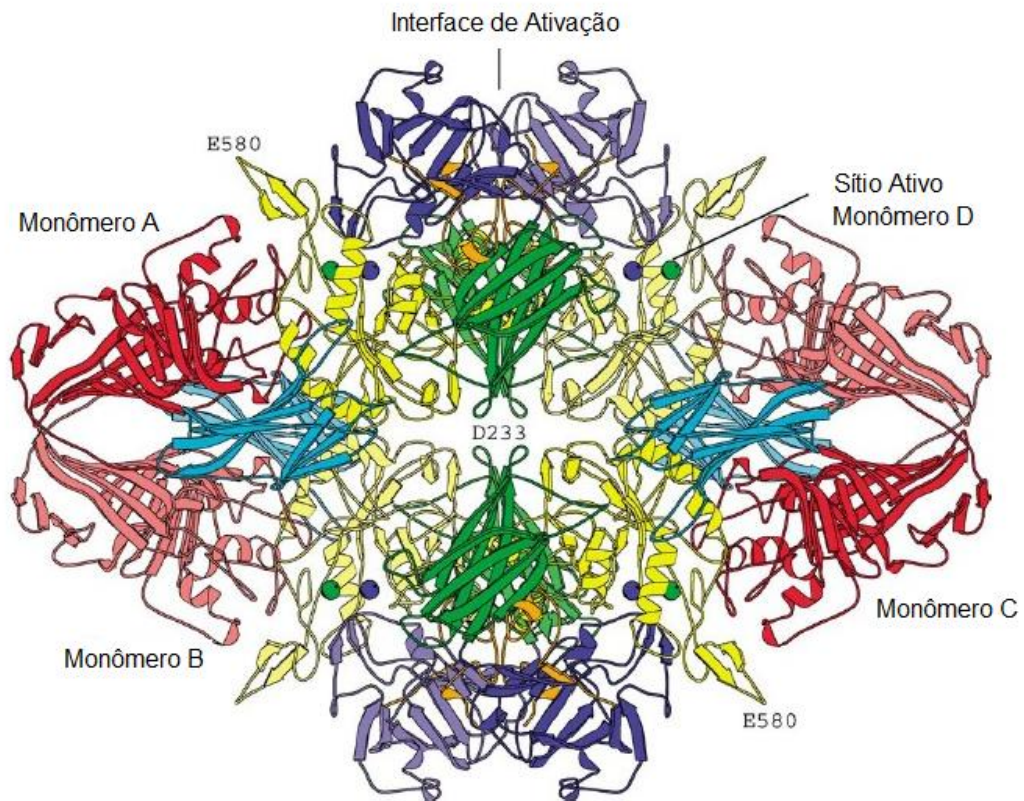


Figura 2: Vista do tetrâmero da β -galactosidase. Cada cor representando um domínio, incluindo os peptídeos de cor laranja. Domínio 1, azul; domínio 2, verde; domínio 3, amarelo; domínio 4, roxo; domínio 5; vermelho. As tonalidades mais claras e mais escuras de uma determinada cor são usadas para distinguir o mesmo domínio em diferentes subunidades. Os cátions de metal em cada um dos sítios ativos são mostrados como esferas: Na^+ , verde e Mg^{++} , azul (36).

2.3. APLICAÇÕES DE β -GALACTOSIDASES

Os mamíferos em geral são animais relativamente dependentes da produção de β -galactosidase no intestino. A ausência desta enzima implica na não digestão da lactose consumida por esta série animal. E neste sentido esta enzima desperta grande interesse à saúde humana.

A ingestão oral direta da β -galactosidase por pessoas intolerantes a lactose é uma forma diferente de aplicação da β -galactosidase, visando à remoção da lactose do leite e seus derivados. A vantagem deste método é a flexibilidade: não é necessária a hidrólise da lactose no produto e não há nenhuma demora na hidrólise em nível intestinal (42). A β -galactosidase derivada de *Aspergillus oryzae*, oralmente administrada, foi efetiva na prevenção da má absorção da lactose em crianças (43). Existe uma variedade para administração oral, contudo, o tratamento não é indicado para os indivíduos que ingerem a lactose equivalente a um copo de leite ou menos por refeição (29, 42). O uso da β -galactosidase, produzida através de microrganismos, como suplemento digestivo, vem sendo estudado (11, 44, 45). Mas ainda é necessário mais pesquisas para que seja feito um produto eficaz e seguro.

Além da ingestão da β -galactosidase, esta enzima vem sendo aplicada na indústria de laticínios para hidrolisar a lactose do leite obtendo-se assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (46). A preocupação com uma alimentação com efeitos benéficos para a saúde tem aumentado a demanda por produtos alimentícios com essas características (47), dando suporte para novas pesquisas nesta área.

Existem duas formas de se fazer a hidrólise da lactose. Pode ser feita a hidrólise ácida ou a hidrólise enzimática. Quando se utiliza ácidos como catalisadores a reação é extremamente rápida. A temperatura no tratamento ácido é bem maior que no tratamento enzimático (150°C e 30°C e 40°C respectivamente), mas os produtos adquirem cor e odor que impedem a sua utilização direta com alimentos. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as suas propriedades, aumentando o seu poder adoçante relativo (37).

Em um estudo baseado no fato de que a hidrólise da lactose promove uma redução no ponto de congelamento, os autores aperfeiçoaram a utilização do soro em produtos congelados derivados do leite. O tratamento com β -galactosidase de sorvetes, leite gelado, leite batido e sobremesas geladas de baixa caloria contendo soro, resultou em produtos com boas características físicas e qualidade organoléptica. Segundo esses pesquisadores, a β -galactosidase reduz o problema associado com a cristalização da lactose, aumenta a doçura e permite a redução da sacarose nas formulações e pode melhorar as características de qualidade, tal como consistência (48).

Além do leite, uma das principais fontes de lactose é o soro de leite, que é um produto fundamental na fabricação do queijo. Cerca de 9 litros de soro de leite são gerados durante a produção de 1 kg de queijo. Tendo assim cerca de 160 milhões de toneladas de soro de leite produzido no mundo a cada ano. A indústria de derivados de leite tem o problema de excesso de soro, que é dispensado em rios. O desenvolvimento de novos produtos e a expansão do mercado da lactose do soro, bem como uma tecnologia que possibilite o processamento econômico do soro e fabricação de produtos com lactose hidrolisada, serão críticos para converter os gastos no tratamento de rios poluídos com o soro em produtos benéficos para a indústria de derivados de leite (29). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser usadas para produzir etanol a partir do soro de queijo hidrolisado, tendo aplicação não só na indústria alimentícia (49, 50).

A lactose tem inúmeras aplicações principalmente devido as suas características físico-químicas em relação a outros açúcares. Na indústria de alimentos pode ser utilizada na preparação de condimentos, de produtos para confeitarias e padarias, e para o uso como xarope (51). A glicose e galactose, obtidas com a hidrólise da lactose, servem de substrato para a fermentação das leveduras durante o processo de fabricação do pão, além de auxiliarem na formação da crosta do produto final (52).

Ainda com relação à panificação, o xarope de soro com lactose hidrolisada tem permitido redução na quantidade de proteína de ovos e açúcar adicionados (29).

Outra utilidade da β -galactosidase vem sendo ressaltada por sua propriedade de gerar derivados de lactose através de transgalactosilação para formar galactooligosacarídeos (GOS), considerando alimentos funcionais. Por não serem digeridos, os GOS podem alcançar a microbiota no cólon e promover a proliferação

de *Bifidobacterium*, o que faz deles importantes aditivos em fórmulas infantis e em outros produtos lácteos (4, 53, 54).

A β -galactosidase pode ser aplicada na indústria de duas formas: como “free enzyme”, enzima em solução, ou como uma enzima imobilizada em biorreator (55). A abordagem “free enzyme” é uma técnica simples, mas a enzima solúvel dificilmente pode ser reutilizada, o que representa uma desvantagem, pois eleva os custos das preparações enzimáticas. No entanto, tecnologias de membranas, a maioria baseadas em membranas de ultrafiltração, tem sido exploradas para a recuperação e reutilização da enzima solúvel (47, 56, 57). A tecnologia de imobilização em biorreator proporciona a reciclagem da enzima e a possibilidade de operação contínua, e pode em alguns casos resultar em maior estabilidade da enzima. A principal desvantagem é a pouca permeabilidade das membranas celulares à lactose, embora a permeabilidade das células microbianas ser aumentada através de tratamento com agentes químicos, detergentes ou solventes (57, 58).

Atualmente apenas lactases produzidas por *Kluyveromyces* spp e *Aspergillus* spp, são considerados como seguros pelo GRAS (Generally Recognized as Safe) (33). Os insumos produzidos por esses microrganismos são comumente utilizados nos processos industriais (51, 57-59). O fungo *Aspergillus* spp produz lactase extracelular, que apresenta valores ácidos de pH ótimo entre 2,5 - 5,4 e uma temperatura ótima alta de 50°C (51, 58). Sua principal aplicação é na hidrólise ácida de soro de queijo resultando em queijos frescos (53). Já a lactase de *Kluyveromyces* spp é produzida intracelularmente, ela é transportada para o interior da levedura por uma permease, onde é hidrolisada em glicose e galactose, que seguem então a via glicolítica ou o caminho de Leloir, respectivamente (60). Essa lactase possui um pH neutro (6,0 – 7,0), o que permite uma gama de aplicações mais ampla. Uma de suas aplicações é a hidrólise de leite (51, 53, 58).

2.4. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Os produtos de origem microbiana (bioprodutos ou biomoléculas), dos tradicionais (como o etanol) aos mais elaborados (como vetores de terapia gênica),

ocupam posição central na sociedade atual. A obtenção destes produtos normalmente é efetuada por processos de bioconversão, chamados de bioprocessos, síntese bioquímica ou ainda por extração de fontes naturais. Assim, o produto desejado pode ter sido liberado pelas células em um meio complexo após a bioconversão, ser a própria célula, ou ainda ser um metabólito celular que deve ser retirado do interior das células. Em bioprocessos, qualquer tratamento aplicado com o intuito de se extrair uma biomolécula é conhecido como “downstream processing”, ou seja, operações unitárias de recuperação aplicadas em bioprocessos e biomoléculas (61). Dentre as biomoléculas de interesse merecem destaque aquelas produzidas por microrganismos tais como peptídios, proteínas e enzimas.

Uma tendência em todo o mundo é o uso de enzimas em aplicações industriais, medicamentos e análises clínicas. As enzimas são utilizadas como biocatalisadores como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens como elevada velocidade de reação; utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos. Em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. Já em medicamentos, as grandes eficiências das enzimas aliadas à sua especificidade tornam-nas agentes de grande potencial para uso terapêutico (46).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, porém existem muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas (62).

Ao iniciar um processo de purificação de uma enzima deve-se saber qual é o grau de pureza exigido. Enzimas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em outros processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (63).

A escolha das técnicas a serem empregadas no processo de purificação está vinculada as propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a

combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Nas primeiras etapas quase sempre é desejável reduzir o volume, e para isto é frequentemente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Posteriormente são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas (cromatografia de troca iônica) pela sua relativa alta capacidade. Para as etapas finais, o objetivo quase sempre é um aumento de resolução, e para isto utilizam-se técnicas como cromatografia em gel filtração e cromatografia de afinidade. Uma estratégia geral é desaconselhável, desde que os materiais disponíveis e as necessidades para cada caso são diferentes. Frequentemente são necessários vários testes para se estabelecer as condições ideais, o método mais efetivo para o rendimento e o número de vezes de purificação almejadas. Análise via eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) pode indicar a pureza e o número de contaminantes presentes. Além disso, o massa molar da amostra e dos contaminantes podem ser determinados, e assim, auxiliar na escolha ou não de uma cromatografia em gel filtração para a separação dos contaminantes (64).

É importante ressaltar que geralmente é necessária uma concentração ao final ou entre etapas de purificação. Isso porque um volume menor de solução é mais fácil de manusear em etapas subsequentes, tais como precipitação ou cromatografias que exigem volumes pequenos. Além disso, concentrações proteicas mais altas minimizam perdas por adsorção não específica em recipientes e matrizes. A concentração pode ser obtida por remoção de água através da liofilização e por remoção do solvente através de uma membrana semi-permeável que não permite a passagem da enzima de interesse (65).

Uma técnica de fundamental importância para a purificação de enzimas, que podem ser separadas de acordo com o seu tamanho, carga, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica é a extração líquido-líquido através de Sistemas de Duas Fases Aquosas. A extração líquido-líquido é um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Dentre os diferentes tipos de sistemas de extração líquido-líquido propostos para este fim, estão os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), constituídos primeiramente por moléculas de tensoativos que tendem a formar micelas. Oferecendo simultaneamente um ambiente hidrofóbico e outro hidrofílico, o que permite a seletividade na partição de biomoléculas (66).

Esta forma de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos processos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas dependendo da aplicação final do produto a ser purificado (67). Deste modo essa técnica vem sendo muito utilizada, pois ajuda a reduzir os custos de produção.

Na literatura encontram-se relatos de diferentes técnicas sendo aplicadas na purificação de lactases fungicas e bacterianas. Como exemplo pode-se citar; β -galactosidases produzidas por *Guehomyces pullulans* e purificadas através de cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca iônica (68). Outro estudo produziu β -galactosidase por fermentação com *Aspergillus carbonarius* e esta foi purificada utilizando ultrafiltração em membranas de poros definidos, filtração em gel, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de troca iônica, chegando a ter um fator de purificação dez vezes maior (11). Uma lactase produzida por *Bacillus megaterium* foi concentrada por precipitação com sulfato de amônio e purificada por cromatografia de afinidade. Nesse trabalho a atividade recuperada foi de 7,1% (69). Assim como no estudo citado acima, outro trabalho utilizou precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica para purificar β -galactosidases produzidas por *Athrobacter sp.* (70). Recentemente uma β -galactosidase foi purificada por sistema aquoso bifásico compostos por polietilenoglicol (PEG), poliacrilato de sódio (PAS), água e NaCl. As concentrações dos polímeros, pH e temperatura, foram variadas de acordo com um delineamento fatorial completo seguido de um deslocamento ascendente para auxiliar e determinar a melhor condição de extração. Os melhores resultados foram observados para o sistema composto por 11% p/p de PEG, 12% p/p de PAS e 1 % p/p de NaCl em pH 8 a 25°C. Foram realizadas análises da eficácia do sistema considerado ideal adicionando um extrato bruto enzimático contendo β -galactosidase e calculando os valores para fator de purificação e rendimento. Os resultados encontrados mostraram que este sistema é eficiente na separação da enzima estudada, sendo, portanto, uma alternativa promissora para a obtenção e purificação da mesma para diversos fins (6).

Outro trabalho mostrou a aplicação da extração em duas fases aquosas, para a separação e purificação simultânea de β -galactosidase e β -glucosidase de cevada (*Hordeum vulgare*). Para isso foi usado polietilenoglicol como polímero. Isso resultou em uma recuperação da atividade de 98,26% para β -galactosidase e de 92,58% para β -glucosidase (71).

2.4.1. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Os sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA) são constituídos primariamente por moléculas de tensoativos que tendem a formar micelas. Oferecendo simultaneamente um ambiente hidrofóbico e um ambiente hidrofílico, o que permite a seletividade na partição de biomoléculas (66).

Na composição destes sistemas, são empregados tensoativos adicionados a soluções aquosas, que formam duas fases imiscíveis. O elevado teor de água das fases formadas, de 75 a 90% em massa, garante a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas de interesse. Assim, biomoléculas podem ser purificadas em decorrência da migração diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as fases líquidas (61).

Agentes tensoativos são moléculas anfífilas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (i) iônicos (possuindo cabeça positivamente carregada – catiônicos – ou negativamente carregada – aniônicos), (ii) não-iônicos (possuindo uma cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água), e (iii) zwitteriônicos (possuindo uma cabeça caracterizada por um dipolo) (72).

Embora agentes tensoativos iônicos (dodecil sulfato de sódio), possam se ligar a proteínas resultando em sua desnaturação existe tensoativos não carregados (Triton X-114, óxido de n-deciltetraetileno ($C_{10}E_{14}$)) que não se ligam de forma intensa as biomoléculas, portanto não as desnaturam. Assim os SMDFA montados com agentes não carregados, proporcionam um ambiente muito mais compatível e ameno com as biomoléculas (61, 73). As micelas, por serem suscetíveis a modificações em sua estrutura, possibilitam o controle e otimização da partição de biomoléculas pelo ajuste das suas características como tamanho e forma através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais. Além disso, a seletividade da partição pode ser melhorada com a utilização de ligantes de afinidade específicos à biomolécula-alvo ou misturas de tensoativos iônicos e não-iônicos (73).

Dependendo da concentração, os agentes tensoativos, em solução aquosa, podem exibir diversos tipos de comportamento. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas de tensoativo adsorvem na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água e, portanto diminuindo a tensão existente na interface ar-água. Como os tensoativos possuem cauda apolar, em sua maioria apresentam baixa solubilidade na fase aquosa. Assim, em soluções onde a concentração do tensoativo é superior a CMC, eles tendem a formar agregados chamados micelas. Nestas as caudas hidrofóbicas se atraem minimizando o contato com a água, enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície externa da micela para maximizar este contato (66, 74).

As micelas são estruturas dinâmicas que estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras (Figura 3) e são constituídas de dezenas a milhares de monômeros de moléculas de agentes tensoativos (75). A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (72, 76). A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado às caudas apolares. A força repulsiva contrária é resultado das interações estérica (existente entre as cabeças hidratadas de tensoativos não-iônicos) e eletrostática (existente entre as cabeças possuindo cargas semelhantes) associadas às cabeças hidrofílicas. O processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas (77).

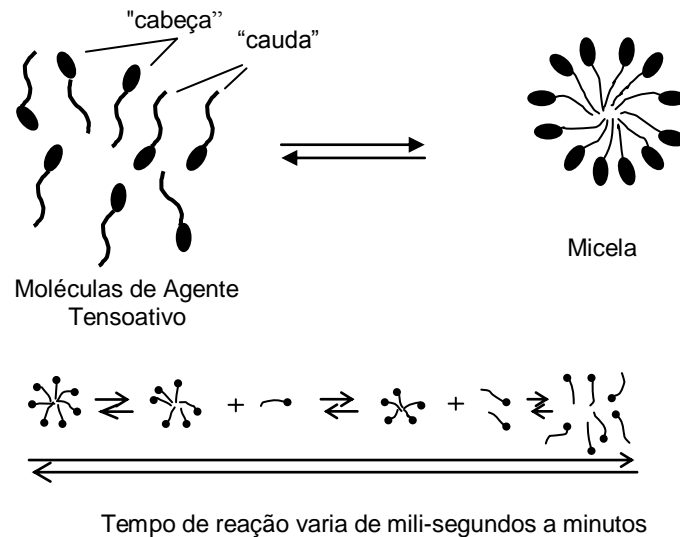


Figura 3: Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de agentes tensoativos são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Nota-se que, como indicado pelas setas, as micelas e as moléculas de tensoativos que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível.

Além da CMC, outro parâmetro que caracteriza as micelas é o número de agregação (N_{ag}), que se refere ao número médio de monômeros que constituem cada micela em solução. Neste sentido, dependendo do tipo e concentração de tensoativo, bem como das condições da solução (pH, temperatura, força iônica), micelas podem crescer unidimensionalmente na forma de cilindros ou bicamadas com o número de agregação variando conforme a concentração de tensoativo (75). O crescimento micelar é governado pelas características da cabeça polar das moléculas de tensoativo, uma vez que este fenômeno requer uma proximidade maior entre as cabeças polares. Desta forma, tensoativos iônicos na ausência de sais geralmente apresentam crescimento mínimo, formando micelas esféricas devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças igualmente carregadas. Em contrapartida, tensoativos não-iônicos podem exibir um crescimento significativo, pois a repulsão entre as cabeças é fraca, ocorrendo somente por efeito estérico e não eletrostático (74, 78).

Em determinadas concentrações de agentes tensoativos e temperaturas, uma solução aquosa micelar homogênea pode se separar em duas fases macroscópicas, ambas contendo micelas, porém com uma delas apresentando maior concentração destes agregados (Figura 4). Portanto, variando a concentração do agente tensoativo e a temperatura é possível construir uma curva denominada de *curva*

binodal ou *curva de coexistência* em forma de sino, que vai representar o limite de separação das fases.

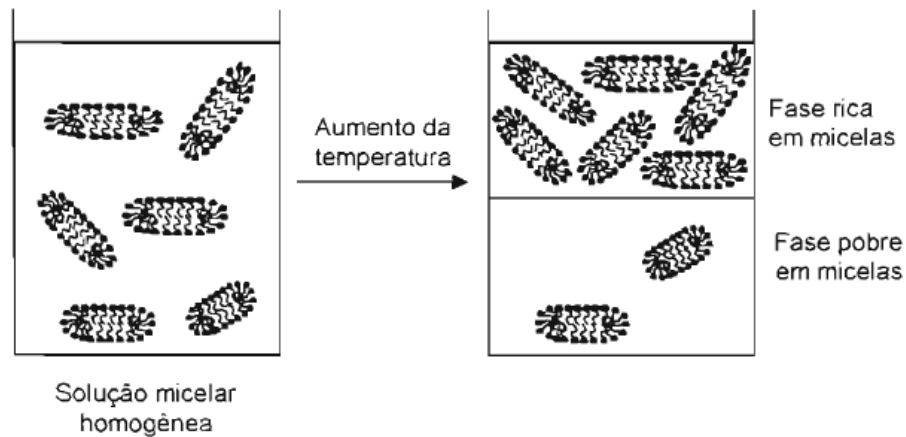


Figura 4: Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo $C_{10}E_{14}$. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas, e com o aumento da temperatura se separa em uma fase rica em micelas coexistindo com uma fase pobre em micelas (66).

A curva binodal pode apresentar concavidade para cima ou para baixo dependendo se a separação das fases é induzida pelo aumento ou diminuição da temperatura, respectivamente. A curva binodal, desta forma, representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (79). Certos tensoativos não-iônicos, como os derivados de óxido de polietileno, apresentam o fenômeno de separação de fases induzido por aumento de temperatura (80). Consequentemente, a curva de coexistência possui concavidade voltada para cima e o sistema exibe um ponto crítico inferior. A Figura 5 representa um esboço da curva binodal do sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo Triton X-114. Considerando-se que a curva binodal para este sistema apresenta concavidade para cima, o ponto mínimo é denominado “ponto crítico inferior”, sendo caracterizado pela temperatura crítica (T_c) e pela concentração crítica de agente tensoativo (X_c).

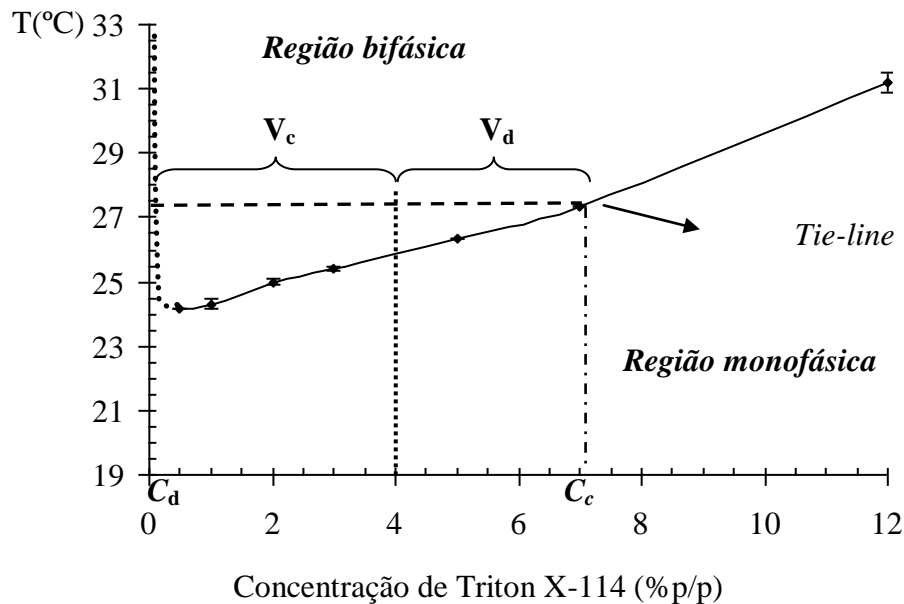


Figura 5: Curva binodal de uma solução aquosa do tensoativo Triton X-114 baseada em experimentos realizados por Lopes (2006) (81). C_d = concentração do tensoativo na fase pobre em micelas; C_c = concentração do tensoativo na fase rica em micelas; V_c = comprimento do segmento de reta da linha de amarração (tie-line) compreendido entre C_d e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases e cujo valor é proporcional ao volume da fase rica em micelas; V_d = comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_c e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases e cujo valor é proporcional ao volume da fase pobre em micelas.

Em 1956, fez-se a primeira menção ao uso do SMDFA para a purificação de proteínas e partículas de células (sobretudo, fragmentos de parede celular). Desde essa época, a extração em SMDFA tem sido aplicada à purificação de produtos obtidos em células animais, de vegetais e microbianas, extração de vírus, organelas e ácidos nucleicos, devendo-se destacar a aplicação na purificação de enzimas (7).

O primeiro estudo com a possibilidade de se separar proteínas por extração de fases, utilizou um agente tensoativo não-iônico. O tensoativo empregado para se separar uma mistura foi Triton X-114. A solução de Triton X-114 foi separada em duas fases quando a temperatura subia acima de 20°C. O trabalho mostrou que as proteínas hidrofílicas eram encontradas exclusivamente na fase pobre em micelas

enquanto que as moléculas com característica hidrofóbica se encontravam na fase rica em micelas (82).

Posteriormente verificou-se que íons metálicos e outros tipos de compostos com determinadas moléculas orgânicas de baixa massa molar também poderiam ser purificadas por SMDFA (66).

A enzima colesterol oxidase foi purificada em apenas duas etapas, SMDFA seguido de cromatografia de troca iônica. Assim conseguiram um aumento de pureza de 160 vezes e uma recuperação total de 80% da enzima (83).

A partir de então, observou-se as vantagens do SMDFA, em relação a outras técnicas de purificação de biomoléculas: ambiente favorável e ameno as biomoléculas, método seguro, possui baixo custo, gera resíduos com baixa toxicidade, é de fácil ampliação de escala, possibilita uma melhoria na seletividade e permite que a análise das amostras seja em sequência, realizada por diferentes técnicas sem causar interferências (66).

O SMDFA permitiu concentrar e purificar compostos como albumina de soro bovino (BSA), bacteriófagos, antibióticos, lisoenzimas e outras enzimas, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (66, 84). Mas para a escolha deste sistema é importante conhecer as propriedades de superfície das proteínas, tais como carga elétrica, hidrofobicidade e massa molecular (85). Assim biomoléculas podem ser purificadas em decorrência da partição diferenciada da molécula alvo e impurezas entre as fases líquidas (61).

O detergente Triton X-114, por causa da sua temperatura baixa de trabalho, tem sido aplicado extensivamente para separar proteínas em duas fases aquosas de acordo com sua hidropatia. Em estudos, foi desenvolvido um método para fracionar proteínas de membrana de beterraba de acordo com as suas hidropatias (86).

No entanto, pouco foi investigado até o presente momento a respeito da utilização destes sistemas para purificação de β -galactosidase. Desta forma, faz-se necessário um maior entendimento da influência desta molécula no sistema, incluindo estudo de curvas binodais, bem como estudo das principais forças envolvidas na partição desta molécula e possibilidade de otimização da partição.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo é produzir e purificar uma β -galactosidase de *Aspergillus foetidus* isolado do Bioma Cerrado, que apresente características mais favoráveis ao ambiente gástrico do que os produtos comerciais hoje empregados na degradação de lactose. Para que o objetivo proposto seja alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Produzir a enzima β -galactosidase de *Aspergillus foetidus* em meio líquido;
- Avaliar a produção da β -galactosidase por *Aspergillus foetidus* em diferentes fontes de carbono;
- Purificar uma β -galactosidase utilizando sistema micelar de duas fases aquosas;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

O fungo filamentoso *Aspergillus foetidus* isolado e identificado foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Edivaldo Ximenes do Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

4.2. MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

As cepas de *Aspergillus foetius* foram repicadas em meio de cultura BDA (Agar batata dextrose) e mantidas por sete dias a 28°C. Posteriormente, a cultura foi raspada e diluída em NaCl 0,9% com 4 mL de Tween 80 até formar uma solução homogênea. Essa solução foi utilizada para fazer os repiques das fermentações em meio líquido. Para cada 100 mL de meio foi colocado 1 mL da solução acima citada.

4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O *Aspergillus foetidus* foi investigado em relação a sua habilidade de produzir β -galactosidase extracelular. Os estudos de investigação iniciais foram realizados em meio próprio para a busca de β -galactosidase. Foi realizada fermentação em meio líquido. Meios com diferentes fontes de carbono foram testados, como lactose, farelo de trigo, resíduos de feijão, resíduos de soja e casca do grão de soja. O meio líquido foi composto de 2,0% de fonte de carbono, 0,4% de peptona, 0,4% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,8% de fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$) e 0,25% de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4\text{6H}_2\text{O}$) (87). As fermentações foram realizadas por 20 dias a 28°C em 120 rpm. A cada dia uma alíquota de caldo

fermentado, foi retirada e centrifugada por 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -4°C . Em seguida foram realizadas fermentações por sete dias nas mesmas condições.

4.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO

Após sete dias de fermentação a 28°C com agitação de 120 rpm, o extrato bruto foi filtrado em papel de filtro utilizando bomba de vácuo. Ao filtrado foi adicionado Azida sódica e logo após, armazenado a -20°C .

4.5. DOSAGEM DE β -GALACTOSIDASE

4.5.1. Preparo das soluções

Tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4

Solução de ácido acético 0,2 M	8,8 mL
Solução de acetato de sódio 0,2 M	41,2 mL
Água destilada (q.s.p.)	200 mL

Tampão Fosfato de Sódio 1,0 M, pH 7,0

Fosfato de Sódio Monobásico 0,2 M	39,0 mL
Fosfato de Sódio dibásico 0,2 M	61,0 mL
Água Destilada q.s.p.	200 mL

Solução Ortho-nitrophenol- β -D-galactopiranosideo (ONPG) 3 mM pH 7,0

ONPG (Sigma-Aldrich) 3 Mm	4,52 mg
Tampão Fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0	5 mL

Solução de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) 0,1 M

Carbonato de Sódio 0,1 M	1,59 g
Água Destilada q.s.p.	150 mL

4.5.2. Ensaio da atividade enzimática de β -galactosidase

O teste de atividade da β -galactosidase foi baseado em Nagy *et al.* (87). Uma alíquota do caldo fermentado (0,5 mL) foi incubada com o substrato (0,5 mL de Ortho-nitrophenol- β -D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich), 3 mM, diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0) por 30 min a 30 °C. Foi utilizado como solução de parada 2 mL de Na₂CO₃ a 0,1 M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 410 nm (Shimadzu Spectrophotometer, UV-1800). Para a eliminação de interferentes na quantificação enzimática, foi feito um controle onde se substituiu o volume da enzima pelo tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, denominado Branco do Substrato. Também foi feito o Branco da Enzima onde se substituiu o volume do substrato pelo mesmo tampão já citado.

A curva padrão foi construída com solução de Ortho-nitrophenil (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 13,6mg/mL; 27,2mg/mL; 40,7mg/mL; 54,3mg/mL; 67,9 mg/mL; 81,5mg/mL; 95,1mg/mL; 108,7mg/mL; 122,3mg/mL; 135,8mg/mL; 149,5mg/mL; 163mg/mL; 176,7mg/mL; 190,3mg/mL e 203,8mg/mL. Uma unidade de atividade enzimática de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de O-nitrophenil por minuto.

4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

4.6.1. Preparo das soluções

Reagente de Bradford

Comassie Brilliant Blue G-250	100 mg
Metanol 95%	50 mL
Ácido Fosfórico 85%	100 mL
Água Destilada q.s.p.	1000 mL

A solução do reagente de Bradford foi mantida em agitação por 24 horas. Posteriormente a solução foi filtrada em papel de filtro e armazenada em frasco âmbar.

4.6.2. Ensaio da quantificação de proteínas totais

A dosagem de proteína total foi realizada utilizando o reagente de Bradford (88). Uma alíquota do caldo fermentado (200 μ L) foi adicionada a 2 mL do reagente de Bradford, permanecendo em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm (Shimadzu Spectrophotometer, UV-1800).

4.7. EFEITO DA TEMPERATURA E pH VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE TÉRMICA

4.7.1. Preparo das soluções

Solução A 50 Mm

Ácido Cítrico	1,9 g
Água Destilada q.s.p.	200 mL

Solução B 50 mM

Fosfato de Sódio dibásico	1,8 g
Água Destilada q.s.p.	200 mL

Solução C 50 mM

Fosfato de Sódio monobásico	1,37 g
Água Destilada q.s.p.	200 mL

Tabela 2: Preparo das soluções tampões

Tampão	pH	Solução A (mL)	Solução B (mL)	Solução C (mL)
Citrato Fosfato	2,0	24,0	1,0	-
Citrato Fosfato	2,6	23,3	2,6	-
Citrato Fosfato	3,0	19,9	5,1	-
Citrato Fosfato	3,6	16,95	8,0	-
Citrato Fosfato	4,0	15,35	9,9	-
Citrato Fosfato	4,6	13,35	11,65	-
Citrato Fosfato	5,0	12,15	12,85	-
Citrato Fosfato	5,6	10,5	14,5	-
Citrato Fosfato	6,0	8,95	16,05	-
Citrato Fosfato	6,6	6,8	18,2	-
Fosfato de Sódio	7,0	-	15,25	9,75
Fosfato de Sódio	7,6	-	21,75	3,25
Fosfato de Sódio	8,0	-	23,7	1,33

No teste de pH ótimo a dosagem enzimática foi realizada como descrito no item 4.5. O substrato ONPG (3 mM) foi diluído em tampão citrato fosfato 50 mM para os valores de pH 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0 5,6; 6,0 e 6,6 e para os valores de pH 7,0; 7,6 e 8,0 foi utilizado o tampão fosfato de sódio 50 mM. A atividade enzimática da enzima de interesse foi avaliada variando o pH da solução contendo o substrato nos valores citados acima, como descrito na literatura (89).

A temperatura *versus* atividade enzimática foi determinada baseada na literatura (87). A quantificação da atividade enzimática da β -galactosidase do caldo fermentado (fermentação com sete dias) foi realizada como descrito no item 4.5.2, mas com diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80°C). Considerando os resultados obtidos na avaliação do pH ótimo, o teste de temperatura ótima foi realizado em pH 3,0; 4,6 e 7,0.

O teste de estabilidade térmica foi realizado quantificando a atividade enzimática como no item 4.5.2, em diferentes tempos de incubação. Os tubos testes permaneceram incubados a 30°C de 30 minutos a 8 horas. A cada hora sequências de tubos foram retiradas do banho Maria e a dosagem enzimática realizada como já mencionado acima.

4.8. SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO

Foi realizada a separação fracionada das proteínas presentes no caldo fermentado através de sistema de filtração tangencial (Amicon-Millipore) a vácuo utilizando-se de membranas com poros definidos em 100 kDa e 30 kDa, separadamente. Do extrato bruto, foram separadas 4 frações denominadas: fração maior que 100 kDa, menor que 100 kDa, maior que 30 kDa e menor que 30 kDa. A quantificação de proteína presente no meio foi determinada pelo método de Bradford (88) e a atividade de enzimática determinada como citado no item 4.5.2. O perfil proteico do extrato foi avaliado por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.9. ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

4.9.1. Condições de Corrida

As eletroforeses sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases de diferentes porosidades e valores de pH, na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). O aparelho utilizado foi um Ready Gel® (Bio Rad), com placas de vidro (10 x 8 cm) onde os géis foram montados. A cuba para eletroforese foi preenchida com tampão Tris/Glicina pH 8,9, diluído 1:10 em água destilada com 1,0% de SDS antes do início de cada corrida. A separação eletroforética das proteínas foi conduzida sob corrente constante de 30 mA.

4.9.2. Preparo dos géis desnaturantes (SDS-PAGE)

Géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio (APS) e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos foram preparados em duas fases, chamada de sistema descontínuo, que consiste de géis, concentrador e separador (90).

Os géis concentrador e separador foram preparados com os componentes a seguir:

4.9.2.1. Gel Concentrador

Soluções	Concentração 5%
Água destilada	2,8 MI
Acrilamida: Bis-Acrilamida (30%, 8%)	830 μ L
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,26 mL
SDS 10%	50 μ L
APS 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L

4.9.2.2. Gel separador

Soluções	Concentração 10 %
Água destilada	2,33 mL
Acrilamida: Bis-Acrilamida (30%, 8%)	1, 33 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,26 MI
SDS 10%	50 μ L
APS 10%	25 μ L
TEMED	2,5 μ L

4.9.3. Preparo das amostras

As amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas separadamente em função do objetivo final da revelação. Elas foram precipitadas em frascos tipo “Eppendorf” com acetona (PA) gelada obtendo um precipitado de 200 μ g de proteína.

As amostras para determinação de proteínas no gel foram resuspensas adicionando-se 20 μ L de tampão da amostra (2% SDS, 2% β -mercaptoetanol, 20 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 4 mM EDTA, 0,015% (w/v) bromofenol azul) e mantidas por 5 minutos a 100°C. Os volumes foram cuidadosamente injetados no

gel de eletroforese e após a corrida, as bandas de proteínas foram reveladas por técnicas de coloração com Azul de Coomassie.

4.9.4. Coloração com Azul de Coomassie

As bandas proteicas presentes no SDS-PAGE foram visualizadas após sua incubação por 12 horas a temperatura ambiente, em 0,1 g de Azul de *Coomassie* R-250 dissolvido em solução fixadora (45 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial e 45 mL de água destilada). Após este tempo de incubação na solução corante o gel foi lavado por diversas vezes com a solução descorante (250 mL de metanol, 70 mL de ácido acético e 680 mL de água destilada) até a visualização das bandas protéicas (90).

4.9.5. Determinação da massa molar

As massas molares das proteínas presentes foram estimadas por SDS-PAGE, utilizando-se do gráfico dos logaritmos das massas molares (log PM) das proteínas padrões pelas suas respectivas mobilidades eletroforética (cm). Foi utilizado padrão de alto massa molar (GE Healthcare) de 220 a 53 kDa (Miosina 220 kDa, α -2-Macroglobulina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa e desidrogenase glutamica 53 kDa).

4.9.6. Zimograma

O gel de poliacrilamida foi preparado como descrito nos itens 4.9.2.1 e 4.9.2.2. Para a determinação da atividade de β -galactosidase no gel de poliacrilamida a amostra da fração maior que 100 kDa foi resuspensa adicionando-se 20 μ L de tampão da amostra (2% β -mercaptoetanol, 20 mM Tris-HCl pH 6,8, 40%

glicerol, 4 mM EDTA, 0,015% (w/v) bromofenol azul). As amostras não foram desnaturadas em banho fervente. Após a corrida o gel foi incubado em uma solução de 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídio (X-Gal) (25 mM) preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8 *overnight*. A hidrólise do substrato cromogênico X-Gal pela enzima β -galactosidase libera a fração cromogênica que está ligada ao açúcar presente no composto formando bandas azuis no gel de poliacrilamida.

4.10. AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO TRITON X-114 NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

Para avaliar a interferência do Triton X-114 na determinação da concentração da enzima β -galactosidase foram preparados sistemas contendo Triton X-114 a 2,0%, 4,0%, 6,0% e 8,0% (p/p), sem adição de caldo fermentado. Estes sistemas foram incubados em banho Maria nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C, até separação de fases. A leitura da atividade enzimática foi realizada como descrita no item 4.5.2 e verificado assim a interferência do tensoativo na atividade da β -galactosidase. Para a eliminação de interferentes na quantificação enzimática, foi feito um controle onde se substituiu o volume das fases ricas ou pobres em micelas pelo tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, denominado Branco do substrato. Também foi feito o Branco do tubo teste onde se substituiu o volume do substrato pelo mesmo tampão já citado.

4.11. ENSAIOS DE PARTIÇÃO EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS

Os SMDFA foram preparados em tubos de ensaio graduados de 10 mL, pela adição da fração maior que 30 kDa ou da fração maior que 100 kDa e Triton X-114 nas quantidades desejadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, resultando em sistemas de massa total de 3,0g. Os componentes do sistema micelar foram acrescentados por pesagem, o sistema foi homogeneizado de modo a exibir uma

única fase límpida e homogênea. Em seguida, o sistema foi transferido para um banho de temperatura controlada com valor previamente ajustado ao desejado e mantido em repouso por 2 horas para separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, amostras das fases superiores e inferiores foram coletadas cuidadosamente com seringas para medir o volume. Análises da concentração de β -galactosidase foram realizadas nas amostras das fases. Cada experimento de partição foi feito em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

Foi estudada a partição de β -galactosidase, presentes em caldo fermentado de *Aspergillus foetidus* (fração maior que 100 kDa e fração maior que 30 kDa). O estudo da partição foi realizado seguindo um planejamento fatorial completo de três variáveis (Tabela 3). Esse planejamento foi realizado para avaliar a melhor partição da β -galactosidase no sistema. Desta forma, se estudou a influência destas variáveis na partição da biomolécula de interesse.

Tabela 3: Níveis dos fatores utilizados no planejamento estatístico completo 2^3 empregado para estudar a influência das variáveis temperatura, concentração de Triton X-114 e concentração de β -galactosidase presente no caldo fermentado.

<i>Variáveis</i>			
Triton X-114 %(p/p)	4.0	6.0	8.0
Temperatura°C	26.0	28.0	30.0
Caldo fermentado %(p/p)	10.0	20.0	40.0

4.12. METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente calculando-se a razão volumétrica entre as fases formadas no sistema, segundo a equação (1).

$$(1) \quad R \equiv \frac{V_c}{V_d}$$

em que V_c e V_d correspondem aos volumes das fase rica em micelas (concentrada - c) e da fase pobre em micelas (diluída - d), respectivamente.

Em seguida foram calculados os coeficientes de partição, K, o qual pode ser expresso por:

$$(2) \quad K \equiv \frac{C_c}{C_d}$$

em que C_c e C_d correspondem às concentrações da biomolécula na fase rica em micelas (concentrada - c) e na fase pobre em micelas (diluída - d), respectivamente.

Além da razão volumétrica entre as fases e o coeficiente de partição, foi estudado também o efeito do volume de exclusão (EV) presente no sistema através da equação (3),

$$(3) \quad EV = \frac{\phi_c - \phi_d}{100}$$

Onde ϕ_c - ϕ_d são frações volumétricas de tensoativo nas fases concentrada e diluída, respectivamente. Além do coeficiente de partição, a eficiência do sistema em purificar a enzima β -galactosidase também foi avaliada com base no valor de recuperação da enzima β -galactosidase na fase pobre em micelas em relação à concentração de enzima presente no caldo fermentado e adicionada inicialmente ao SMDFA, sendo R(%), definido a seguir:

$$(5) \quad R(\%) = \frac{C_{lactase,d} V_d}{C_{lactase,i} V_i} \times 100\%$$

Onde, C_d e C_i correspondem às concentrações da biomolécula na fase pobre em micelas e no volume de caldo fermentado adicionado ao SMDFA, respectivamente.

4.13. ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos estão apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $\alpha = 10\%$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 90%.

Experimentos quantitativos das atividades enzimáticas no SMDFA foram realizados em triplicata, visando aplicação de análises estatísticas e os resultados foram avaliados na forma de unidade de enzima (UI/mL) após comparação com as curvas analíticas. A avaliação de diferentes variáveis (concentração de caldo, temperatura, e concentração de Triton X-114) no sistema foi realizada por meio da utilização do software GRETL, o qual também foi utilizado no delineamento experimental, através do planejamento fatorial completo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO DIFERENTES RESÍDUOS COMO FONTES DE CARBONO

A produção de β -galactosidase por *Aspergillus foetidus* em meio líquido foi avaliada na presença de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Os meios foram preparados variando os seguintes resíduos: lactose, resíduos de feijão, farelo de trigo, resíduos de soja e resíduos de casca de soja. A adição de casca de soja ao meio líquido, como pode ser observado na Figura 6 induziu a maior expressão extracelular da enzima de interesse pelo fungo.

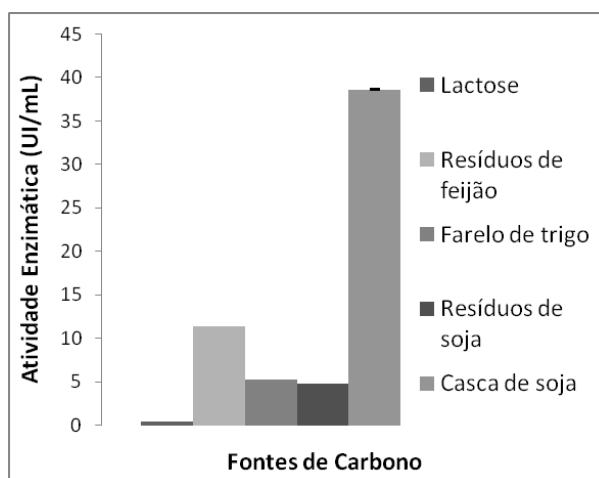


Figura 6: Dosagem das atividades enzimáticas em meio líquido contendo diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

Após a escolha da casca de soja como fonte de carbono, foi realizada uma fermentação em meio líquido por vinte dias nas mesmas condições anteriores contendo o meio líquido mais a casca de soja a 2,0%. Retirando alíquotas desta fermentação diariamente e quantificando a atividade enzimática e a concentração de proteínas no extrato bruto, foi construída uma curva de indução, onde se observou o perfil da produção de β -galactosidase pelo fungo *Aspergillus foetidus* nas condições estabelecidas anteriormente.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostraram que atividade específica para a enzima β -galactosidase foi maior em sete dias de fermentação resultando no valor de $1,4 \times 10^2$ UI/mg de proteína. Após esta quantificação as fermentações subseqüentes foram realizadas durante sete dias, apresentando uma atividade para β -galactosidase próxima a 28,0 UI/mL. Aliquotas deste caldo foram separadas com o intuito de purificar e caracterizar a enzima β -galactosidase.

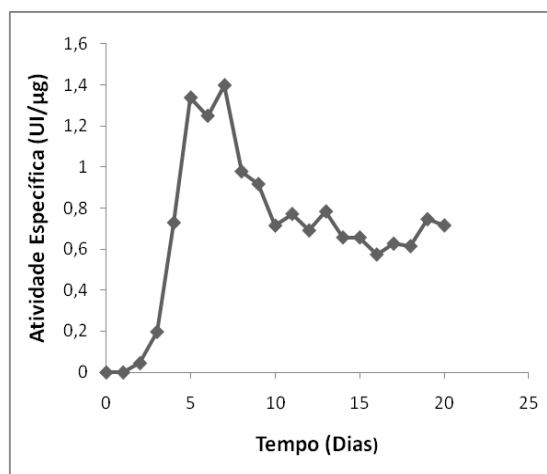


Figura 7: Curva de indução com as atividades específicas em cada dia da fermentação.

A produção de β -galactosidase pode ser realizada em diferentes tipos de meio de cultura, com diferentes fontes de carbono. No entanto, a composição do meio influenciou diretamente o processo fermentativo. Um dos substratos utilizados aumentou a produção enzimática o que é de grande interesse comercial. Nagy *et al.* (2001) utilizando meio de fermentação contendo 2% de lactose, 0,4% de peptona, 0,4% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,8% de fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 0,25% de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), realizou fermentação durante 65 horas a 25°C com o fungo *Penicillium chrysogenum* e determinou uma atividade enzimática para β -galactosidase no extrato bruto igual a 14,31 UI/mL (87). Outro meio bastante utilizado pela literatura é o composto de farelo de trigo e água (11, 91). Neste meio, O'Connell (2008), encontrou no extrato bruto 356 U de atividade enzimática (11). Santiago *et al.* (2004) utilizou lactase como fonte de carbono do meio formulado com soro de queijo para as fermentações com *Kluyveromyces marxianus* (46).

No presente trabalho, o meio de cultura utilizado para a produção extracelular de β -galactosidase pelo fungo *Aspergillus foetidus* foi avaliado e resíduos da casca de soja e o mesmo foi selecionado como melhor fonte de carbono nas condições testadas. A casca de soja é um material descartado pelos produtores de soja e pode ser obtida a baixos custos, o que é interessante para a produção industrial em grande escala de enzimas.

5.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO

A caracterização bioquímica do extrato bruto proveniente da fermentação de sete dias com resíduos da casca de soja como fonte de carbono, foi feita através de corrida eletroforética SDS-PAGE e testes enzimáticos para determinar a temperatura ótima, pH ótimo e estabilidade térmica das β -galactosidas presentes no meio. O SDS-PAGE revelou a presença de cinco bandas protéicas no extrato bruto com massa molecular variando entre 160 kDa e 55 kDa (Figura 8).

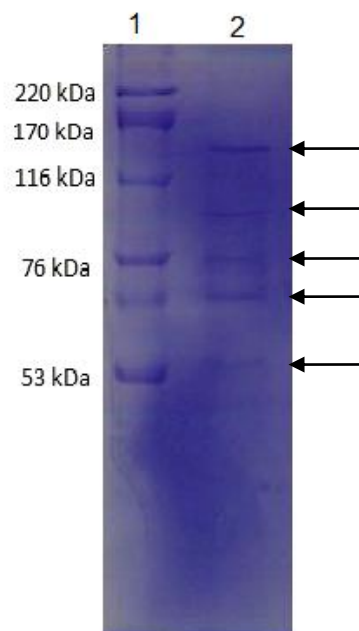


Figura 8: Eletroforese em gel de acrilamida/Bis-acrilamida, revelado com Coomassie Blue. Padrão de massa molecular (1), Extrato Bruto (2). A curva de regressão linear utilizada para estimar o massa molar das proteínas eluidas neste gel foi $y = 0,0027x + 0,3888$, $R^2 = 0,8634$

A avaliação do pH ótimo apresentou picos de atividade da enzima β -galactosidase nos valores de pH 2,6, 4,6, 6,0 e 7,0, o que pode indicar a presença de mais de uma isoforma da enzima no meio (Figura 9).

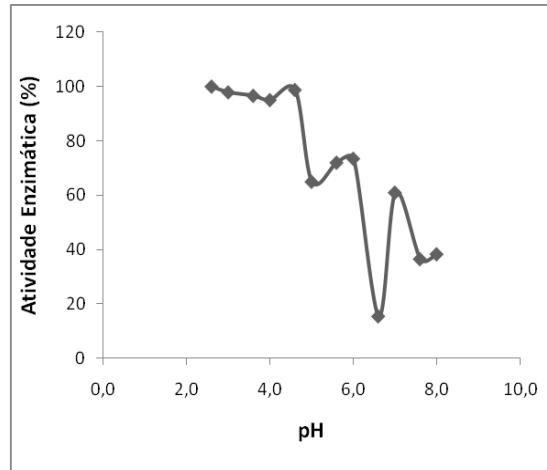


Figura 9: Determinação dos valores de pH ótimo para enzimas presentes no sobrenadante do extrato bruto após sete dias de fermentação em meio contendo casca de soja.

Em sequência a Figura 10 (A, B e C) mostra que foi com 60°C que a atividade enzimática em valores de pH ácido e neutro foi mais elevada dentro de uma variação de 20°C a 80°C.

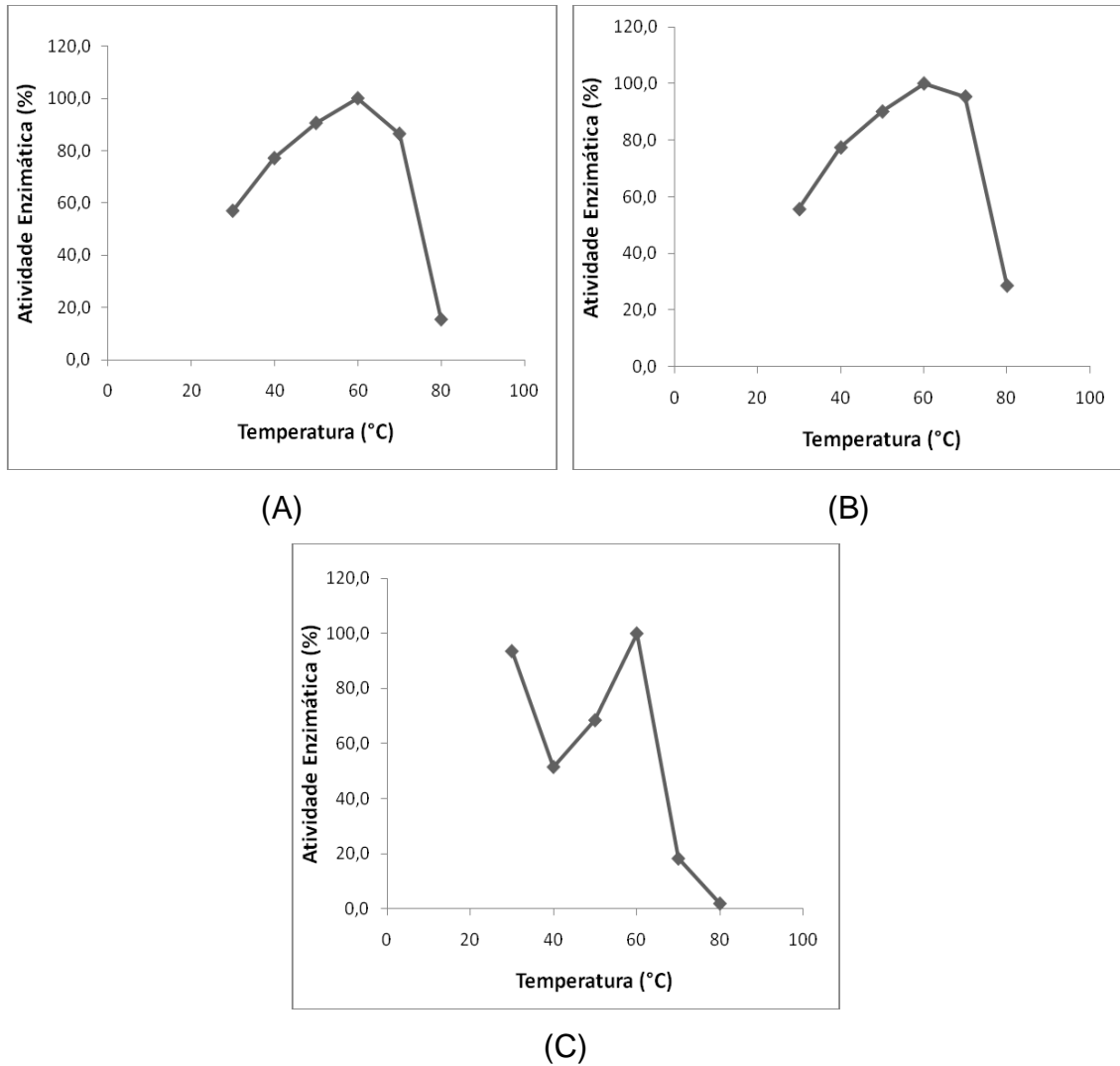


Figura 10: Determinação dos valores de temperatura ótima para enzimas presentes no sobrenadante do extrato bruto após sete dias de fermentação em meio contendo casca de soja. A: pH do substrato igual a 3,0; B: pH do substrato igual a 4,6 e C: pH do substrato igual a 7,0.

O estudo da estabilidade enzimática das lactases presentes no extrato bruto, mostrou que elas foram estáveis por pouco tempo em condições determinadas. O teste de estabilidade foi feito com o extrato bruto da fermentação de sete dias. Foi usado substrato em pH 7,0, conforme método padrão adotado para atividade enzimática e a temperatura de incubação de 30°C foi mantida durante 8 horas. A atividade enzimática com 30 minutos de incubação foi de 27,41 UI/mL e com 8 horas foi de 2,62 UI/mL, indicando que a estabilidade da β -galactosidase começa a decair depois de 1 hora de incubação (Figura 11).

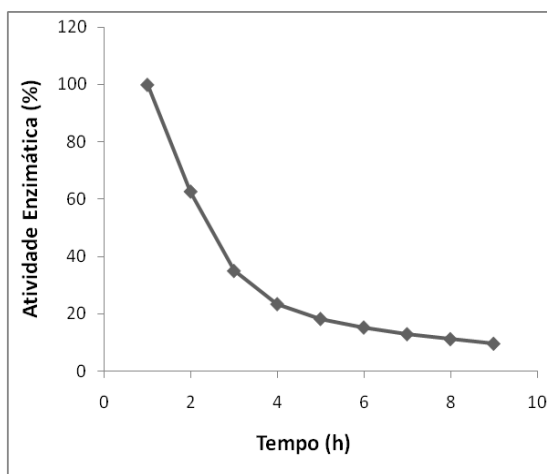


Figura 11: Determinação da estabilidade da enzima β -galactosidase no extrato bruto a 30 °C por 8 horas

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de uma temperatura ótima (15). Esta temperatura ótima influencia diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade de reação e, por consequência, a conversão do substrato em produtos. Temperaturas abaixo ou acima desta faixa inibem a atividade enzimática. A temperaturas muito superiores, ocorre a inativação da enzima, devido a desnaturação da enzima. Como consequência, o conhecimento da faixa de atividade ótima para cada enzima é fundamental para a otimização dos processos envolvendo reações enzimáticas (15). A alta temperatura ótima encontrada neste estudo indica a presença de β -galactosidases no meio com características de interesse industrial. Podendo ser aplicadas para a produção de oligossacarídeos e na hidrólise da lactose durante a pasteurização do leite. Além disso, as isoformas da β -galactosidase estavam ativas em uma ampla faixa com valores de pH, característico do estômago. Após a ingestão o pH gástrico diminui progressivamente até aproximadamente 2,0, devido a estimulação da secreção de ácido gástrico. Isso faz com que provavelmente as enzimas encontradas sejam eficazes na hidrólise da lactose *in vivo* durante a fase gástrica da digestão. Estes resultados vão ao encontro da literatura, onde Lima *et al.* (1982) purificaram uma β -galactosidase de *Aspergillus niger* com temperatura ótima de 65°C e pH ótimo de 4,5 (91). Fantes e Robert (1973) utilizaram *Aspergillus oryzae* para produzir lactase com pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 55°C (91, 92). Gekas e Leiva (1985) apresentaram um estudo em que lactases de *Aspergillus niger* tem pH ótimo entre 3,0 e 4,0 e temperatura ótima entre 55 e 60 °C, já lactase de *Aspergillus oryzae* indicaram pH ótimo 5,0 e

temperatura ótima entre 50 e 55 °C (31). A presença de isoformas de β -galactosidase expressa por fungos filamentosos em meio líquido foi também descrita por O'Connell e Walsh (2008), apresentando valores de pH ótimo de 3,0 5,5 e 5,0 e temperatura ótima igual 55°C e 65°C (11).

5.3. SEPARAÇÃO FRACIONADA POR MEMBRANAS DE 30 kDa E 100 kDa

Após quantificação da atividade enzimática, o extrato bruto foi filtrado em sistema de filtração a vácuo utilizando membranas de poros definidos de 100 kDa e 30 kDa para as separações fracionadas das proteínas presentes no caldo. Primeiramente, o extrato bruto foi concentrado pela membrana de 100 kDa, obtendo-se uma fração concentrada (>100 kDa) e uma ultrafiltrada (<100 kDa). Na fração > 100 kDa, o volume foi reduzido 10 vezes, proporcionando um aumento na concentração de proteínas e das atividades enzimáticas, porém não se observou um aumento no fator de purificação para a β -galactosidase. O volume ultrafiltrado (<100 kDa), foi em seguida permeado pelo meio filtrante com poros de 30 kDa.

A separação fracionada por membranas de poros definidos em 100 kDa e 30 kDa, gerou três frações com atividades de β -galactosidase. No entanto, como pode ser observado na tabela 4, o fator de purificação neste processo não indica uma purificação para a enzima de interesse nas diferentes frações. Este resultado pode estar vinculado a significativa perda de atividade enzimática ocorrida durante a ultrafiltração. Corroborando com estes resultado, o perfil proteico das frações avaliado por SDS-PAGE (Figura 12), confirma a presença de bandas de proteína muito semelhantes no extrato bruto e nas frações maior que 100 kDa e maior que 30 kDa.

Tabela 4: Descrição da atividade enzimática da β -galactosidase e a concentração proteica total nas frações obtidas após separação fracionada por membranas de 100 kDa e 30 kDa.

Frações (kDa)	Proteína Total (mg)	Atividade Enzimática (UI)	Atividade Específica (UI /mg)	Fator de Purificação
Extrato Bruto	2369	10^4	4,22	1,0
> 100	790	1186	1,50	0,356
< 100	1434	1731	1,20	0,285
> 30	453	1203	2,65	0,629
< 30	838	0	0	0

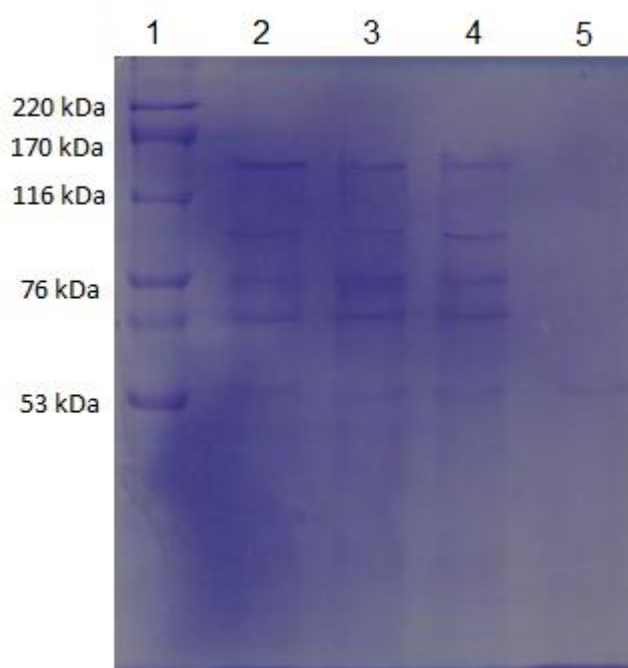


Figura 12: Eletroforese em gel desnaturalante de poliacrilamida, corado com Comassie blue. As amostras das frações aplicadas foram: Padrão de massa molar (1), Extrato Bruto (2), >100 kDa (3), >30 kDa (4), <30 kDa (5). As bandas protéicas reveladas possuem aproximadamente 160 kDa, 110 kDa, 77 kDa, 71 kDa e 55 kDa.

O zimograma para β -galactosidase com amostras do extrato bruto e das quatro frações obtidas com a ultrafiltração evidenciou-se uma banda com atividade de β -galactosidase de aproximadamente 75 kDa (Figura 13). Este resultado vai ao encontro com a literatura, onde se encontra descrito enzimas β -galactosidase

purificadas apresentando massas molares variando entre 70 e 170 kDa. Uma β -galactosidase de *Aspergillus niger* foi purificada apresentando 124 kDa ao mesmo tempo que a de *Aspergillus oryzae* possuía 90 kDa (31). Song *et al.* (2010) encontraram uma β -galactosidase produzida pela levedura *Guehomyces pullulans* com 170 kDa (68).



Figura 13: Zimograma para atividade da β -galactosidase revelado com X-Gal. Linha 1: padrões de massa molar conhecido. Linha 2: banda proteica de aproximadamente 75 kDa com atividade enzimática característica da enzima β -galactosidase na presença do substrato X-Gal.

A escolha da operação unitária filtração, trabalhando-se com membranas semi-permeáveis tem sido uma alternativa aos processos convencionais de separação nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos. As vantagens desse processo são o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas de purificação, maior eficiência e qualidade do produto final, especificidade, possibilita a separação de termolábeis, simplicidade de operação e ampliação de escala (15). No entanto, muitas vezes esta etapa pode ser considerada como um processo preliminar (pré-purificação), preparando a amostra para ser aplicada em operações de purificação mais específica (7).

5.4. APLICAÇÃO DO SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS

Para compreender melhor o comportamento da enzima no sistema micelar de duas fases aquosas a curva binodal foi determinada. Esta curva representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (80). Na Figura 5 a curva binodal obtida experimentalmente para o sistema Triton X-114/tampão tampão fosfato pH 7,0 é apresentada.

A curva binodal obtida está de acordo com as curvas descritas previamente na literatura (81). No entanto, não se obteve uma curva em forma de sino com concavidade para cima, como a observada por (93). É provável que a diferença entre as curvas binodais se deva às impurezas do tensoativo Triton X-114, que podem causar alteração nos valores dos pontos de névoa. A diferença existente entre os trabalhos também pode ser justificada pelo fato de ter sido utilizado Triton X-114 de diferentes lotes. Além disso, pequenas diferenças existentes entre os banhos termostatizados como espessura do vidro da cuba, sistema de aquecimento da água e a sensibilidade do medidor de temperatura, podem acarretar pequenas diferenças no ponto de névoa observado pelo pesquisador.

5.5. PARTIÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE NO SISTEMA MICELAR TRITON X-114/TAMPÃO FOSFATO

A partição das enzimas β -galactosidases presentes nas frações >100 kDa e >30 kDa em sistema Triton X-114/Tampão fosfato pH 7,0 foi estudada para diferentes temperaturas, concentração enzimática inicial e concentrações de tensoativo. Na Figura 14, o sistema Triton X-114/Tampão fosfato pH 7,0 obtido é apresentado, podendo-se observar claramente a presença de duas fases aquosas imiscíveis, separadas por uma interface.

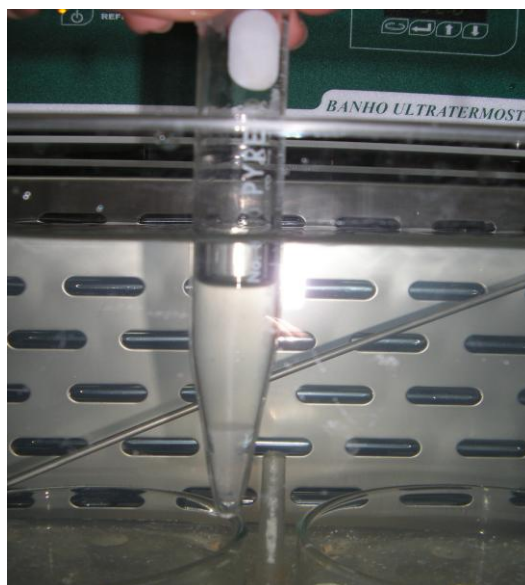


Figura 14: Ilustração do sistema micelar Triton X-114/Tampão fosfato pH 7,0 de duas fases aquosas preparado a 2,0%(p/p) de Triton X-114 e mantido em banho a 30°C por 2 horas.

A eficiência destes sistemas foi avaliada baseando-se na concentração de β -galactosidase encontrada na fase pobre em micela em relação à concentração de β -galactosidase adicionada ao sistema inicialmente. Os cálculos de balanço de massa e coeficiente de partição não foram utilizados para avaliar a eficiência do processo, pois não foi possível quantificar a concentração real de enzima na fase rica em micela, devido à interação entre o substrato enzimático e o tensoativo Triton X-114.

De acordo com os dados das Figuras Figura 15, Figura 16 e Figura 17, a maioria dos ensaios apresentou resultados favoráveis para a aplicação do SMDFA para purificação da enzima β -galactosidase na fase pobre em micelas. No entanto, os melhores resultados foram obtidos trabalhando-se com a fração >100 kDa. Os sistemas contendo 2,0%(p/p) de Triton X-114 e adicionados de 1,0%(p/p) e 5,0%(p/p) de caldo fermentado não mostraram recuperação de β -galactosidase na fase pobre em micelas. A temperatura mais baixa e menor concentração de tensoativo no início do sistema podem ter interferido na formação das micelas, na separação das fases e conseqüentemente no deslocamento das moléculas. Já os sistemas com 4,0%(p/p), 6,0%(p/p), e 8,0%(p/p) de Triton X-114 e com concentrações de caldo fermentado de 10,0%(p/p), 20,0%(p/p) e 40,0%(p/p) incubados em diferentes temperaturas (26°C, 28°C e 30°C) mostraram que a enzima foi recuperada preferencialmente na fase hidrofílica. O sistema com 8,0%(p/p) de

Triton X-114, 10,0%(p/p) de caldo fermentado foi o mais eficaz na recuperação de lactases, com 89,8% de recuperação enzimática (Figura 17A). Este resultado está alinhado com a literatura, uma vez que enzimas hidrofílicas são geralmente purificadas e recuperadas na fase pobre em micela.

Blankschtein *et al.* (1986) usando a teoria do volume de exclusão mostraram que proteínas hidrofílicas migram preferencialmente para fase pobre em micelas quando estão presentes em sistemas micelares de duas fases aquosas não-iônico (80, 94). Segundo a teoria, a partição destas proteínas é governada principalmente por interações repulsivas, estéricas e pelo volume de exclusão entre as proteínas globulares hidrofílica e as micelas não carregadas. Além disso, o comportamento de partição destas proteínas também pode ser entendido a partir de um ponto de vista puramente entrópico, uma vez que as proteínas hidrofílicas podem experimentar um número maior de configurações na fase de pobre em micelas devido ao maior volume disponível gratuitamente.

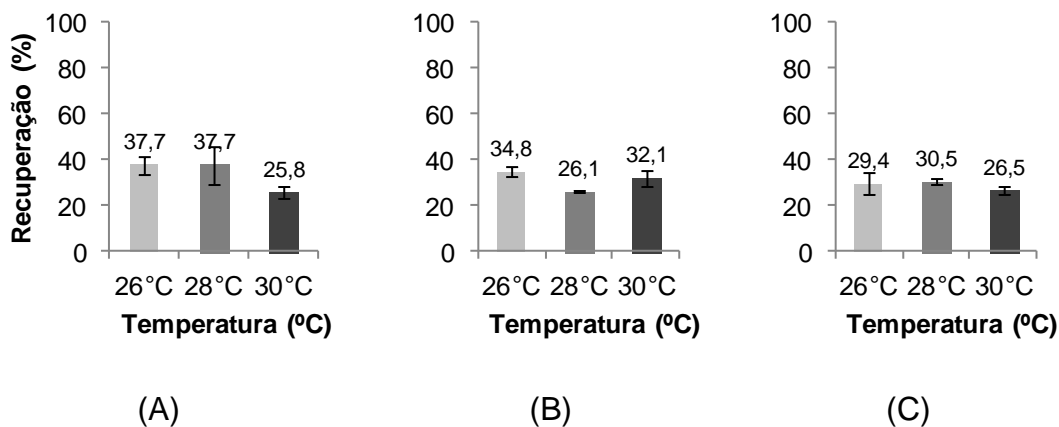


Figura 15: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por *Aspergillus foetidus* em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 4,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).

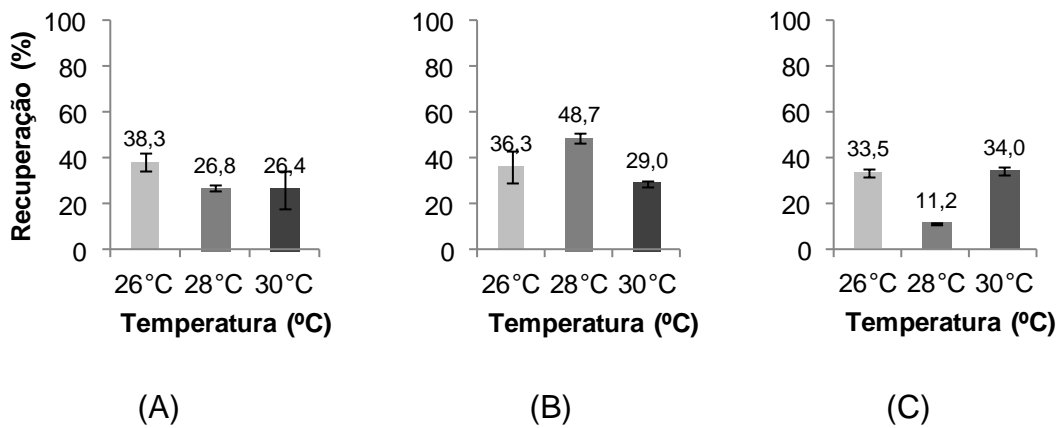


Figura 16: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por *Aspergillus foetidus* em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 6,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).

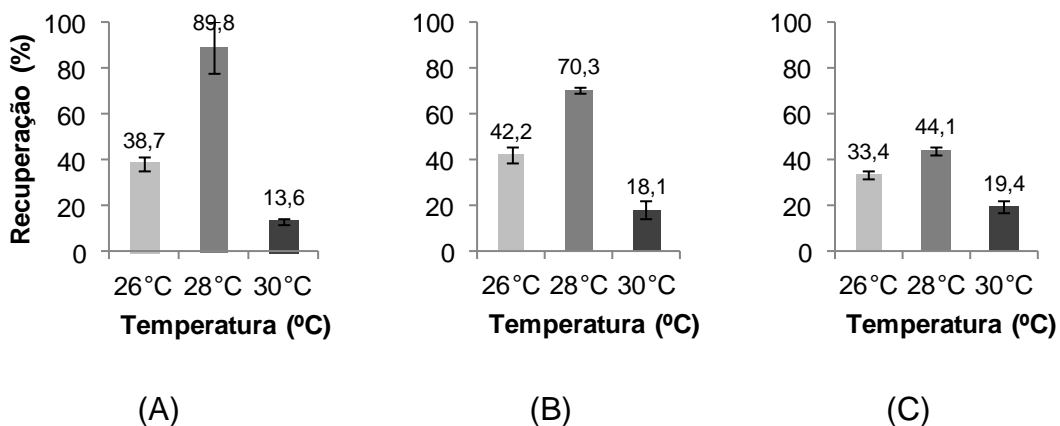


Figura 17: Resultados experimentais da partição da fração >100kDa contendo β -galactosidase expressa por *Aspergillus foetidus* em sistema Triton X-114/Tampão fosfato, para diferentes temperaturas e concentrações de caldo fermentado. SMDFA com Triton X-114 8,0%(p/p). (A) caldo fermentado 10,0% (p/p); (B) caldo fermentado 20,0% (p/p) e (C) caldo fermentado 40,0% (p/p).

Estes resultados foram obtidos com a realização e um planejamento experimental visando à obtenção dos melhores valores para a purificação da enzima de interesse (item 4.11). O método avaliado foi por superfície de resposta, que consiste em um conjunto de técnicas utilizadas para avaliar as relações entre uma ou mais variáveis dependentes e um número de variáveis quantitativas independentes que podem ter efeitos importantes sobre as variáveis dependentes analisadas.

Dos valores experimentais obtidos para a variável (%Recuperação), através da análise de regressão, feita com o método dos Mínimos Quadrados Ordinários, obteve-se um modelo teórico matemático para descrever os valores mais elevados para este parâmetro avaliado. A equação abaixo descreve o efeito da temperatura, da concentração de enzima presente no caldo fermentado e da concentração de Triton X-114 em relação a porcentagem de recuperação da enzima β -galactosidase na fase pobre em micela do SMDFA.

$$(6) R(\%) = -1999,3 + 1,55*[TX114] - 0,21*[Caldo] + 148,08*T - 2,69*T^2$$

A análise de regressão mostrou que a partição foi significativamente afetada ($p < 0,1$) pelas variáveis independentes avaliadas, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5: resultados do modelo de regressão adotado, utilizando o método dos Mínimos Quadrados Ordinários

	Coeficiente	Erro Padrão	razão-t	p-valor
Constante	-1999,3	606,646	-3,2957	0,00157
[TX-114]	1,54656	0,823309	1,8785	0,06467
[Caldo]	-0,212097	0,107796	-1,9676	0,05326
T (°C)	148,079	43,4754	3,4060	0,00112
T (°C) ²	-2,69092	0,776223	-3,4667	0,00092

O modelo aponta que os valores mais elevados de recuperação da enzima na fase pobre em micelas foram obtidos com Triton X-114 8,0% (p/p), caldo 10,0% (p/p) e temperatura de incubação de 27,6 °C, como pode ser observado na superfície de resposta apresentada na Figura 18.

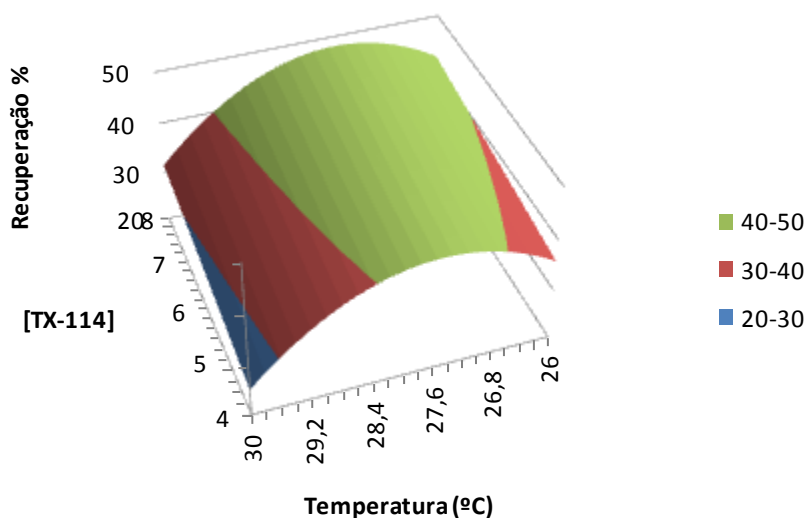


Figura 18: Gráfico de superfície de resposta para R(%) em função da temperatura e concentração de Triton X-114, considerando a adição de 10,0% (p/p) de caldo fermentado ao SMDFA.

A melhor condição de purificação apontada pelo modelo é semelhante à experimentalmente obtida, onde a maior concentração de Triton X-114 8,0% (p/p) e uma menor concentração de caldo fermentado no sistema 10,0% (p/p) favoreceram a purificação da enzima de interesse na fase pobre em micelas. Porém, o ajuste do modelo foi baixo, pois houve diferenças significativas entre os seus resultados e os dados experimentais, o que foi caracterizado pelo R^2 de apenas 0,315. Provavelmente, este fato é devido à equação utilizada para calcular a porcentagem de recuperação não ter considerado a concentração de β -galactosidase presente na fase rica em micelas pela existência de interferências no método padrão.

5.5.1. Efeito da temperatura e pH sobre a enzima β -galactosidase

A estabilidade térmica das enzimas e a estabilidade em diferentes valores de pH, são características importantes para aplicação industrial e para o sucesso dos processos de purificação. Várias técnicas para purificação de proteínas vêm sendo empregadas, porém acredita-se que a chave para se obter sucesso no processo de purificação é a seleção de uma técnica apropriada que maximize o rendimento, levando em consideração a estabilidade das enzimas em diferentes temperaturas e

diferentes valores de pH. Além disso, informações importantes podem ser adquiridas com o conhecimento do ponto isoelétrico, da massa molar e da hidrofobicidade das enzimas de interesse, permitindo uma eficiente escolha do processo de purificação a ser utilizado (95).

Após determinar as melhores condições de recuperação da enzima β -galactosidase em SMDFA, foram determinados os valores de pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica para a β -galactosidase presente na fase pobre em micela recuperada após partição. Repetidos SMDFA nas condições de 8%(p/p) de Triton X-114, 10%(p/p) de extrato concentrado, fração > 100 kDa foram preparados e as fases obtidas após incubação por 2 horas em banho maria a 28°C. Em seguida foi realizada a caracterização bioquímica da β -galactosidase presente na fase pobre em micelas do sistema micelar.

A enzima β -galactosidase apresentou um pH ótimo em 2,6 após este valor ocorreu um rápido declínio na atividade enzimática (Figura 19).

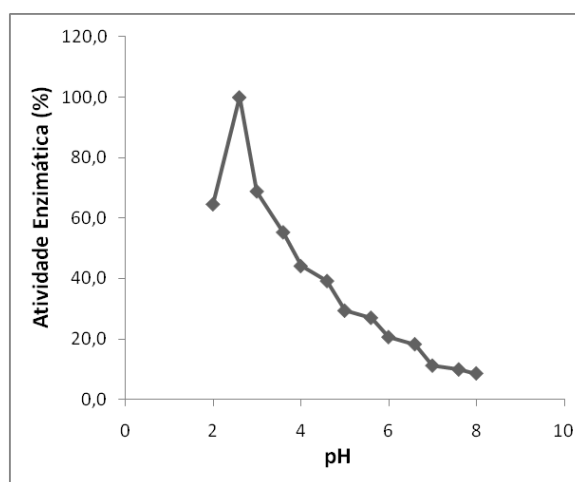


Figura 19: Efeito do pH na enzima β -galactosidase presente na fase pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.

Em sequência a Figura 20 mostra que a enzima apresentou atividade máxima a 60°C com uma diminuição acentuada da atividade enzimática após esta temperatura.

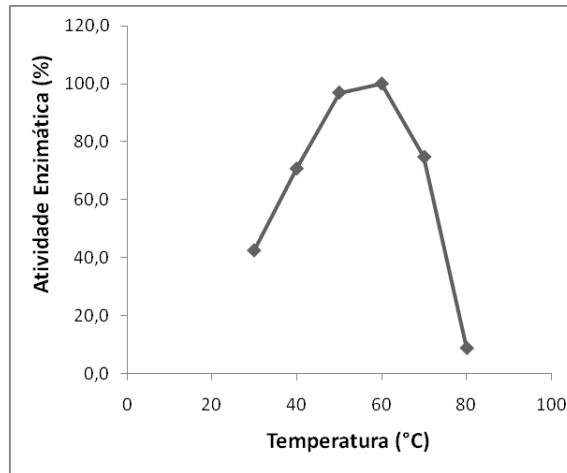


Figura 20: Efeito da temperatura na enzima β -galactosidase presente na fase pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.

5.5.2. Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase

O teste de estabilidade térmica foi realizado na fase pobre em micela recuperada após partição com SMDFA. A atividade enzimática com 1 hora de incubação foi de 90,42% e com 8 horas foi de 19,30%. Os resultados indicam que a estabilidade da β -galactosidase começa a decair depois de 1 hora de incubação, com variações na inclinação da reta indicando dois momentos com diferentes velocidades de perda de atividade enzimática (Figura 21).

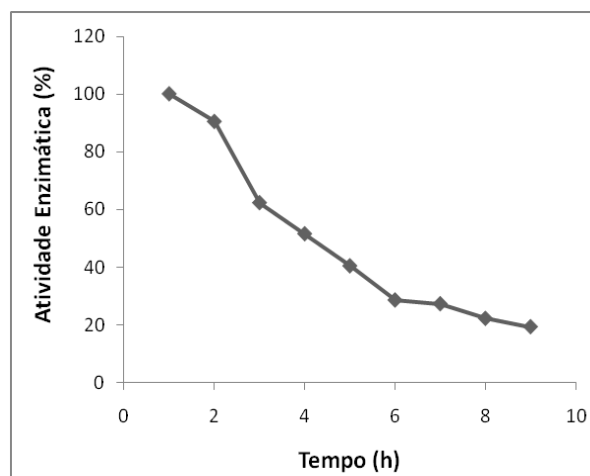


Figura 21: Determinação da estabilidade da enzima β -galactosidase na fração pobre em micela recuperada após partição com SMDFA.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o fungo *Aspergillus foetidus* isolado do Cerrado foi capaz de expressar a enzima β -galactosidase em meio líquido. Entre as fontes de carbono testadas, o resíduo de casca de soja induziu uma maior expressão desta enzima por este microrganismo. A avaliação do processo fermentativo mostrou que após sete dias de fermentação nas condições acima descritas a atividade específica para a enzima de interesse foi maior que após vinte dias de fermentação nas mesmas condições.

A indicação da presença da enzima β -galactosidase no caldo fermentado foi confirmada pelo SDS-PAGE e pela caracterização bioquímica do extrato bruto, direcionando os processos de purificação.

Considerando a aplicação de processos de baixo custo na purificação enzimática, pode-se dizer que o sistema de filtração por membranas de poros definidos em 30 kDa e 100 kDa, foi eficiente para clarificação do meio, porém não foi capaz de aumentar o fator de purificação da enzima de interesse. Por outro lado, a aplicação do SMDFA usando Triton X-114/tampão fosfato apresentou resultados satisfatórios com recuperação de 89,8% da enzima aplicada ao sistema na fase pobre em micelas. A caracterização das β -galactosidases presentes nesta fase mostrou resultados importantes relacionados a purificação de novas β -galactosidases com características adequadas ao uso humano como suplemento alimentar. A enzima apresentou pH ótimo igual a 2,6 e temperatura ótima igual a 60°C abrindo espaço para a aplicação em processos industriais e como suplemento alimentar para uso humano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jozala AF, Mazzola PG, Magalães PO, Pessoa A, Penna TCV. Nisina: um lantibiótico obtido por processo microbiano. *Microbiol Foco*. 2008;5:4-7.
2. Gurpilhares D, Hasmann F, Pessoa A. Microbiologia industrial: microrganismos como unidades de produção. *Microbiol Foco*. 2008;4:33-43.
3. Ng TB. Peptides and proteins from fungi. *Peptides*. 2004;25(6):1055-73.
4. Ustok FI, Tari C, Harsa S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chem*. 2010;119:1114-20.
5. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*. 2003;89(1):17-34.
6. Santos WO. Partição de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietilenoglicol e poliacrilato de sódio [Dissertação]: Universidade estadual do sudoeste da Bahia; 2011.
7. Pessoa-Jr A, Kilikian BV. Purificação de produtos biotecnológicos. 1 ed. Barueri: Manole; 2005.
8. Jackson KA, Savaiano DA. Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in African, Asian, and Hispanic Americans. *J Am Coll Nutr*. 2001;20(2):198-207.
9. Téó CRPA. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR*. 2002;6(3):135-40.
10. Trevisan AN. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2008.
11. O'Connell S, Walsh G. Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Appl Biochem biotechnol*. 2008;149(2):129-38.
12. Nichols BL, Nichols VN. Lactation. *Adv Pediatric*. 1979;26:137-61.
13. Brodbeck U, Ebner KE. The sub cellular distribution of A and B proteins of lactose synthetase in bovine and rat mammary tissue. *J Biol Chem*. 1966;241:5526-32.
14. Longo G. Influência na adição de lactase na produção de iogurtes [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
15. Carminatti CA. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
16. Gray GM. Carbohydrate digestion and absorption. *The New England journal of medicine*. 1975;292:1225-30.
17. Gray GM, Santiago NA, Colver EH, Genel M. Intestinal beta-galactosidases. II. Biochemical alteration in human lactase deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 1969;48:729-35.
18. Pereira AS. Malabsorção de lactose do adulto em uma população brasileira [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1981.
19. Asp NG, Dahlqvist A. Intestinal beta-galactosidases in adult low activity and in congenital lactase deficiency. *Enzyme*. 1974;18:84-102.
20. Weijers HA, Kamer JHvd, Dicke WK, Isseling J. Diarrhoea caused by deficiency of sugar splitting enzymes. *Acta Paediatr*. 1961;50(1):55-71.
21. Calloway HD, Colasito DJ, Mathews RD. Gases produced by human intestinal microflora. *Nature*. 1966;212:1238-9.

22. White A, Handler P, Smith E. Princípios de Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976.
23. Shrier I, Szilagy I, Correa E. Impact of lactose an diseases: an analytical review of population data. *Nutrition and Cancer*. 2008;60(3):292-300.
24. Levin B, Abraham JM, Burgess EA, Wallis PG. Congenital lactose malabsorption. *Arch Dis Child*. 1970;45:173-7.
25. Dahlqvist A. The intestinal disaccharidases and disaccharide intolerance. *Gastroenterology*. 1962;3:694-6.
26. Herbst JJ, Sunshine P, Kretchmer N. Intestinal malabsorption in infancy and childhood. *Adv Pediatr*. 1969;16:11-64.
27. Bayless TM. Junior, why didn't you drink your milk? *Gastroenterology*. 1971;60:479-80.
28. Simoons JF. Milk, lactase, and gene distribution. *Am J Dig dis*. 1978;23:961-2.
29. Moriwaki C, Matioli G. Influence of β -galactosidase in milk technology and lactose maldigestion. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR*. [0]. 2000;4(3):283-90.
30. Matioli G, Moraes FF, Zanin GM. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization the enzyme. *Acta Sci*. 2001;23(3):655-9.
31. Gekas V, Leiva L. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochem*. 1985;20(1):2-12.
32. Lin M, Dipalma J, Martini M, Gross C, Harlander S, Saviano D. Comparative effects of exogenes lactase (β -galactosidase) preparations on in vivo lactose digestion. *Dig Dis Sci*. 1993;38(11):2022-7.
33. National. Electronic Code of Federal Regulations. Washington: United States Government Printing; [cited 2011 15 de novembro de 2011]; <http://ecfr.gpoaccess.gov>. Available from.
34. Holsinger VH. Lactose, water, salts and vitamins. In: Holsinger VH, editor. *Physical and chemical properties of lactose*. London: Adv Dairy Chem; 1997. p. 1-38.
35. Almeida MM, Pastore GM. Galactooligosacarídeos - Produção e efeitos benéficos. *Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;35(1):12-9.
36. Matthews BW. The estrutura of *E.coli* β -galactosidase. *C R, Biol*. 2005;328:549-56.
37. Ladero M, Santos A, García-Ochoa F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbial Technol*. 2000;27(8):583-92.
38. Jurado E, Camacho F, Luzón G, Vicaria JM. A new kinetic model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbial technol*. 2002;31(3):300-9.
39. Juers DH, Jaconson RH, Wigley D, Zhang XJ, Huber RE, Tronrud DE, et al. High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α -complementation. *Protein Sci*. 2000;9:1685-99.
40. Fowler A, Zabin I. Amino acid sequence of β -galactosidase. *J Biological Chem*. 1978;253:5521-5.
41. Adalberto PR. Produção, Isolamento e Caracterização de β -galactosidases de *Trichoderma reesei*: Interação de Íons Metálicos na Atividade Enzimática [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2005.
42. Suarez FL, Savaiano DA. Diet, genetics, and lactose intolerance. *Food Technol*. 1997;51(3):74-6.
43. Palumbo MS. Stability of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and *kluyveromyces lactis* in dry milk powders. *J food Sci*. 1995;60(1):117 – 9.

44. O'Connell S, Walsh G. Physicochemical Characteristics of Commercial Lactases Relevant to Their Application in the Alleviation of Lactose Intolerance. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006;134:174-91.
45. O'Connell S, Walsh G. Purification and properties of a β -galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Applied Biochem Biotechnol.* 2007;141(1):1-14.
46. Santiago PA, Marques LDS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxinus*. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2004;24(4):567-72.
47. Gosling A, Stevens GW, Barber AR, Kentish SE, Gras SL. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chem.* 2010;21:307-18.
48. Martinez SB, Speckman RA. β -galactosidase treatment of frozen dairy product mixes containing whey. *J Dairy Sci.* 1988;71:893 – 900.
49. Bailey RB, Benitez T, Woodward A. *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression — use in cheese whey hydrolysate fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:631–9.
50. Terrell SL, Bernard A, Bailey RB. Ethanol from whey — continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:577–80.
51. Zadow JG. Lactose — properties and uses. *J Dairy Sci* 1984;67:2654–79.
52. Shukla TP. β -galactosidase technology: a solution to the lactose problem. *Critical Reviews Food Technology.* 1975;5:325-56.
53. Yang ST, Silva EM. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *J Dairy Sci.* 1995;78(11):2541-62.
54. Rubio TM. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv.* 2006;24(2):212-25.
55. Gänzle MG, Haase G, Jelen P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int Dairy J* 2008;18:685–94.
56. Richmond ML, Stine CM. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. *J Dairy Sci.* 1981;64(9):1579-771.
57. Oliveira CO, Guimarães PMR, Domingues L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):600-9.
58. Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy J, Kumar H. Microbial production, immobilization and applications of beta-D-galactosidase. *J Chem Technol Biotechnol* 2006;81:530–43.
59. Rusain Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* 2010;30:41-62.
60. Domingues L, Guimarães PM, Oliveira C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioeng Bugs* 2010;1:164–71.
61. Hasmann FA, Mazzola PG, Magalhães PO, Penna TCV, Pessoa A. Purificação de Biomoléculas intracelulares produzidas por microrganismos. *Microbiol Foco.* 2008;5:4-11.
62. Rabelo APB, Tambourgi EB, Pessoa-Jr A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. *J Chromatogr.* 2005;807:61-8.
63. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Barros RAM. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends Biotechnol.* 2009;24(4):240-7.
64. Harris ELL. Protein purification methods: a practical approach. 2 ed. Nova York: Oxford; 2001.

65. Lima CAA, Lima EDPA, Gerald LTS. Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase de origem fungica. *Revista agropecuária técnica*. 2001;3(2):73-80.
66. Rangel CO. Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à purificação de enzimas [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
67. Silva LHM, Silva MCH, Aquino RAN, Francisco KR, Cardoso MCV, Minin LA, et al. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2^-$ anion in aqueous two-phase systems formed by polyethylene oxide and sulfate salts. *J Phy Chem B*. 2006;110:23540-6.
68. Song C, Liu GL, Xu JL, Chi ZM. Purification and characterization of extracellular galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. *Process Biochem*. 2010;45(6):954-60.
69. Li Y, Wang H, Lu L, Li Z, Xu X, Xiao M. Purification and Characterization of a Novel β -Galactosidase with Transglycosylation Activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;158:192-9.
70. Hildebrandt P, Wanarska M, Kur J. A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiol*. 2009;9(151):1-11.
71. Hemavathi AB, Raghavara KSMS. Differential partitioning of β -galactosidase and β -glucosidase using aqueous two phase extraction. *Process Biochem*. 2011;46:649-55.
72. Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces. 2 ed. London: Academic Press; 1992.
73. Makino S, Reynolds JA, Tanford C. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. *J Bio Chem*. 1973;248:4926-32.
74. Chevalier Y, Zemb T. The structure of micelles and micromulsions. *Rep Prog Phys Bristol*. 1990;53:279-371.
75. Puvvada S, Blankschtein D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants approach. *J Chem Phys*. 1990;92(6):3710-24.
76. Tanford C. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. New York: Wiley; 1980.
77. Kamei DT. Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems [Tese]. Massachusetts: Cambridge; 2001.
78. Meguro K, Ueno M, Esumi K. Micelle formation in aqueous media. In: Schick M, editor. *Nonionic surfactants: Physical chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1987. p. 109-83.
79. Nikas YJ, Liu CL, Srisvastava T, Abbott NL, Blankschtein D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules*. 1992;25:4794-806.
80. Mitchell DJ. Phase behavior of polyoxyethylene surfactants with water. *J Chem Soc Faraday Trans*. 1983;79(975-1000).
81. Lopes AM. Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade [Dissertação]: Universidade de São Paulo; 2006.
82. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*. 1981;256:1604-7.
83. Minuch T, Gieren H, Kula MR. A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography. *Biotechnol Appl Biochem*. 1996;23:107.
84. Quina FH, Hinze WL. Surfactante mediated cloud point extractions: An environmentally bening alternative separation approach. *Ind Eng Chem*. 1999;38:4150-68.

85. Albertsson PA. Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. In: Albertsson PA, editor. Partition of cell particles and macromolecules. 3 ed. New York: Wiley Intersciences; 1986. p. 709-71.
86. Vara LEG, Alfaro BL. Separation of membrane proteins according to their hydrophathy by serial phase partitioning with Triton X-114. *Anal Biochem.* 2009;387:280–6.
87. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biro S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. Protein expression and purification. 2001;21(1):24-9.
88. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72(1-2):248-54.
89. Shaik SA, Khire J, Khan M. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor sp.* . *Biochim Biophys Acta.* 1999;1472(1):314-22.
90. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
91. Lima CAA, Lima EDPA, Gerald LTS. Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase de origem fungica. *Revista agropecuária técnica.* 1982;3(2):73-80.
92. Fantes PA, Roberts CF. β -galactosidase activity and lactose utilization in *Aspegillus nidulans*. *Journal Gen Microbiol.* 1973;77:471-86.
93. Ramelmeier RA, Terstappen GC, Kula MR. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114 based aqueous two phase systems. *Bioseparation.* 1991;2:315-24.
94. Blankschtein D, Thurston GM, Benedek GM. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. *J Chem Phys.* 1986;85:7268-88.
95. Pereira PS, Paiva H, Ferreira MC, Barros MRA. A new lookat xylanases - An overview of purificatin strategies. *Mol Biotechnol.* 2003;24(3):257-81.