



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM SEPHADEX-PANI

Ana Linda Tiago Soares Ferreira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE EM SEPHADEX-PANI

ANA LINDA TIAGO SOARES FERREIRA

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO DA CUNHA

Prof. Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR

Prof. Dr. JOSÉ ANTÓNIO TEIXEIRA

RECIFE, 2009.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ferreira, Ana Linda Tiago Soares

Imobilização de Beta Galactosidase em Sephadex-Pani/ Ana Linda Tiago Soares Ferreira– Recife: O Autor, 2009.

84 folhas : il., fig., tab.

Orientadores: Maria das Graças Carneiro da Cunha, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior e José António Teixeira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui referências

1. Beta-Galactosidade 2. Aspergillus 3. Enzimas I. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (orientadora) II. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) III. Teixeira, José António (orientador) IV. Título

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-041

ANA LINDA TIAGO SOARES FERRREIRA

“Imobilização de β -galactosidase em Sephadex-Paní”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Presidente)

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Examinador interno)

Prof. Dr. David Fernando de Moraes Neri (examinador externo)

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (examinador interno)

Defesa da dissertação em 27/02/2009.

Djalma Gomes da Silva
Secretário do Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica
e Fisiologia - GCB-UFPE

DEDICATÓRIA

“A adoção da felicidade como um objetivo legítimo e a decisão consciente de procurar a felicidade de modo sistemático podem exercer uma profunda mudança no restante de nossas vidas“

Tenzin Gyatso, Sua Santidade o décimo quarto Dalai Lama.

Dedicado ao leitor
Seja muito feliz em sua vida.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores com quem me cruzei, o meu mais sincero obrigada, por não só me ajudaram academicamente como serviram de exemplo para a minha formação pessoal.

À Professora Doutora Maria das Graças Carneiro da Cunha por ter sido minha tutora, minha “mãe do Brasil”. Obrigada por todo o apoio e orientação. Obrigada pela energia positiva quando tudo parecia correr menos bem. Foram de grande incentivo todas as palavras de conforto, todos os sorrisos.

Ao Professor Doutor Luiz Bezerra de Carvalho Júnior. Por me mostrar que é possível transformar fracassos em estímulo, desanimo em energia, por me ter ensinado a encontrar sempre algo de bom quando tudo parece errado. Pela alegria e simplicidade de quem faz do sorriso uma arma para vencer obstáculos com muita, muita sabedoria e humildade.

Ao Doutor Davi Néri pelo apoio no trabalho, muito obrigada por partilhar dores de cabeça.

A todos os professores do departamento de Bioquímica da UFPE (em especial a Doutora Vera Menezes) e professores associados ao curso de Extensão de Bioquímica e Fisiologia pelo excelente ambiente de trabalho e por me terem lembrado como pode ser divertido e estimulante aprender cada vez mais!

Ao Professor Doutor José A.C. Teixeira, pela orientação e aconselhamento, grata por ter possibilitado esta experiência magnífica.

Aos meus grandes amigos para a vida Filo, Zita, Cris, João, Lino, Guto, e Tiago que mesmo espalhados pelo mundo estão reunidos no meu coração.

A todos os amigos de Recife, obrigada por tornarem a minha estadia tão “prazerosa” por me mostrarem que a nossa casa pode ser em qualquer lugar do mundo e que talvez ele seja pequeno demais para todos os nossos sonhos. O

meu obrigada ao Caio, Felipe e Bruno pelos momentos de muito estudo e muita diversão. Obrigada à Cris, Babi, Aurélien, Anny, Talita e Savana e a todos os demais pelo apoio, por nunca me terem deixado faltar o chão! Aos meus amigos e colegas do Laboratórios de Biotecnologia (Romero, Edu) e do Labenz (em especial ao Professor Ranilson, Karina, Thiago, Marina, Janilson e todos os que sempre estão por lá) pela preciosa ajuda, pelo material e pelas noites em claro.

À minha amiga Roberta e amigos, por serem a prova viva de que as pessoas nasceram para dar e receber felicidade e de que os amigos podem sim “brotar do chão” e ficar para sempre no nosso coração, em qualquer parte do mundo. Coragem.

A toda a minha família, tios e primos porque não há nada mais importante, em especial as minhas avós, Maria e Maria de Lourdes por todo o apoio e por acreditarem sempre em mim. Ao avô Leandro que olha por todos nós lá de cima, saudade.

À minha “família de casa”, para mim a melhor do mundo inteiro, por me ter possibilitado crescer tão feliz, tão amada, sem vocês não seria tão feliz! Por todas as oportunidades, por me permitir fazer as minhas escolhas, tendo sempre em nossa casa o meu porto de abrigo! Por me deixarem voar longe e por me acolherem sempre no nosso ninho, o meu muito obrigada Mami, Papi, Bernardo (Bi) e Baltazar.

Gostaria também de agradecer o apoio financeiro CAPES/PROCAD 1415/2007 (Coordenação de-aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil) e PROPESQ/UFPE (Pro reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Enzimas	6
2.1.1. β -Galactosidase	6
2.2. Imobilização de enzimas	12
2.2.1. Suportes de imobilização	15
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5. ARTIGO	41
ABSTRACT	43
1.INTRODUCTION	44
2. EXPERIMENTAL	45
2.1. Chemicals.	45
2.2. Sephadex hydration and polyaniline coating	45
2.3. β -Galactosidase immobilization	46

2.4. β -Galactosidase activities on ONPG and milk lactose.	47
2.5. Effect of pH and temperature on immobilized β -Galactosidase	47
2.6. Reuse of immobilized enzyme derivative	48
2.7. Elemental analysis and scanning electron microscopy (SEM)	48
3.RESULTS AND DISCUSSION	48
3.1. Preparation and Support Characterization	49
3.2. β -Galactosidase immobilization on Sephadex– PANI	50
3.3. Effect of pH and temperature on immobilized β -Galactosidase	51
3.4. Reuse of the enzymatic derivative	52
3.5. Milk lactose hydrolysis	52
4. CONCLUSION	53
5. ACKNOWLEDGMENTS	53
6. REFERENCES	53
6. CONCLUSÃO	67
7. GUIA DE AUTORES	68

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO LITERÁRIA

Figura 1. Estrutura da lactose na sua configuração α e β .	6
Figura 2. Mecanismo da hidrólise enzimática da lactose por ação da β -galactosidase.	11
Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas (dalla-vecchia, 2004).	14
Figura 4. Estrutura do sephadex TM .	19
Figura 5. Forma básica da pani.	20
Figura 6. Formação do radical cátion de anilina.	22
Figura 7. Formas de ressonância do radical cátion de anilina.	22
Figura 8. Formação do dímero.	23
Figura 9. Formação do dímero radical cátion.	23
Figura 10. Possível síntese da pani.	23
Figura 11. Mecanismo de dopagem ácida.	24

LISTA DE TABELAS

REVISÃO LITERÁRIA

TABELA 1 POSSÍVEIS FONTES PARA A OBTENÇÃO DE β -GALACTOSIDASE.

(MODIFICADO DE SHUKLA, 1975). _____ 9

TABELA 2 PROPRIEDADES DE β - GALACTOSIDASE DE ACORDO COM AS

DIFERENTES FONTES. (MODIFICADO DE GEKAS E LÓPEZ - LEIVA,

1985). _____ 10

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES SUPORTES DE ACORDO

COM A SUA COMPOSIÇÃO. _____ 16

RESUMO

A β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada covalentemente em Sephadex G-50 revestido com polianilina (Sephadex-PANI), via glutaraldeído e disposta em coluna vertical (2cm x 10 cm). A microscopia eletrônica de varredura e a análise elementar mostrou a superfície rugosa das pérolas do Sephadex alteradas e a presença de nitrogênio respectivamente após o revestimento com PANI. O fluxo da coluna foi testado (0,125-1,25 mL min⁻¹) e 0,8 mL min⁻¹ foi estabelecido como sendo a melhor condição. A atividade da coluna do derivado enzimático (Sephadex-PANI- β -Galactosidase) foi realizada circulando na coluna uma solução de ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG; 3 mL) a um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e o derivado enzimático (Sephadex-PANI- β -Galactosidase) apresentou um pH ótimo (4,5) e temperatura ótima (50 °C) semelhante ao da enzima livre. A quantidade de enzima imobilizada e a retenção específica de atividade enzimática comparada com a enzima solúvel foram 100% e 90%, respectivamente. O derivado enzimático foi reutilizado 10 vezes retraindo cerca de 100% da atividade inicial e armazenado por aproximadamente dois anos mantendo 90% da sua atividade. A lactose do leite foi parcialmente convertida em glicose e galactose ao ser circulado na coluna de Sephadex-PANI- β -Galactosidase. Assim, a coluna do derivado enzimático (Sephadex-PANI- β -Galactosidase) pode ser proposta para a remoção contínua de lactose do leite. Futuramente, outras enzimas poderão ser covalentemente imobilizadas em colunas de Sephaedx-PANI e usadas em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chaves: imobilização covalente; Sephadex; PANI; β -Galactosidase; *Aspergillus oryzae*; e hidrólise da lactose.

ABSTRACT

β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* was covalently immobilized onto Sephadex G-50 coated with polyaniline (Sephadex-PANI), via glutaraldehyde, and arranged in a vertical column. The scanning electron microscopy and elemental analyses showed the rugose surface of the Sephadex beads altered and the presence of nitrogen, respectively, after PANI coating. The activity of the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column (2cm x 10 cm) was assayed by circulating a solution of ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG; 3 mL) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and its optima pH and temperature were found to be 4.5 and 50 °C, respectively, similar to those estimated for the free enzyme. The amount of immobilized protein and retention of specific enzymatic activity compared with the free enzyme were 100% and 90%, respectively. The enzymatic column was reused 10-times retaining about 100% of its initial activity. When stored for almost two years the derivative retained about 90% of its initial activity. Milk lactose was partially converted to glucose and galactose by circulating it through the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column. Therefore, column of Sephadex-PANI- β -Galactosidase can be proposed for the continuous removal of lactose from milk. Furthermore, other enzymes can be covalently immobilized on Sephadex-PANI column and applied in biotechnology.

Keywords: Covalent immobilization; Sephadex; PANI; β -Galactosidase; *Aspergillus oryzae*; and lactose hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas como biocatalizadores em processos industriais tem se dado em indústrias alimentícia, têxtil, de papel e celulose, detergentes, óleos e gorduras, entre outras. Além disso, cresce o número de bioprocessos utilizados na obtenção de enantiômeros, síntese de intermediários de fármacos, herbicidas e substâncias químicas finas, como aminoácidos (ROBERTSON e STEER, 2004; HASAN, 2006). Apesar de apresentarem inúmeras vantagens e do grande potencia de aplicação das enzimas, muitos dos processos ainda não são viáveis devido a questões como os custos de obtenção e sensibilidade de algumas enzimas a altas temperaturas. Para superar estes entraves, tem-se recorrido à imobilização de enzimas que possibilita não só a implatação de processos contínuos como a recuperação do biocatalisador (BLANCO *et. al.*, 2004). Processos economicamente importantes, tais como antibióticos β -lactâmicos, D-aminoácidos, dextrana, açúcar invertido e glicose e hidrólise de caseína, são exemplos da aplicação industrial de enzimas imobilizadas (BAILEY e OLLIS, 1986; EGOROV *et. al.*, 2000). Frente ao aumento da estabilidade promovido à enzima pela imobilização, outra aplicação que tem sido amplamente estudada é o seu uso em reações promovidas em meios não convencionais, como solventes orgânicos, sistemas bifásicos, fluidos supercríticos e meios sólidos (GUPTA e ROY, 2004).

Várias enzimas imobilizadas têm sido usadas em diferentes indústrias de alimentos (NÉRI *et. al.*, 2008). β -Galactosidases (EC. 3.2.1.23) de diferentes fontes são atualmente usadas na produção de leite e produtos derivados sem lactose. Esta enzima hidrolisa a lactose nos seus componentes básicos: glicose e galactose (HAIDER e HUSSAIN, 2009a). A hidrólise da lactose aumenta a doçura dos produtos a possibilita o consumo deste tipo de produtos por indivíduos intolerantes a lactose, melhora a qualidade dos produtos e a eficiência dos processos industriais (HATZINIKOLAOU *et. al.*, 2005).

A escolha do processo de hidrólise, em modo descontínuo (batelada ou "batch") ou modo contínuo, depende essencialmente das características enzimáticas, da viabilidade econômica do processo, do seu armazenamento e reutilização (HAIDER e HUSAIN, 2007).

São conhecidas e estudadas inúmeras técnicas de imobilização de biocatalizadores: ligação superficial que pode ser classificada como ligação covalente ou como não covalente; oclusão; Ligações Cruzadas e enclausuramento (AIRES-BARROS e CABRAL, 2003). A imobilização covalente de enzimas, a um suporte sólido, baseia-se na formação de ligações entre eles como a formação de ligações amida, envolvendo os resíduos dos aminoácidos da enzima e os grupos reativos da superfície do suporte. Como a maioria dos suportes utilizados para a ligação covalente não apresenta grupos reativos que se liguem diretamente à proteína, torna-se necessária a utilização de métodos de ativação como: diazotação, formação de derivados azida, alquilação, reação de amidação, utilização de reagentes de condensação, entre outros (ROSEVEAR, 1987). Porém, não deve haver o envolvimento dos aminoácidos do centro ativo, nem alterações significativas na conformação nativa da proteína. Deste modo a alta estabilidade dos derivados obtidos, devido à força da ligação covalente entre a enzima e o suporte, torna o método atrativo.

Nos últimos anos, vários tipos de suportes têm sido sugeridos para a imobilização de β -Galactosidases, tais como: Eupergit C (HERNAIZ e CROUT, 2000), a superfície de grafite (ZHOU, 2003), Polisiloxano-Álcool polivinílico (NÉRI *et. al.*, 2008), gelatina (NAGANAGOUDA *et. al.*, 2007) suporte de imunoafinidade e esferas híbridas de amido (HAIDER e HUSSAIN, 2009). Contudo, muitos dos suportes ou matrizes testados conduzem a uma diminuição da atividade enzimática, assim como numa diminuição da capacidade de ligação. Além disto, muitos destes suportes apresentam ainda inúmeras desvantagens: são caros, pouco rígidos, pouco flexíveis e susceptíveis a ataques microbianos (GENARI, 2003).

A escolha de um suporte é uma etapa essencial na implementação de um sistema reacional utilizando biocatalizadores imobilizados.

O Sephadex TM é um polímero sinteticamente derivado do polissacarídeo dextrana, com estrutura de uma rede que é amplamente utilizado na indústria, nos processos em larga escala, devido ao seu baixo custo, fácil obtenção de fluxo e da sua resistência ao ataque por microrganismos e a determinadas condições inóspitas de pH, temperatura. Outro polímero orgânico cada vez mais estudado é a polianilina (PANI), um polímero constituído por unidades repetidas de anilina, obtido através da polimerização química

ou eletroquímica deste monômero (NICOLAS-DEBARNOT e PONCIN-EPAILLARD, 2003) com inúmeras vantagens para utilização em processos de imobilização.

A presente proposta consiste em revestir grânulos de Sephadex com PANI e investigar a sua eficácia como suporte para a imobilização covalente da β -Galactosidase de *Arpergillus oryzae*, dispostos em coluna vertical e investigar as suas propriedades.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

As enzimas desempenham a função de catalisar as reações químicas nos organismos vivos e proporcionam imensas oportunidades para, industrialmente, realizar a conversão biocatalítica de forma eficiente e econômica. Muitas enzimas encontram-se disponíveis no mercado para inúmeras aplicações industriais em inúmeros setores como: agrícola, químico, farmacêutico, alimentícios, têxtil (BEILEN e LI, 2002). Com exceção de alguns RNA's que são catalisadores no seu processamento, todas as enzimas são proteínas que aumentam a velocidade das reações e são encontradas em células de animais ou de vegetais bem como em microrganismos (DALLA-VECCHIA, 2004).

2.1.1. β -Galactosidase

A β -D-Galactosidase (E.C. 3.2.1.23), lactase, ou mais formalmente β -D-Galactosidase galactohidrolase, é a enzima responsável pela hidrólise da lactose, dissacarídeo que ocorre naturalmente apenas no leite. A lactose frequentemente designada β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranosose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, açúcar redutor, é composta por uma molécula de glucose ligada a uma molécula de galactose. No estado aquoso coexiste sob duas configurações: α e β (Figura 1) (GANZLE, 2008).

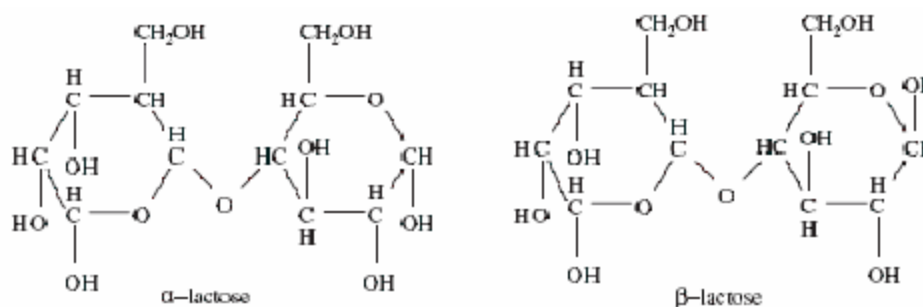


Figura 1 Estrutura da lactose na sua configuração α e β .

A β -D-Galactosidase pode ser obtida a partir de inúmeras fontes: vegetais (pêssego, damasco, maçã, amêndoas); órgãos de animais (intestino, cérebro, testículos, placenta, etc.); microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e

leveduras (ALMEIDA e PASTORE, 2001; JURADO *et. al.*, 2002; HAIDER e HUSSAIN, 2007a).

Estas enzimas são amplamente empregues na indústria. A sua capacidade como biocatalizador da hidrólise da lactose do leite e soro permite a fabricação de produtos com baixo teor do dissacarídeo. Esta hidrólise da lactose aumenta o caráter doce dos produtos, melhora a qualidade e a eficiência dos processos industriais (HATZINIKOLAOU *et. al.*, 2005). Industrialmente, podem ser obtidos inúmeros produtos utilizando a β -Galactosidase, entre eles destacam-se: leite sem lactose, produtos derivados de leite com baixa concentração de lactose, iogurtes adocicados, concentrados para sorvetes com baixa percentagem de lactose, xaropes alimentares e diversos produtos adocicados, processamento na extração de soro doce e soro ácido (NOVALIN *et. al.*, 2005). Recorre-se ainda a tratamento enzimático com esta enzima na produção e maturação de queijos (DIMITRELLOU *et. al.*, 2007; PAPAVASILIOU *et. al.*, 2008).

Outro produto interessante desta hidrólise é a D-Galactose, monossacarídeo maioritariamente encontrado no leite e que tem inúmeras aplicações: intermediário na produção de medicação, estabilizador em soluções intravenosas de aplicabilidade medicinal. Na indústria alimentícia é amplamente usada como ingrediente de diversos açúcares como a arabinose, pentitol, arabinitol, globotriose, arbitol, galactitol, xylitol e tagatose (IBRAHIM e SPRADLIN, 2000; GRANSTROM *et. al.*, 2004). É também usada em meio de cultura como nutriente e indutor de fermentações, além disso, pode ser usada em indústrias de bebidas, na produção de agentes contrastantes e como substitutos de fenóis em resinas (OHLERTH e O'BRIEN, 2007; STANNARD, 2007; DARGE, 2008).

A hidrólise da lactose torna ainda possível o consumo de produtos e derivados por indivíduos intolerantes a este açúcar. A intolerância alimentar ocorre por deficiência de produção de enzimas, que podem afetar a digestão e absorção dos carboidratos, gorduras e proteínas. Estes problemas podem ser decorrentes de erros inatos do metabolismo ou adquiridos e afetam cerca de 70% da população mundial (ANGELIS, 2005).

O uso da enzima na presença de altas concentrações de lactose faz com que ocorra transgalactosilação (GAUR *et. al.*, 2006) o que possibilita a produção de oligossacarídeos, biomoléculas bifidogênicas que ajudam na redução dos níveis de colesterol, melhoram a absorção de cálcio, entre outros benefícios (ALMEIDA e PASTORE, 2001; ALBAYRAK e YANG, 2002; JURADO *et. al.*, 2002; PERUGINO *et. al.*, 2004; NÉRI *et. al.*, 2009a, 2009b).

Apesar da β -galactosidase poder ser obtida de inúmeras fontes (Tabela 1), industrialmente, são preferencialmente usadas, aquelas produzidas por algumas leveduras e fungos, pela segurança da sua utilização (JURADO *et. al.*, 2002). As β -galactosidases de leveduras são geralmente usadas no fabrico de produtos de pH neutro como leite e soro de leite adocicado, já as dos fungos são usadas majoritariamente na hidrólise da lactose de produtos com pH ácido (HARJU, 1987). Entretanto, estudos com β -galactosidases de *Escherichia coli* demonstram que esta não é aconselhável na fabricação de produtos para alimentação de humanos (HENG e GLATZ, 1994; FUJIKAWA e ITOH, 1997).

A β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae*, fungo filamentoso é uma enzima extracelular amplamente estudada (NAGANAGOUDA *et. al.*, 2007; HAIDER e HUSSAIN, 2009a, 2009b). Apresentando vantagens em relação a diversos outros microrganismos, o *Aspergillus oryzae* é uma das fontes mais usadas e aceitas na indústria de alimentos, tendo sido classificado como “Generally Recognized as Safe” – GRAS (SHANKAR e MULIMANI, 2006).

Tabela 1 Possíveis fontes para a obtenção de β -Galactosidase. (Modificado de SHUKLA, 1975).

Vegetais	Pêssego
	Amêndoa
	Algumas espécies de rosas selvagens
Organismos animais	Intestino
	Cérebro e tecido da pele
Leveduras	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>
	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces)</i>
	<i>fragilis</i>
	<i>Cândida pseudotropicalis</i>
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Bacillus</i> sp
	<i>Streptococcus lactis</i>
Fungos	<i>Aspergillus foetidus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Aspergillus phoenecis</i>

As propriedades da β -Galactosidase, como por exemplo, a massa molecular, a temperatura ou pH ótimo diferem, de acordo com a fonte de obtenção (Tabela 2) e de acordo com o método de preparação comercial. As condições ótimas de operação são ainda influenciadas pelo método de imobilização das enzimas e o tipo de suporte utilizado.

Tabela 2 Propriedades de β -Galactosidase de acordo com as diferentes fontes. (Modificado de GEKAS e LÓPEZ - LEIVA, 1985).

Fontes	pH ótimo	Temperatura Ótima (° C)	Massa molecular (KDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3.0 – 4.0	55 - 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	4.5	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6.6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.9 – 7.3	35	135
<i>Escherichia coli</i>	7.2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6.0	60 – 65	-
<i>Bacillus</i> sp	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 pucillus</i>	4.5 – 6.0	60	-
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5 – 5.5	80	570

β -Galactosidases, de inúmeras origens microbianas, são responsáveis pela hidrólise da lactose segundo um mecanismo relativamente simples (Figura 2). Estas enzimas possuem dois resíduos de ácido glutâmico (Glu482 e Glu551), que atuam na reação enzimática assumindo o papel de doadores de prótons e de bases nucleofílicas simultaneamente. Inicialmente há a formação do complexo enzima-galactosil (Figura 2A) com liberação simultânea de glicose (Figura 2B). Posteriormente, o complexo é transferido para um receptor contendo um grupo hidroxila (Figura 2C). Se a solução de lactose for diluída, a água é o receptor mais competitivo (preferencial em relação aos açúcares glicose e lactose) e assim a galactose é liberada do sítio ativo pelo que a hidrólise da lactose é favorecida. Se, pelo contrário, a solução tiver altas concentrações de lactose, a molécula de lactose tem maior probabilidade de atuar como receptor, ligando-se com o complexo enzima-glicosil, formando oligossacarídeos (ZHOU, 2003).

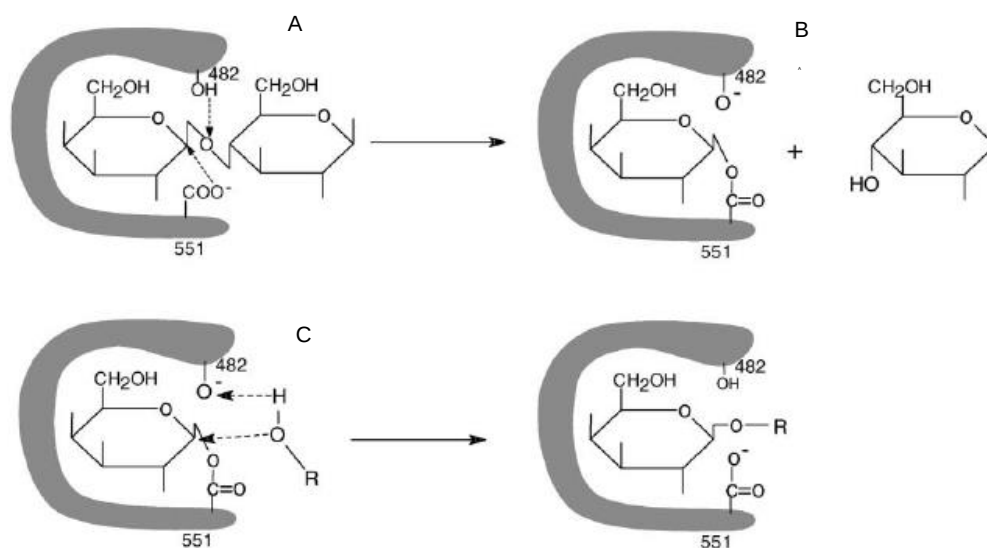


Figura 2. Mecanismo da hidrólise enzimática da lactose por ação da β -Galactosidase. (ZHOU, 2003). A) Complexo enzima-galactosil. B) Liberação de glicose. C) Transferência do complexo para um receptor R. O receptor R pode ser lactose, glicose ou hidrogênio, no caso específico do receptor ser a água.

Dada a sua importância industrial tem-se procurado otimizar e rentabilizar a utilização da β -Galactosidase. Ambas as formas utilizadas, livres e imobilizadas têm custos associados a serem considerados (GAUR *et. al.*, 2006). Apesar de ser usada preferencialmente na forma livre nas indústrias de laticínios em todo o mundo, por ser uma enzima bastante dispendiosa, tem aumentado o interesse na sua imobilização. Desta forma, tem-se investigado um processo de imobilização eficiente passível de garantir o máximo proveito com a tão desejada recuperação do imobilizado e a minimização de custos (ZHOU, 2003; PESSELA *et. al.*, 2007). No entanto, é extremamente difícil a obtenção de um catalisador com características ótimas para uso industrial (JURADO *et. al.*, 2002; LADERO *et. al.*, 2001; DI SERIO *et. al.*, 2003).

De um modo geral, as enzimas têm, essencialmente, três propriedades fundamentais: Estabilidade, Atividade e Especificidade (GALVÃO, 2004). A estabilidade de estrutura nativa, mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio, ligações de sulfeto, interações apolares e iônicas e forças de Van der Waals), garante a capacidade biológica da enzima. Qualquer modificação do ambiente reacional (alteração de pH, temperatura ou presença de solventes polares) pode danificar as interações, alterando a estrutura nativa e destruindo total ou parcialmente a sua função

biológica. As enzimas têm a capacidade de diminuir a energia de ativação necessária para a transformação do substrato em produto. A atividade, capacidade de transformação do substrato em produto por diminuição da energia de ativação, provoca o aumento da velocidade da reação. Esta característica das enzimas reside nos seus sítios ativos, estruturas complexas que compreendem um pequeno número de aminoácidos e cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais realizem a catálise. Por último, a especificidade que está relacionada com a afinidade da enzima por grupos específicos em determinados substratos e da reciprocidade deste comportamento. Esta especificidade mútua de grupos funcionais permite o correto alinhamento do seu sítio ativo. (MARQUEZ, 2007).

As enzimas podem ser usadas industrialmente, sob três formas: uso livre em batelada, em que a enzima misturada com o produto é perdida quando o hidrolisado é pasteurizado; uso livre das enzimas, recuperadas numa fase final por membranas impedindo que a enzima seja perdida e sob a forma imobilizada, em que a enzima é fixada física ou quimicamente a um suporte sólido, impedindo a sua livre circulação (FODA e LOPEZ-LEIVA, 2000). Entre os fatores determinantes para o sucesso de uma imobilização eficiente estão o método de imobilização e a escolha do suporte.

2.2. Imobilização de enzimas

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

Segundo Aires-Barros e Cabral (2003) as enzimas podem ser imobilizadas em matrizes ou suportes naturais ou sintéticos por Interações físicas (Enclausuramento, Oclusão) ou Interações químicas (Adsorção, Interação iônica, Ligação covalente), isto é:

O método por encapsulamento consiste no aprisionamento de enzimas ou células no interior de uma membrana semipermeável. Na oclusão o biocatalisador é confinado ao interior da matriz sem que seja estabelecida qualquer ligação química, não se

observam alterações estruturais ou interações com o centro ativo, enquanto que os substratos/produtos podem escoar através da matriz.

No caso das imobilizações por Interações químicas o biocatalisador é retido à superfície de uma superfície sólida mediante interações estabelecida entre a matriz e o biocatalisador. Uma vasta gama de interações abrangendo força de Van der Waals a ligações covalentes, pode ser responsável pela retenção do biocatalisador na matriz. Embora algumas destas interações se possam estabelecer entre o biocatalisador e a superfície não-modificada da matriz, a versatilidade e efetividade da imobilização superficial pode ser incrementada mediante a utilização de suportes sintéticos ou através de modificações químicas introduzidas na matriz por reação com agentes bifuncionais (glutaraldeído, carbodiimida) que permitem a ligação covalente.

O método de imobilização por adsorção é o método mais antigo e simples que consiste na adsorção a um suporte sólido (nylon, celite, cerâmica, vidro, entre outros) por ação de interações fracas do tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, hidrófobas e eletrostáticas, sem que haja uma modificação prévia da matriz ou do biocatalisador. Apesar de ser um método de baixos custos que assegura a integridade da manutenção da conformação da enzima e a retenção da atividade catalítica, é limitado dada a reversibilidade da ligação entre suporte e biocatalisador.

O método por Interação iônica se dá normalmente pela utilização de resinas de trocas iônicas como suportes de imobilização permitindo o estabelecimento de interações iônicas entre o biocatalisador e a matriz. A força deste tipo de interação situa-se entre a adsorção física e a ligação covalente caracterizando-se por limitações e vantagens idênticas à adsorção física, podendo ocorrer dessorção do biocatalisador a presença de meios reacionais com força iônica elevada ou em que se registrem variações significativas de pH (AIRES-BARROS e CABRAL, 2003).

A imobilização por ligação covalente consiste na formação de ligações entre os resíduos aminoácidos das enzimas e os grupos reativos da matriz. Por conferir grande estabilidade funcional às enzimas é um dos métodos mais estudado e difundido (AIRES-BARROS e CABRAL, 2003, GÓMEZ *et. al.*, 2005). Por vezes as enzimas podem ser ligados covalentemente através de ligações cruzadas “cross-linking”, com reagentes bi- ou multifuncionais, como aldeídos ou aminas e diisocianatos, da qual

resulta a formação de agregados tridimensionais, insolúveis em água. De entre os agentes utilizados para a formação de ligações covalentes destaca-se o glutaraldeído que reage com os grupos amina dos resíduos de lisina da enzima formando uma base de Schiff (AIRES-BARROS e CABRAL, 2003).

Algumas representações esquemáticas dos diferentes tipos de imobilização de enzima são ilustradas na Figura 3.

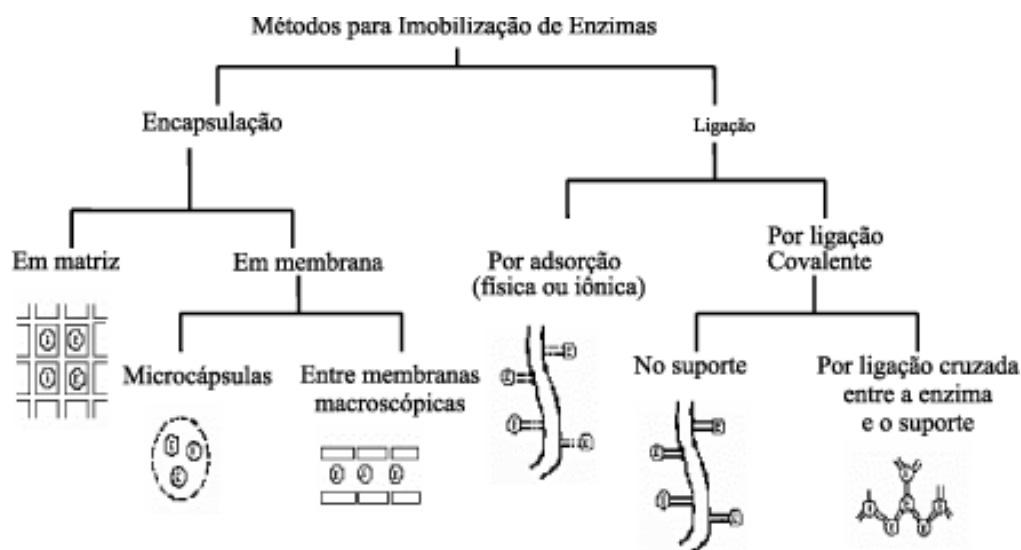


Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA, 2004).

Um sistema de enzimas imobilizadas resulta, geralmente, na obtenção de níveis elevados de atividade catalítica por unidade mássica ou molar, especificidade elevada e limitação de reações secundárias (HAIDER e HUSSAIN, 2009a). Enquanto que a enzima quando livre no meio de reação é inativada ou descartada após ter sido utilizada uma vez, sendo economicamente inviável a sua recuperação. A partir de enzimas imobilizadas é possível não só a implementação de processos contínuos como também a recuperação do catalisador por métodos simples de separação, possibilitando o reuso. O uso destas técnicas de imobilização de enzimas pode proporcionar a obtenção de catalisadores operacionais e termicamente mais estáveis (BLANCO *et. al.*, 2004) e mais seletivos (FERNANDEZ-LORENTE *et. al.*, 2003). Assim, o processo tornar-se-á tão mais econômico quanto mais elevado for o custo da enzima. Além disso, imobilizando-se a enzima no meio de reação elimina-se a etapa de inativação da

enzima, sendo possível empregar uma maior concentração da mesma. Como consequência tem-se uma redução no volume dos reatores e conseqüentemente uma diminuição do investimento fixo nas instalações (ROBLE, 2000; BORZANI, 2001; LIM, 2003; KOURKOUTAS *et. al.*, 2004; GÓMEZ *et. al.*, 2005; SZYMANSKA *et. al.*, 2007).

O tipo de suporte e o método de imobilização variam de enzima para enzima e de acordo com o uso pretendido e devem ser otimizados para cada sistema (BURTON, 2002; PLESSAS *et. al.*, 2005).

Em muitos casos, a enzima imobilizada apresenta estabilidade superior à solúvel quando adequadamente imobilizada e o produto obtido é mais puro apresentando uma qualidade mais constante. A imobilização de enzimas permite, geralmente, um controle de todo o processo (OZDURAL *et. al.*, 2003), sendo muitas vezes possível a redução do grau de inibição da reação pelo produto formado, o deslocamento do pH ótimo ou a mudança das constantes cinéticas da reação (KOURKOUTAS *et. al.*, 2004). Ocorre, geralmente, um aumento da produtividade por unidade de enzima.

O comportamento dos reatores de enzimas imobilizadas tem sido também estudado como um ponto crítico dos processos da produção industrial (XUEMEI *et. al.*, 2006).

Enzimas têm sido imobilizadas para aplicação em biossensores (YU *et. al.*, 2006; SHAN *et. al.*, 2007). Estes equipamentos são baseados na incorporação de elementos biológicos (enzimas ou células) em uma camada sensível intimamente conectada com um transdutor e têm sido amplamente aplicados em diversos campos, como monitoramento de processos industriais, testes de detecção clínica e controle ambiental. Como vantagens da utilização destes equipamentos, podem ser citadas simplicidade de uso, alta sensibilidade e habilidade para medidas em tempo real e *in loco* (DONG, CHEN 2002) ou na produção de compostos de elevado valor acrescentado (FERNANDES *et. al.*, 2003).

2.2.1. Suportes de imobilização

A aplicação do método de imobilização das enzimas depende de factores essenciais ao processo, tais como: substratos utilizados, tipos de reações e as configurações dos reatores, exigindo um suporte adequado para atender às

necessidades da reação. O principal fator é selecionar o suporte adequado definido como uma parte não catalítica da imobilização de enzimas, na qual a parte catalítica é construída. Assim o método escolhido deve atender as duas necessidades: a catalítica, relativa à produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não catalítica, relativa a processos de controlo e separação (DALLA-VECCHIA, 2004; CAO, 2005). Existem inúmeras características que devem ser convenientemente consideradas quando se escolhe o suporte por serem condições passíveis de afetar o processo de produção. Entre as características podem destacar-se: área de superfície e porosidade, que devem ser elevadas de modo a promover o acesso da enzima ao substrato; presença de grupos funcionais na superfície, uma vez que o tipo de grupo funcional e a quantidade disponível afetam o rendimento e a estabilidade do material; tamanho e forma, de preferência partículas uniformes; resistência microbiana, da qual depende a durabilidade do suporte; estabilidade mecânica e química, de modo a preservar as suas características; natureza hidrofóbica e hidrofílica, garantindo a compatibilidade entre o suporte e a fase líquida para assegurar a troca do substrato e do produto no suporte (GALVÃO, 2004; CAO, 2005).

Existem inúmeros materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e/ou células. Estes suportes podem ser classificados de acordo com a sua composição química, em orgânicos ou inorgânicos podendo também ser classificados, de acordo com a sua composição e morfologia, em naturais e sintéticos como apresentado na Tabela 3 (GALVÃO, 2004).

Segundo GROBOILLOT *et. al.* (1994), a indústria alimentícia tem mostrado tendência na utilização de polímeros não tóxicos que formam estruturas semelhantes a géis, como proteínas, polissacarídeos e álcoois polivinílicos, em função da biocompatibilidade e aceitabilidade na produção de alimentos.

Tabela 3. Classificação dos diferentes suportes de acordo com a sua composição.

SUPORTES				
Orgânicos			Inorgânicos	
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro (PC)
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonina	Cerâmica (PC)
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)
Agar	Gelatina	Nylon	Pedra-Polme	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de Ferro
Amido		Vinil		Óxido de Níquel
		Policrilamidas		

Os suportes sintéticos são produzidos pela polimerização de monômeros, ou, em alguns casos, pela combinação de matérias naturais, como a agarose, e monômeros sintéticos, como os derivados de acrilamida, metacrilato e poliestireno. Estes suportes apresentam grande estabilidade física e química, e podem ser facilmente adquiridos (HERMANSON, 1992).

Dentre a grande variedade de suportes para imobilização de enzimas, os inorgânicos apresentam uma série de vantagens, tais como: elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a ataque de microrganismos e de solventes orgânicos (HERNÁNDEZ-JÚSTIZ *et. al.*, 1998). Além disso, os materiais inorgânicos não apresentam modificação na sua estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH pelo que tornariam os suportes inorgânicos mais adequados para o uso industrial. Contudo alguns fatores como alto custo deste tipo de suporte e grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser adicionados e/ou ativados em suportes orgânicos (CASTRO, 2000; HEINZE e LIEBERT, 2001) contribuem para que a maioria das enzimas imobilizadas, disponíveis comercialmente, sejam obtidas com suportes orgânicos. Sabe-se, também, que as propriedades dos preparados de enzima imobilizada são governadas pelas características da enzima e do suporte usados (TISCHER e KASCHE, 1999), bem como pela estratégia de imobilização empregada

(CÁRDIAS *et. al.*, 1999). Essas interações são responsáveis pelas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas do sistema imobilizado suporte-enzima.

Dentre os inúmeros tipos de suportes intensivamente estudados para a imobilização de enzimas destacam-se: sílica (WANG e CARUSO, 2005); celulose (BAGHERI *et. al.*, 2007); suportes cromatográficos (CARDOSO, 2009); nylon-6 (AMAYA-DELGADO, 2006), quitosana, Dacron (CARNEIRO-LEÃO *et. al.*, 1994; AMARAL *et. al.*, 2006; PIMENTEL *et. al.*, 2007), polianilina (NADRUZ *et. al.*, 1996; LASKA, 1999; SINGH *et. al.*, 2006; NERI *et. al.*, 2009a), diversas matrizes magnéticas (BAYRAMOGLU *et. al.*, 2008; KUROIWA *et. al.*, 2008;) e combinações de matrizes (COELHO *et. al.*, 2001).

A imobilização de β -Galactosidase, de diferentes origens tem sido realizada em diversos suportes: β -Galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada por ligação covalente em agarose-tiopropil (OVSEJEVI *et. al.*, 2004), suporte de gelatina-celulose (NUMANOGLU e SUNGUR, 2004) e compósitos álcool-magnéticos polisiloxano-polivinil – mPOS-PVA (NÉRI *et. al.*, 2008). β -galactosidases de *Kluyveromyces fragilis* foram imobilizadas em celulose (ROY e GUPTA, 2003), de *Thermus sp.* (LADERO *et. al.*, 2006; PESSELA *et. al.*, 2007), *Escherichia coli* (BAYRAMOGLU, 2007) e *Aspergillus oryzae* em suporte de imunoafinidade e esferas híbridas de amido (HAIDER e HUSSAIN, 2009).

2.2.1.1. Sephadex™

Sephadex™ é o nome comum de grânulos sinteticamente derivados do polissacarídeo dextrana, polissacarídeo quimicamente neutro e inerte, portanto compatível com as substâncias encontradas na maioria dos alimentos. As suas cadeias são inter cruzadas aleatoriamente conferindo-lhe a estrutura de uma rede (Figura 4). Apresenta graus variáveis de porosidade e tamanhos que variam em intervalos discretos de 20 a 300 μ m.

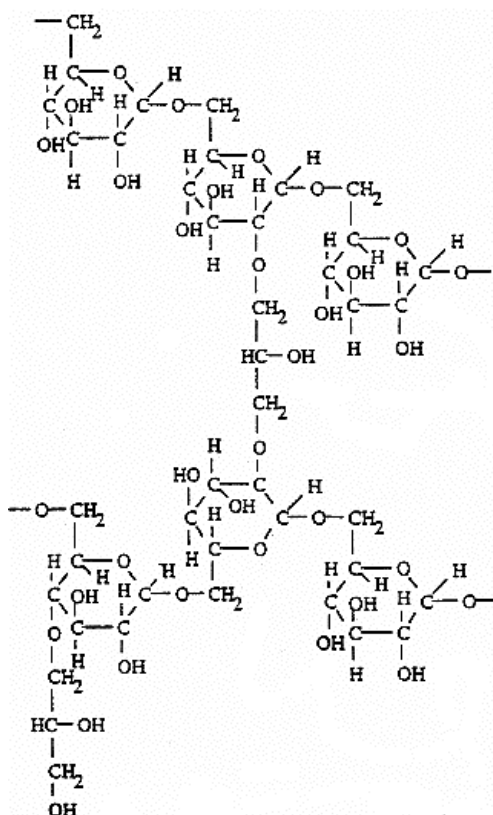


Figura 4. Estrutura do Sephadex™.

Os grânulos de Sephadex são constituídos de um derivado de dextrana cujas cadeias de glicose são ligadas entre si através de ligações glicosídicas do tipo 1→4 e 1→6. Seus tamanhos determinam os tipos G-20, G-50, G-75 entre outros.

Tem sido utilizado em diversas aplicações, nas mais diversas áreas, na separação de misturas com base: no tamanho dos seus componentes-filtração molecular (FUCHISE *et. al.*, 2009); na carga elétrica - troca iônica (LU *et. al.*, 2009); no princípio termodinâmico da extração aquosa de duas fases (MACBRIDE *et. al.*, 1994); na especificidade de ligantes incorporados - cromatografia por afinidade (EMMONS *et. al.*, 2009) e como suporte para imobilização de enzimas, antígenos, anticorpos, lectinas, receptores, entre outros.

O seu uso corrente em indústria nos processos de larga escala decorre do seu baixo custo, da fácil obtenção de fluxo e da sua resistência a ataque por microrganismos e a determinadas condições inóspitas de pH e temperatura (DWEVEDI e KAYASTHA, 2009).

2.2.1.2. Polianilina–PANI

Outro polímero orgânico que vem merecendo cada vez mais especial atenção pela comunidade científica é a polianilina – PANI (Figura 5.). Este polímero, orgânico e condutor, pertence a uma classe altamente promissora de polímeros que alia as propriedades químicas e mecânicas dos polímeros com propriedades eletrônicas dos metais e semicondutores. É um polímero constituído por unidades repetidas de anilina, obtido através da polimerização química ou eletroquímica deste monômero. O método químico é relativamente simples e barato quando comparado com o método eletroquímico. Apesar do método eletroquímico ter inúmeras vantagens, nomeadamente, no que se prende com o fato das propriedades elétricas dos compósitos poderem ser alteradas variando as condições de eletrólise e por ser uma tecnologia “clean”, ele apresenta desvantagens uma vez que o tamanho dos filmes compósito depende do tamanho do eletrodo. Assim, genericamente a síntese química é preferencial (ANAND, 1998).

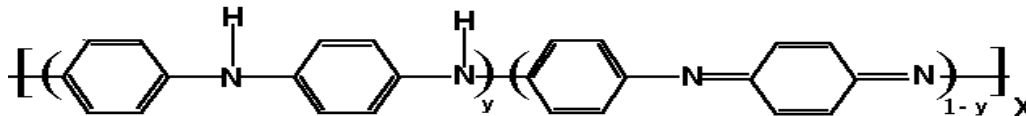


Figura 5. Forma básica da PANI.

Os valores que a constante y pode assumir indicam o grau de oxidação do composto, que varia de 0 a 1. Quando se tem a forma completamente reduzida ($y = 1$), o polímero é chamado leucoesmeraldina; quando totalmente oxidado ($y = 0$), tem-se a pernigranilina e quando se encontra uma forma intermediária ($y = 0,5$), esta é denominada hidrocloreto de esmeraldina, que é a forma que apresenta maior condutividade elétrica (QUNWEI *et. al.*, 2008).

A PANI é um polímero extremamente versátil com propriedades únicas que incluem uma boa estabilidade ambiental, simplicidade do processo de dopagem e excelente reciclagem de redução o que possibilita que polímeros com diferenças significativas possam ser construídos por meios de tratamentos ácidos ou básicos (FERNANDES *et. al.*, 2003).

Com enorme interesse tecnológico e biotecnológico, a PANI tem, assim sido proposta para inúmeras aplicações: sensores para a detecção de amônia (XU *et. al.*, 2007), construção de supercapacitores (DONG *et. al.*, 2007), despoluição por redução de metais pesados (OLAD e NBAVI, 2007) e como suporte para ser utilizado em processos de imobilização (FERNANDES *et. al.*, 2003; NGAMNA *et. al.*, 2005; SINGH *et. al.*, 2006; NÉRI *et. al.*, 2009). Além do seu baixo custo de síntese comparado aos demais polímeros orgânicos frequentemente empregues em imobilização, ele ainda apresenta uma grande estabilidade térmica e de armazenamento e valores de condutividade elétrica variados, dependendo do grau de oxidação e dopagem por ácidos ou álcalis, além de propriedades eletrocromica, com mudança de cor de acordo com o estado de oxidação (NICOLAS-DEBARNOT e PONCIN-EPAILLARD, 2003) e interessantes propriedades ópticas (DUTTA, DE, 2007) que possibilita que os polímeros desta família possam ser usados como “shutters” de calor e diodos emissores de luz em circuitos elétricos.

A polianilina é na realidade o único polímero condutor cujas propriedades eletroquímicas podem ser, controladamente, alteradas tanto por dopagem, transferência de carga e/ou protonação. Devido a sua resposta eletroquímica reversível no decorrer da oxidação aniônica e redução catiônica ela é também usada como eletrodo secundário em baterias recarregáveis e aparelhos eletrocromicos (ANAND, 1998). Desde o início o principal interesse no estudo deste polímero é comercial. A promessa na sua utilização está relacionada, essencialmente, com a combinação da sua leveza, processamento e condutividade elétrica, podendo ser aplicada em aparelhos de estocagem de energia como as mencionadas baterias recarregáveis e capacitores. Este tipo de polímeros podem ainda ser usados em sensores de gás e como transportadores de medicação na área medicinal. A sua vasta gama de utilização justifica o investimento no estudo deste tipo de polímeros. (ANAND, 1998).

Estes polímeros apresentam, no entanto, problemas que se prendem com a dificuldade de síntese por métodos convencionais. Existe ainda a dificuldade de realização dos ensaios enzimáticos em que a PANI atua como suporte da enzima imobilizada resulta na perda de suporte-enzima, diminuindo a precisão de determinação da atividade. Assim, alguns pesquisadores têm procurado usá-la conjuntamente com

outra matriz (CARAMORI, FERNANDES, 2004; LUO, DUO, 2004). Desta forma aliam-se propriedades mecânicas da matriz às propriedades elétricas da polianilina (ANAND, PALANIAPPAN, SATHYANARAYANA, 1998). Outro problema no uso deste tipo de polímeros condutores é referente à ligação da enzima. Esses problemas podem muitas vezes ser contornados pela ligação mediada pelo glutaraldeído (GAIKWAD et. al., 2006).

O mecanismo proposto por NICOLAS-DEBARNOT e PONCIN-EPAILLARD (2003) para a síntese do PANI ocorre pela condensação da anilina através de diferentes passos. O primeiro passo correspondeu à oxidação, transferência de elétrons a partir do nível energético 2 s do átomo de azoto com a formação de um radical cátion (Figura 6). Do ponto de vista cinético, é o passo limitante e o catalisador (ex: Persulfato de amônio) se fez necessário para acelerar a reação de autocatálise.

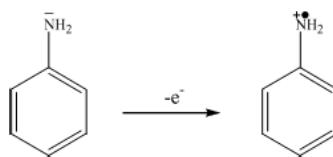


Figura 6. Formação do radical cátion de anilina.

Este radical cátion da anilina tem três formas de ressonância (2 n-anilina e 1 p-anilina), tal como representado na Figura 7, sendo a forma p-anilina a mais reativa tanto pelo seu efeito substituinte indutor como pela ausência de impedimento estérico.

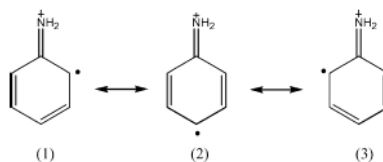


Figura 7. Formas de ressonância do radical cátion de anilina (1 e 3 n-anilina, 2 p-anilina).

O passo seguinte, em meio ácido (ex: HCl, H₂SO₄), seria a reação entre o radical cátion (p-anilina) e a forma ressonância chamada "cabeça a cauda" que favorece a reação, que corresponde a formação do dímero (Figura 8).

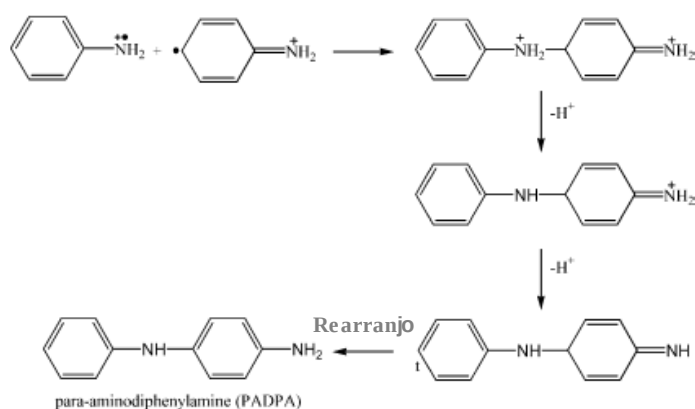


Figura 8. Formação do dímero.

Em seguida, o dímero é oxidado para formar novo radical cátion (Figura 9), que pode reagir seja com o radical cátion de um monômero ou com o radical cátion de um dímero para formar, respectivamente, um trímero ou tetrâmero que, de acordo com o mecanismo proposto anteriormente, pode levar a polímeros maiores (Figura 10).

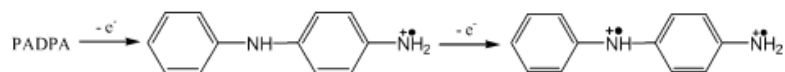


Figura 9. Formação do dímero radical cátion.

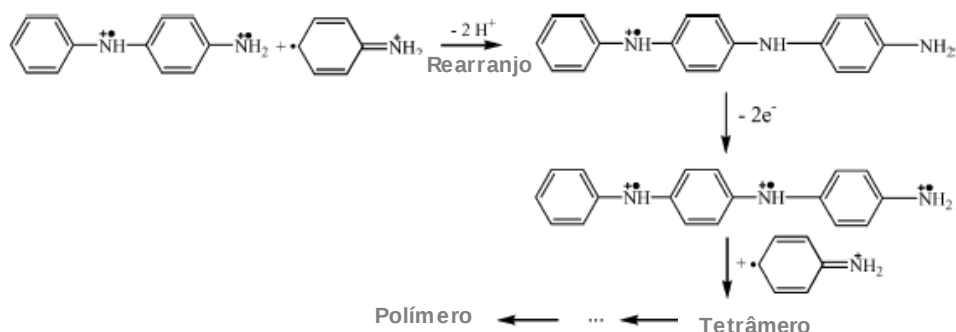


Figura 10. Possível síntese da PANI.

A PANI é um polímero condutor específico devido ao seu mecanismo de condução induzido tanto por oxidação da base polileucoemeraldina ou pela protonação da base poli(emeraldina). As duas rotas estão esquematizadas na Figura 11.

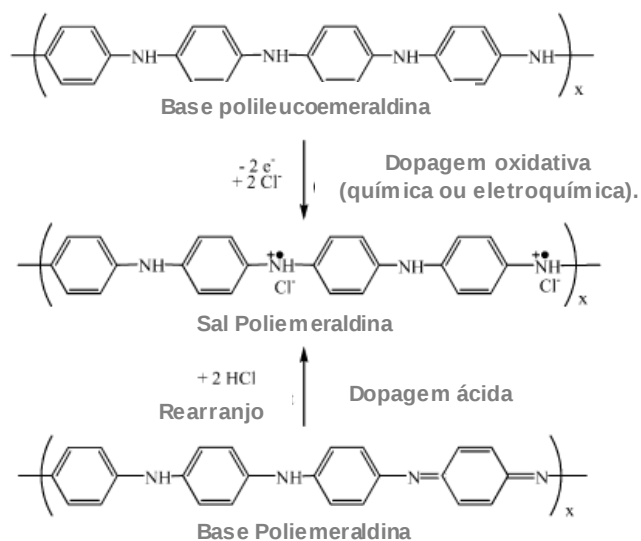


Figura 11. Mecanismo de dopagem ácida.

Na literatura a polianilina é suposta ser um octâmero, porém a formação de cadeias longas tem sido mencionada (NICOLAS-DEBARNOT; PONCIN-EPAILLARD, 2003). Nos laboratórios da UFPE, a PANI tem sido usada com sucesso na imobilização de antígenos e enzimas (LEITE *et. al.*, 1996; NADRUZ *et. al.*, 1996; COELHO *et. al.*, 2001).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Propor Sephadex G-50 revestido com Polianilina (PANI) como suporte para imobilização da β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

3.2. Objetivos Específicos

- Revestir o Sephadex G50 com PANI, mediante síntese química;
- Caracterizar o suporte (Sephadex G50- PANI) mediante análises físico-químicas e microscopia eletrônica;
- Imobilizar covalentemente, via glutaraldeído, β -Galactosidase ao Sephadex-PANI;
- Determinar a retenção de proteína e a atividade específica do derivado enzimático;
- Determinar a velocidade de fluxo na coluna com o Sephadex- PANI;
- Avaliar a estabilidade do suporte quanto ao número de reusos;
- Avaliar o pH ótimo e temperatura ótima.
- Verificar a funcionalidade da coluna contendo o derivado enzimático na hidrólise de leite.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Bioseparações in **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. LIDEL, LISBOA, 2003.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. **Galactooligossacarídeos: Produção e efeitos benéficos**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 35 (1/2), p.12-19, 2001.

AMARAL, I. P. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. **Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron**. Process Biochemistry, v. 44, p. 1213-1216, 2006.

AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASITAS, M. C. **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads**. Food Chemistry, v. 99, p. 299–304, 2006.

ANAND, J.; PALANIAPPAN, S.; SATHYANARAYANA, D. N. **Conducting polyaniline blends and composites**. Progress in Polymer Science, v. 23, p. 993-1018, 1998.

ANGELIS, R. C. **Alergias alimentares: tentando entender por que existem pessoas sensíveis a determinados alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.

AZEVEDO, W. M.; SOUZA, J. M.; MELO, J. V. **Semi-interpenetrating polymer networks base don polyaniline and polyvinil alcohol-glutareldehyde**. Synthetic metals, v. 100, p. 241-248, 1998.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 984p. 1986.

BAGHERI, M.; RODRÍGUEZ, H.; SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; DALY, D. T.; ROGERS, R. D. **Ionic Liquid-Based Preparation of Cellulose Dendrimer Films as Solid Supports for Enzyme Immobilization**. Biomacromolecules, v. 9 (1), p. 381-387, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. **Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor.** Catalysis Communications, v. 8, p. 1094-1101, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. **Preparation of nanoficrous polymer grafted magnetic poly (GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption.** Biochemical Engineering Journal, v. 40, p. 262-274, 2008.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G. **Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 83-93, 2004.

BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** (1ª ed.), São Paulo, Edgard Blucher Ltda, v. 2, 2001.

BURTON, S. G., COWAN, D. A.; WOODLEY, J. M. **The search for the ideal biocatalyst.** Nature Biotechnology, v. 20, p. 37-45, 2002.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. **Covalent Immobilization of horseradish peroxidase onto Poly(ethylene terephthalate)-Poly(aniline) composite.** Process Biochemistry, v. 39 (7), p. 883-888, 2004.

CARDIAS, H. C. T.; GRININGER, C. C.; TREVISAN, H. C.; GUIBAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. **Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 16, p. 141-148, 1999.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. **Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds.** Química Nova, v. 32, p.175-187, 2009.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; OLIVEIRA, E. A.; CARVALHO, L. B. JR. **Immobilization of protein on ferromagnetic dacron**. Applied Biochemical Biotechnology, v. 31, p. 53–56, 1991.

CAO, L. **Immobilised enzymes: science or art?** Current Opinion in Chemical Biology, v.9, p. 217-226, 2005.

CASTRO, H. F.; Silva, M. L. C. P.; Silva, G. L. J. P. **Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 17, p.4-7, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. **Fine chemicals by biotransformation using lipases**. Química Nova, v. 18 (6), p. 544-554, 1995.

ÇETINUS, Ş. A.; ŞAHİN, E.; SARAYDIN, D. **Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization**. Food Chemistry, v. 114 (3), p. 962-969, 2009.

COELHO, R. A. L.; SANTOS, G. M. P.; AZEVEDO, P. H. S.; JAQUES, G. A.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO JUNIOR, L. B. **Polyaniline-Dacron composite as solid phase in ELISA for *Yersinia pestis* antibody detection**. Journal Biomedical Material Resources, v. 56 (2), p. 257-260, 2001.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Synthetic applications of immobilized lipases in polymers**. Química Nova, v. 27, 2004.

DAVID, A. E. **Immobilization of enzymes on nanoporous silica composites**. Tese de doutorado. University of Maryland, college Park, 2004.

DARGE, K. **Voiding urosonography with ultrasound contrast agents for the diagnosis of vesicoureteric reflux in children: I. Procedure**. Pediatric Radiology, v. 38, p.40–53, 2008.

DEBARNOT, D. N.; PONCIN-EPAILLARD, F. **Polyaniline as a new sensitive layer for gas sensors**. Analytica Chimica Acta, v. 475, p. 1–15, 2003.

DELGADO, A. L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASITAS, M. C. **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 micro beads.** Food Chemistry, v. 99, p. 299-304, 2006.

DENG, H. T.; XU, Z. K.; LIU, Z. M.; WU, J.; YE, P. **Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fibre microfilters.** Enzyme Microbial Technology, v. 35, p. 437-443, 2004.

DI SERIO, M.; MATURO, C.; DE ALTERIS, E.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. **Lactose hydrolysis by immobilized β -Galactosidase: The effect of the supports and the kinetics.** Catalysis Today, v. 79-80, p. 333-339, 2003.

DIMITRELLOU, D., KOURKOUTAS, Y., BANAT, I.M., MARCHANT, R., KOUTINAS, A.A. **Whey cheese production using freeze-dried kefir co-culture as a starter.** J. Appl. Microbiol., v. 103, p. 1170–1183, 2007.

DOMINIQUE, N. D.; FABIENNE, P. E. **Polyaniline as a new sensitive layer for gás sensors.** Analytica Chimica Acta, v. 475, p.1-15, 2003.

DONG, S.; CHEN, X. **Some new aspects in biosensors.** Reviews in Molecular Biotechnology, v. 82, p. 303-323, 2002.

DONG, B.; HE, B. L.; XU, C. L.; LI, H. L. **Preparation and electrochemical characterization of polyaniline/multi-walled carbon nanotubes composites for supercapacitor.** Materials Science and Engineering, v. 143, p. 7-13, 2007.

DUTTA, K.; DE, S. K. **Optical and nonlinear electrical properties of SnO₂-Polyaniline nanocomposites.** Materials Letters 61, v. 27, p. 4967-4971, 2007.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA A. M. **Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (*PsBGAL*) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications.** Bioresource Technology, v. 100 (10), p. 2667-2675, 2008.

EGOROV, A. M.; KUROCHKINA, V. B.; SKLYARENKO, A. V.; NYS, P. S. **Enzymatic transformation of betalactam antibiotics. Trends of development and approaches**

to practical implementation, Vestnik Moskovskogo Universiteta, v. 41 (6), p. 43-46, 2000.

EMMONS, T. L.; MATHIS, K. J.; SHUCK, M. E.; REITZ, B. A.; CURRAN, D. F.; WALKER, M. C.; LEONE, J. W.; DAY, J. E.; BIENKOWSKI, M. J.; FISCHER, H. D.; TOMASSELLI, A. G. **Purification and characterization of recombinant human soluble guanylate cyclase produced from baculovirus-infected insect cells.** Protein Expression and Purification, v. 65, p. 133–139, 2009.

FERNANDES, K. F.; LIMA C. S.; PINHO, H.; COLLINS, C. H. **Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers.** Process Biochemistry, v. 38, p. 1379-1384, 2003.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FÉRNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. **Régio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis.** Tetrahedron, v. 59, p. 5705-5711, 2003.

FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. **Continuous Production of Oligosaccharides from Whey Using a membrane Reactor.** Process Biochemistry, v. 35 (6), p. 581-587, 2000.

FUJIKAWA H.; ITOH, T. **Differences in the thermal inactivation kinetics of *Escherichia coli* β -galactosidase in vitro and in vivo.** Biocontrol Science, v.2 (2), p. 73–8, 1997.

FUCHISE, T.; KISHIMURA, H.; SEKIZAKI, H.; NONAMI, Y.; KANNO, G.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; CHUN, B. B. S. **Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*).** Food Chemistry, v. 116 (3), p. 611-616, 2009.

GAIKWAD, P. D.; SHIRALE, D. J.; GADE, V. K.; SAVALE, P. A.; KHARAT, H. J.; KAKDE, K. P.; SHIRSAT, M. D. **Immobilization of GOD on Electrochemically Synthesized PANI Film by Cross-linking via Glutaraldehyde for Determination of Glucose.** International Journal of Electrochemical Science, v. 1, p. 425-434, 2006.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e Quimotripsina imobilizadas em diferentes Suportes**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. **Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives (Review)**. International dairy journal, v. 18, p. 685– 694, 2008.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. **Galactooligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase**. Food Chemistry, v. 97, p. 426-430, 2006.

GENARI, A. N.; PASSOS, F. V.; PASSOS, F. M. L. **Configuration of a Bioreactor for Milk Lactose Hydrolysis**. Journal of Dairy Science, v. 86, p. 2783-2789, 2003.

GERBSCH, N.; BUCHHOLZ, R. **New processes and actual trends in biotechnology**. FEMS Microbiology Reviews. v. 16, p. 259-269, 1995.

GÓMEZ, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. **Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers**. Reactive & Functional Polymers, v. 57, p. 57-65, 2003.

GRANSTROM, T. B.; TAKATA, G.; TOKUDA, M.; IZUMORI, K. **Izumoring – A novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 97, p. 89–94, 2004.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. **Immobilization of cells for application in the food industry**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 14, p. 75-107, 1994.

GUPTA, M. N.; ROY, I. **Enzymes in organic media: Forms, functions and applications**. European Journal of Biochemistry, v. 271, p. 2575-2583. 2004.

HAIDER T.; HUSAIN Q. **Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose**. Int. J. Biol. Macromol. v. 41, p. 72–80, 2007a.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Immobilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support.** Biochemical Engineering Journal, v. 43, p. 307-314, 2009a.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Immobilization of β -Galactosidase by bioaffinity on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hidrolisis of lactose.** International Dairy Journal, v. 19, p. 172-177, 2009b.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Preparation of lactose free milk by using salt fractionated almond (*Amygdalus communis*) β -Galactosidase.** Journal of Science of Food and Agriculture, v.87, p.1278-1283, 2007b.

HARJU M. **Lactose hydrolysis.** International Dairy Federation, v. 212, p. 50–4, 1987.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 39 (2), p. 235-251, 2006.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS D. **Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey per meate by a thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus niger*.** Biochemical Enineering Journal, v. 24, p. 161–172, 2005.

HEINZE, T.; LIEBERT, T. **Unconventional methods in cellulose functionalization.** Prog. Polym. Science. v. 26, p. 1689-1762, 2001.

HENG, M. H.; GLATZ, C. E. **Ion exchange immobilization of charged β -galactosidase fusions for lactose hydrolysis.** Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 745–52, 1994.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. **Immobilized Affinity Ligand Techniques.** Academic Press, Inc., New York, 1992.

HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. **Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 27 (1-2), p. 26-32, 2000.

HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUISAN, J. M. **Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59 (1), p. 73-79, 1998.

IBRAHIM, O. O.; SPRADLIN, J. E. **Process for manufacturing D-tagatose.** United States, Patent US6057135, 2000.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. **A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 300-309, 2002.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. **Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** *Journal of Molecular Catalysis*, v. 10, p. 157-176, 2000.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS A. **Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.** *Food Microbiology*, v. 21 (4), p. 377-397, 2004.

KUROWA, T.; NOGUCHI, Y.; NAKAJIMA, M.; SATO, S.; MUKATAKA, S.; ICHIKAWA, S. **Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylosecoated magnetic nanoparticles.** *Process Biochemistry*, v. 43, p. 62–69, 2008.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, J. L.; GARCIAOCHOA, F. **Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -Galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 181-193, 2001.

LADERO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, B.C.C.; VIAN, A.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. **Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 31 (1), p. 14-24, 2006.

LASKA, J.; WŁODARCZYK, J.; ZABORSKA, W. **Polyaniline as a support for urease immobilization.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 6, p. 549–553, 1999.

LEITE, V.; DA SILVA, V. L.; AZEVEDO, W. M.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. **Increasing glucose determination range by flow injection analysis (FIA) using glucose oxidase immobilised in polyaniline.** Biotechnology Techniques, v. 8, p. 133-6, 1994.

LIM, H. L.; MACDONALD, D. G.; HILL, G. A. **Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase.** Biochemical Engineering Journal, v. 13 (1), p. 53-62, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Q.; BURNS, M. C.; MCDEVITT, P. J.; GRAHAM, T. L.; SUKMAN, A. J.; FORNWALD, J. A.; TANG, X.; GALLAGHER, K. T.; HUNSBERGER, G. E.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT D. B.; KERRIGAN, J. J.; LEWIS, T. S.; KYUNG R. S.; JOHANSON, A. O. **Optimized procedures for producing biologically active chemokines.** Protein Expression and Purification, v. 65, p. 251–260, 2009.

LUO, Y. C.; DO, J. S. **Urea biosensor based on PANi (urease)-Nafion[®] /Au composite electrode.** Biosensors and Bioelectronics, v. 20, p. 15-23, 2004.

MACDIARMID, A. G.; CHIANG, J. C.; HALPERN, M.; HUANG, W. S.; MU, S. L.; SOMASIRI, N. L. D.; WU, W.; YANINGER, S. I. **Polyaniline: Interconversion of Metallic and Insulating Forms.** Molecular. Cryst. Liq. Cryst., v. 121, p. 173-180, 1985.

MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. **Polyanilines: A Novel Class of Conducting Polymers.** Faraday Discussions of the Chemical Society., v. 88, p. 317-332, 1989.

MAHONEY, R. R. **Lactose: Enzymatic modification. In: Lactose, water, salts and vitamins.** Advanced Dairy Chemistry, v. 3, p. 77-125, 1997.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

MELO, J. V.; BELLO, M. E.; AZEVÊDO, W. M.; SOUSA, J. M.; DINIZ, F. B. **The effect of Glutaraldehyde on the electrochemical behaviour of polyaniline.** *Electrochimica acta*, v. 44, p. 2405-2412, 1999.

MIAO, S.; ROOS H. Y. **Nonenzymatic Browning Kinetics in Low-moisture Food Systems as Affected by Matrix Composition and Crystallization.** *Journal of Food Science*, v. 70 (2), p. 69–77, 2005.

NADRUZ, J. R. W; MARQUES, E. T. A.; AZEVEDO, W. M.; LIMA FILHO, J. L.; CARVALHO JUNIOR, L. B. **Immobilized xanthine oxidase on polyaniline silicone composite.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 29, p. 347-350, 1996.

NAGANAGOUDA, K.; PRASHANTH, S. J.; SHANKAR, S. K.; DHANANJAY, S. K.; MULIMANI, V. H. **Immobilization of *Aspergillus oryzae* α -Galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk.** *World Journal Microbiol Biotechnology*, v. 23, p. 1131-1137, 2007.

NGAMNA, O.; MORRIN, A.; MOULTON, S. E.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R.; WALLACE, G. G. **An HRP based biosensor using sulphonated polyaniline.** *Synthetic Metals*, v. 153, p. 185-188, 2005.

NICOLAS-DEBARNOT, D.; PONCIN-EPAILLARD, F. **Polyaniline as a new sensitive layer for gas sensors.** *Analytica Chimica Acta*, v. 475, p. 1–15, 2003.

NÉRI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; DOURADO, F. O. Q.; OLIVEIRA, J. M. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; TEIXEIRA J. A. **Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles.** *Reactive and Functional Polymers*, v. 69 (4), p. 246-251, 2009a.

NÉRI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; TEIXEIRA J. A. **Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis.** *Catalysis Communications*, v. 9 (14), p. 2334-2339, 2008.

NÉRI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; COSTA, R. S.; ROCHA, I. C. A. P.; FERREIRA E. M. F. C.; TORRES, D. P. M.; RODRIGUES, L. R. M., CARVALHO JUNIOR., L. B.; TEIXEIRA, J. A. **Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol.** *FoodChemistry*, v. 115 (1), p. 92-99, 2009b.

NOVALIN, S., NEUHAUS, W., KULBE, K.D. **A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk.** *J. Biotechnol.*, v. 119, p. 212–218, 2005.

OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; IBORRA, J. L.; MANJÓN, A. **Beta – Galactosidase Immobilization for Milk Lactose Hydrolysis: A simple experimental and modelling study of Batch and Continuous Reactors.** *Biochemical Education*, v. 28 (3), p. 164-168, 2000.

OHLERTH, S.; O'BRIEN, R. T. **Contrast ultrasound: General principles and veterinary clinical applications.** *Veterinary Journal*, v. 174, p. 501–512, 2007.

OLAD, A.; NABAVI, R. **Application of polyaniline for the reduction of toxic Cr (VI) in water.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 147 (3), p. 845-851, 2007.

OOSTEROM, M. W.; BELLE, H. J. A.; RANTWIJL, F.; SHELDON, R. A. **Immobilised b-Galactosidase and their use in galatocide synthesis.** *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 134, p. 267-274, 1998.

OSMAN, B.; KARA, A.; UZUN, L.; BESIRLI, N.; DENIZLI, A. **Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 37, p. 88-94, 2005.

OVSEJEVI, K.; GRAZÚ, V.; CUADRA, K.; BATISTA-VIERA, F. **Enzyme reduction on solid phase as a tool for the reversible immobilization of yeast b-galactosidase**

onto a thiol-reactive support. Enzyme and Microbial Technology, v. 35 (2/3), p. 203-209. 2004.

OZDURAL, A. R.; TANYOLAC, D.; BOYAC, I. H.; MUTLU, M.; WEBB, C. **Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized reactor.** Biochemical engineering journal, v. 14, p. 27–36, 2003.

PAPAVASILIOU, G., KOURKOUTAS, Y., RAPTI, A., SIPSAS, V., KOUTINAS, A.A., SOUPIONI, M. **Freeze-dried kefir co-culture using whey.** Int. Dairy J., v. 18, p. 247–254, 2008.

PESELA, B. C. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BENTACOR L.; FUENTES, M.; GUIAN J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Enzyme Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols.** Microbiological Technology, v.40, p.310, 2007a.

PERUGINO, G.; TRINCONE, A.; ROSSI, M.; MORACCI, M. **Oligosaccharide synthesis by glycosynthases.** Trends in Biotechnology, v. 22, p. 31–37, 2004.

PIMENTEL, M. C. B.; LEO, A. B. F.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA-FILHO, J. L.; SIVEWRIGHT, M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on Magnetized Dacron: Kinetic study.** Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, v. 35, p. 221–235, 2007.

PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; KANELAKI, M.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. **Cell immobilized in a starch–gluten–milk matrix uable for food production.** Food Chemistry, v. 89, p. 175–179, 2005.

QUINN, Z. K. Z.; CHEN, X. Q. **Immobilization of β -Galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde.** Journal of Food Engineering, v. 48, p. 69-74, 2000.

QUNWEI T.; XAOMING S.; QINGHUA L.; JIHUAI W.; JIANMING L.; MIAOLIANG H. **Synthesis of oriented polyaniline flake arrays.** Materials Letters, v. 63 (5), p. 540-542, 2008.

ROBERTSON, D. E.; STEER, B. A. **Recent progress in biocatalyst discovery and optimization.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 8, p. 141-149, 2004.

ROBLE, N. D.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. **A novel circulation loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrical*) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 60 (3), p. 671-678, 2000.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized Enzymes and Cells.** Bristol: Adam Hilger, p. 248, 1987.

ROY, I.; GUPTA, M. N. **Lactose hydrolysis by LactozymTM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes.** Process Biochemistry, v. 39, p. 325-332, 2003.

SALEH, Z.; CHEN, X. D. **Electrochemical immobilization of enzyme on graphite eletrode: a new approach.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 48 (1), p. 69-74, 2001.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA OCHOA, F. **Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromices fragilis*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 22 (7), p. 558-567, 1998.

SINGH, S.; SOLANKI, P. R.; PANDEY, M. K.; MALHOTRA, B. D. **Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor.** Analytica Chimica Acta, v. 568 (1-2), p. 126-132, 2006.

SHAN, D.; ZHU, M.; XUE, H.; COSNIER, S. **Development of amperometric biosensor for glucose based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: Calcium carbonate nanoparticles.** Biosensors and Bioelectronics, v. 22, p. 1612-1617, 2007.

SHANKAR, S. K.; Mulimani, V. H. **α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation.** Bioresource Technology, v. 98 (4), p. 958-961, 2007.

SHUKLA, T. P. **β - Galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem: Critical Reviews.** Food Technology, v. 1, p. 325-356, 1975.

STANNARD, S. R.; HAWKE, E. J.; SCHNELL, N. **The effect of galactose supplementation on endurance cycling performance.** European Journal of Clinical Nutrition. Advance online publication, October 10. doi:10.1038/sj.ejcn.1602924, 2007.

SZYMANSKA, K.; BRYJAK, J., MROWIEC-BIALON, J.; JARZEBSKI, A. B. **Aplication and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalystis.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 99, p. 167-175, 2007.

TANAKA, Y.; KAGAMIISHI, A.; KIUCHI, A.; HORIUCHI, T. **Purification and properties of beta-Galactosidase from Aspergillus oryzae.** Journal Biochemistry (Tokyo), v. 77 (1), p. 241-247, 1975.

TISCHER, W.; KASCHE, V. **Immobilized enzymes: crystal or carriers?** Trends in Biotechnology, v. 17, p. 326-335, 1999.

TSAKIRIS, A.; BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Immobilization of yeast on dried raisin berries for use in dry white wine-making.** Food Chemistry, v. 87, p. 11–15, 2004.

WANG, Y.; CARUSO, F. **Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation.** Chemistry Materials, v. 17 (5), p. 953-961, 2005.

XU, K.; ZHU, L.; ZHANG, A.; JIANG, G.; TANG, H. **A peculiar cyclic voltammetric behavior of polyaniline in acetonitrile and its application in ammonia vapor sensor.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 608 (2), p. 141-147, 2007.

XUEMEI, L.; QUINN, Z. K. Z.; XIAO, DONG CHEN. **Pilot-scale lactose hydrolysis using β -Galactosidase immobilized on cotton fabric.** Chemical Engineering and Processing, v. 46 (5), p. 497-500, 2006.

YU, T.; ZHANG, Y.; YOU, C.; ZHUANG, J.; WANG, B.; LIU, B.; KANG, Y.; TANG, Y. **Controlled Nanozeolite-Assembled Electrode: Remarkable Enzyme-Immobilization**

Ability and High Sensitivity as Biosensor. Chemistry - A European Journal, v. 12, p. 1137–1143, 2006.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D.; XUEMELI, L. **Kinetics of lactose hydrolysis by β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric.** Biotechnology Bioengineering, v. 81, p. 127-133, 2003.

5. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA: *Journal of Chromatography B*



Immobilization of β -Galactosidase onto Sephadex-polyaniline.

Ana L. T. S. Ferreira¹, David F. M. Neri¹, Givanildo O¹, José A. C. Teixeira², Luiz B. Carvalho Jr¹, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Prof Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária – CEP: 50.670-420 – Recife, PE- Brazil.

² IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

*Corresponding author: mgcc@ufpe.br (Carneiro-da-Cunha, MG)

Telephone: +55 81 21268547; fax: +55 81 21268576.

E-mail addresses: ana.analinda@gmail.com (Ferreira, ALTS), lbcj@hotmail.com.br (Carvalho Jr, LB), davidfmneri@yahoo.com.br (Neri, DFM), jateixeira@deb.uminho.pt (Teixeira, JAC)

ABSTRACT

β -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23) from *Aspergillus oryzae* was covalently immobilized onto Sephadex G-50 coated with polyaniline (Sephadex-PANI), via glutaraldehyde, and arranged in a vertical column. The scanning electron microscopy and elemental analyses showed the rugose surface of the Sephadex beads altered and the presence of nitrogen, respectively, after PANI coating. The activity of the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column (2cm x 10 cm) was assayed by circulating a solution of ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG; 3 mL) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and its optima pH and temperature were found to be 4.5 and 50 °C, respectively, similar to those estimated for the free enzyme. The amount of immobilized protein and retention of specific enzymatic activity compared with the free enzyme were 100% and 90%, respectively. The enzymatic column was reused 10-times retaining about 100% of its initial activity. Milk lactose was completely converted to glucose and galactose by circulating it through the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column. Therefore, column of Sephadex-PANI- β -Galactosidase can be proposed for the continuous removal of lactose from milk. Furthermore, other enzymes can be covalently immobilized on Sephadex-PANI column and applied in biotechnology.

Keywords: Covalent immobilization; Sephadex; PANI; β -Galactosidase; *Aspergillus oryzae*; and lactose hydrolysis.

1. Introduction

β -Galactosidases (E.C. 3.2.1.23) from different origins are currently used in the production of lactose free dairy products. These enzymes hydrolyze the sugar milk (lactose) into glucose and galactose, which increases the solubility and the sweetness resulting in improving the organoleptic characteristics of the dairy products from milk or whey. For the production of ice cream and other refrigerated dairy products, positive effects on the crystallization would be achieved after lactose hydrolysis (Novalin et. al., 2005) and allowing them to be consumed by lactose intolerant individuals (Jurado et. al., 2002). Furthermore, galacto-oligosaccharides, non digestible oligosaccharides that support the growth of certain bacteria in the colon (prebiotics) can be synthesized under their catalytic action (Neri et. al. 2009a; 2009b). The immobilization of β -Galactosidase poses as a determinant technological asset in the industry of these products (Hatzinikolaou et. al., 2005; Haider & Husain, 2007a). The choice of the lactose hydrolysis process, batch or continuous mode, essentially depends on enzymatic characteristics, and economic viability of the process, as storage and reusability (Haider & Husain, 2007b).

SephadexTM, a cross-linked and intertwined dextran polymer, has been used in several applications in the separation of mixtures based on the size of its components - molecular filtration (Vald'es et. al. 2007; Fuchise et. al. 2009); on the electric charge - ion exchange (Lu et. al., 2009); on the two-phase liquid extraction (Macbride et. al. 1994); on the specificity of incorporated ligands - affinity chromatography. Also, it has been used as a support for the immobilization of enzymes, antigens, antibodies, lectins, receptors, etc. SephadexTM is widely used in industries in the large scale processes due to its low cost, availability, and resistance to microorganism attacks in unwelcome pH and temperature conditions (Dwevedi & Kayastha, 2009).

Another interesting organic polymer is the polyaniline (PANI obtained through either by chemical or electrochemical polymerization of aniline. PANI presents low cost compared to other organic polymers frequently used. Furthermore, it shows a great thermal and storage stability and various electrical conductivity values, depending on the oxidation level and acids or alkali doping. Finally, it presents electrochromic properties, namely, changing its color accordingly to its oxidation state (Debarnot & Poncin-Epaillard, 2003).

In our laboratory PANI has been successfully used in the immobilization of antigens and enzymes (Nadruz et. al. 1996; Coelho et. al. 2001; Oliveira et. al. 2008; Neri et. al. 2009b). This work aimed to coat Sephadex G50 beads with PANI in order to investigate their ability to be used as a support for covalent enzyme immobilization, using β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* as a model.

2. Experimental

2.1. Chemicals.

β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*, SephadexTM G50, ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) were obtained from Sigma-Aldrich (Germany), whereas D-glucose was from Vetec (Brazil). Liquid enzymatic glucose kit and biconinonic acid (BCA) were obtained from Doles Laboratório (Brazil) and Pierce (USA), respectively. All other reagents were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Sephadex hydration and polyaniline coating

SephadexTM G50 (4g) was hydrated in 160mL of distilled water at 4 °C for 12 h under mild stirring (90 rpm). The hydrated Sephadex (45 mL) was washed with 1M HCl and then added to 0.5 M aniline prepared 1 M HCl (90 mL) and the mixture kept at 4 °C for about 12 h under at

90 rpm. Afterwards, aniline polymerization was carried out in an ice bath by dropping previously cooled 0.38 M ammonium persulfate (about one drop at five minutes interval during 30 min) until the green color to be achieved. Finally the composite Sephadex-PANI was exhaustively washed with distilled water until the washing solution presented no color.

2.3. β -Galactosidase immobilization

Sephadex-PANI beads were treated with 2.5% (w/v) glutaraldehyde for 2 h at 25 °C under 90 rpm. Activated Sephadex-PANI beads were washed with distilled water (10mL) and 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5; 20mL), from now on called the buffer, and then incubated overnight at 4 °C with β -Galactosidase (30 mL of 0.7mg/mL-1 of buffer). Afterwards, the supernatant was recovered and the Sephadex-PANI- β -Galactosidase (enzymatic derivative) was washed with the buffer. These washings were collected with the supernatant for protein determination (Smith et al, 1985) using bovine serum albumin as standard. The amount of immobilized protein was calculated by the difference between the amount offered protein for immobilization and that found in the supernatant and the washing buffers. All the procedures previously described were carried out in batch mode.

The enzymatic derivative (5 mL) was packed into a column (2.0 cm x 10.0 cm) and equilibrated with the buffer. To ensure that the enzyme was covalently bonded to the support, and that nothing was absorbed, a solution of 1M NaCl was run through the column. Finally, the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column was washed several times with the buffer and kept at 4°C for use.

2.4. β -Galactosidase activities on ONPG and milk lactose.

A solution of 32 mM ONPG (3 mL) was circulated through the Sephadex G50-PANI- β -galactosidase column (Figure 1A) at flow rates varying from 0.125 mL min⁻¹ to 1.25 mL min⁻¹. Aliquots of 50 μ L were collected from the effluent of the column at time intervals and added to the wells of an ELISA plate containing 200 μ L of M Na₂CO₃. The product released by the column, o-nitrophenol (ONP), was spectrophotometrically measured at 405 nm in ELISA reader (Bio-Rad).

Cold milk (200mL) was centrifuged at 8000 $\times g$ for 20 min. The fat layer was removed and the skimmed milk (100mL) was diluted (1:10) and filtered using Millipore discs. Then the diluted skimmed milk (100mL) was circulated through the Sephadex G50-PANI- β -galactosidase column at 28 °C in a closed circuit system continuously (Figure 1B). The aliquots of 1mL were taken out at time intervals for 12 h to monitor the hydrolysis of lactose by using the glucose kit. A sample from the diluted skimmed milk was used as control. The free enzyme activity was measured according to Park et. al. (1979). One β -galactosidase unit (U) was defined as the amount of enzyme which liberated either one μ mol of ONP or glucose per min at 25 °C. All assays were carried out in triplicates.

2.5. Effect of pH and temperature on immobilized β -Galactosidase

The effects of pH and temperature on the activity of the enzymatic column were investigated using 0.1M citrate-phosphate buffer (3.0–6.0) and 25–70°C, respectively, and assaying the activity as previously described in 2.4.

2.6. Reuse of immobilized enzyme derivative

Reuse of enzymatic derivative was evaluated circulating ONPG through the same enzymatic column ten times and assaying its activity as described in 2.4. Between each assay interval the enzymatic column was washed with the buffer until no absorbance at 405 nm was detected.

2.7. Elemental analysis and scanning electron microscopy (SEM)

Elemental analysis of dried samples (Sephadex, PANI, and Sephadex-PANI) was determined by a Carlo Erba Elemental Analyzer EA1110. The surface morphology of the samples was examined using a scanning electron microscope-SEM (JEOL- JSM-T 200) with an accelerating voltage from 10 to 15 kV. Before analyzes, all samples were placed on a glass and dried at room temperature (27 °C) and then mounted on aluminum stubs using carbon adhesive tape and sputter-coated (ION SPUTTER JFC- 1100 – JEOL) with gold (thickness of about 10 nm).

3. Results and Discussion

Immobilization of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* has been performed by covalently binding it onto thiopropyl-agarose (Ovsejevi et. al. 2004) and cellulose-gelatin (Numanoglu & Sungur, 2004) supports. Immobilized enzyme derivatives have also been reported for the lactase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on cellulose beads (Roy & Gupta, 2003), *Thermus sp.* using different immobilization protocols (Ladero et. al. 2006; Pessela et. al. 2007), *Escherichia coli* (Bayramoglu et. al. 2007) and *Aspergillus oryzae* (Tanriseven & Dogan, 2002; Gaur et. al. 2006) immobilized on a preparation of the enzyme entrapped in calcium alginate (Haider & Hussain, 2007); concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads and bioaffinity supports (Haider & Hussain, 2009a, 2009b).

3.1. Preparation and Support Characterization

The Sephadex G50 employed in this work presents bead sizes and fractionation range for globular proteins of 50-150 μm and 1,500 Da-30,000 Da, respectively. On the other hand, the immobilized protein (β -galactosidase from *A. oryzae*) displays a molecular weight of about 120,000 Da. According to this information one can assume that the polyaniline synthesis occurs either externally or inside the Sephadex whereas the enzyme is covalently fixed on the external surface of the modified Sephadex. Probably, the emeraldine form of PANI was obtained presumed by the green coloration of the support.

To confirm the Sephadex coating, elemental analysis of all components was performed and their composition is presented in the Table 1. As expected Sephadex alone did not present nitrogen and after coating this element (3.4 %) was detected. Moreover, Sephadex-PANI acquired carbon from the PANI (from 38.9% to 45.1%).

Figure 2 shows the scanning electron microscopy (SEM) images of the Sephadex and Sephadex-PANI. According to these images one can assume that the PANI coating altered the surface of the Sephadex beads. The Sephadex beads (Figure 2A) displayed a rugose surface whereas there are smooth areas on the Sephadex-PANI beads (Figure 2B). Probably, this irregular surface reflects the porous of the Sephadex that are blocked by the PANI covering and consequently does not show up. This hypothesis is supported by the evidence that column of Sephadex-PANI did not allow good flow rate as that using the untreated Sephadex. Oliveira et. al. (2008) covered ordered porous alumina film consisting of hexagonal closed packed array of pores with PANI and demonstrated that the membrane porosity remained whole and no flow limitation was observed.

3.2. β -Galactosidase immobilization on Sephadex–PANI

The relationship between the amounts of offered β -galactosidase and the covalently fixed protein, enzymatic activity and specific activity is shown in Figure 3. As expected, a rectangular hyperbola was achieved for both the fixed and catalytic active protein as increasing the offered protein because the accumulation of protein on the surface of the support obeys the Langmuir equation. Therefore, there will be a limit for the immobilization capacity of the Sephadex G50-PANI beyond that no more protein would be fixed. However, the specific activity showed a negative exponential decay as the offered protein increased. The possible effect of excess of fixed enzymes (overload) impairing the substrate access to the active centre does not follow this mathematical model and a rectangular hyperbole is also observed except that decay occurs for high values of offered protein. Probably, this result is a consequence of the enzyme molecules attached onto the surface of the beads of Sephadex G50 coated with PANI and packed as a column. Diffusional limitations occur during the circulation of the substrate solution through the column so that part of the immobilized enzyme molecules does not act on the substrate. As much as enzyme molecules are fixed more enzymes are deprived from the catalytic event.

Figure 4 displays the relationship between the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column activity and the substrate (ONPG) circulation flow rate. Enlarging the flow of substrate feed to the column is observed an increase of the enzyme derivative's activity. This increase occurs until 0.80 mL min^{-1} approximately; above this value the increase in flow has no effect on catalytic activity.

The Protein immobilization and Enzymatic activity retention of enzymatic derivative were, 100% of the offered protein and 90% of the free enzyme, respectively.

3.3. Effect of pH and temperature on immobilized β -Galactosidase

The values of optima pH and temperature for the Sephadex-PANI- β -Galactosidase activities were found to be 4.5 and 50° C, respectively (Figure 5) showing that optimum conditions were not affected by immobilization. These values are in accordance to those reported for the free enzyme (Tanaka et. al. 1975). Enzymatic derivative shows a pH-activity profile similar to the one of the free enzyme. Tanriseven & Dogan (2002) reported for *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on alginate-gelatin fibers optimal pH values of 4.5 but Haider & Hussain cited optimal pH values of 4.6-5.5 for the immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support.

The enzymatic activity is dependent on the temperature in the same way as that of the chemical catalysts, except that there is an optimum temperature of the enzymatic reaction above which the activity decreases due to the desnaturation of the enzyme protein (Zhou & Chen, 2000). Apparently the derivative is more stable to temperatures below the optimum temperature than the free enzyme, showing lower loss of activity. Chen et. al. (2000) immobilized covalently invertase on particles and films of polyaniline and on acrylic acid copolymer. The immobilized enzyme retained 20 to 40% of activity compared to free enzyme and presented an higher activity at low temperatures. In addition to its, increased stability in storage buffer. In addition to its, increased stability in storage buffer. The optimum temperature value for the immobilized derivative is equal to those reported in the literature for other immobilized β -galactosidase obtained from *Aspergillus oryzae* (Tanriseven & Dogan, 2002), *Kluyveromyces lactis* (Zhou & Chen, 2000, Néri et. al. 2008) and *Kluyveromyces fragilis* (Roy & Gupta, 2003) and lower than the optimum temperature (55 °C) found to the enzyme from *Aspergillus niger* (Hatzinikolaou et. al. 2005), *Bacillus sp.*(Cheng et. al. 2006) and 60°C to α -Galactosidase produced by *Aspergillus oryzae* (Shankar & Mulimani, 2007).

3.4. Reuse of the enzymatic derivative

The reusability of the Sephadex G50-PANI- β -galactosidase was evaluated by assaying the activity of the same column on ONPG ten times intercalated by buffer washings and the results showed a value of 104.3 ± 3.7 % (mean $\pm$ SD) of the first activity. Some authors observed a significant loss of activity after reusing of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. Haider and Hussain (2008) found that there was a decrease of 35% of the activity after 6 reuses of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized in alginate-starch beads; and a loss of 64% after 10 reuses of the enzyme when immobilized in immunoaffinity support (HAIDER & HUSSAIN, 2009). Neri et. al. (2008) reported a loss of about 13% of the initial activity after 10 reuses on magnetic polysiloxane–polyaniline (Neri et. al., 2009b).

Dwevedi & Kayastha (2009) had an insignificant loss of activity, after 10 reuses, when β -galactosidase was immobilized in chitosan-PsBGAL, but they reported a 70% loss when using Sephadex-PsBGAL, after 10 reuses.

3.5. Milk lactose hydrolysis

Further to the ability of the Sephadex G50-PANI- β -galactosidase column to act on the synthetic substrate ONPG the milk lactose was hydrolyzed as can be depicted from the result shown in Figure 6. Considering that glucose is stoichiometrically equal to galactose as the released products from the lactose and that this disaccharide was present in the milk one can conclude that all milk lactose was hydrolyzed by the enzymatic column. Shorter time and better column performance, including continuous milk lactose hydrolysis can be easily achieved by using larger columns and flow rate parameters.

According to the Food and Drug Administration (FDA), USA hydrolyzed lactose products must contain at least 70% less lactose than the non-hydrolyzed product for consumption by lactose

intolerants. Lactose hydrolyzed, ultra-pasteurized or pasteurized milk containing at least 70% less lactose have been available in the USA for several years (Dwevedi & Kayastha, 2009).

4. Conclusion

The water insoluble enzymatic derivative obtained by coating Sephadex G-50 with polyaniline and immobilizing β -Galactosidase (Sephadex-PANI- β -Galactosidase), via glutaraldehyde, proved to be a promising alternative for biotechnological applications due to the following arguments: the simplicity of the matrix synthesis and immobilization protocol; the use as a column continuously. The preparation acting on o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside displayed the same optima pH (4.5) and temperature (50° C) of the native enzyme. Furthermore, it retained all of its initial activity after being reused 10 times at 28° C. Milk was treated using the synthesized support and the hydrolysis was confirmed.

5. Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support CAPES/PROCAD 1415/2007 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil), PROPESQ/UFPE (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil) and CNPq.

6. References

Bayramoglu, G., Tunali, Y. & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of β -Galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8, 1094-1101.

Coelho, R. A. L., Santos, G. M. P., Azevedo, P. H. S., Jaques, G. A., Azevedo, W. M. & Carvalho Jr., L. B. (2001). Polyaniline-Dacron composite as solid phase in ELISA for *Yersinia pestis* antibody detection. *Journal Biomedical Material Resources*, 56, vol. 2, 257-260.

Dwevedi, A. & Kayastha, A.M. (2009)* Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, 100, 2667–2675.

Emmons, T. L.; Mathis, K. J.; Shuck, M. E.; Reitz, B. A.; Curran, D. F.; Walker, M. C.; Leone, J. W.; Day, J. E.; Bienkowski, M. J.; Fischer, H. D.; Tomasselli, A. G. (2009). Purification and characterization of recombinant human soluble guanylate cyclase produced from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification*, 65, 133–139.

Fuchise, T.; Kishimura, H.; Sekizaki, H.; Nonami, Y.; Kanno, G.; Klomklao, S.; Benjakul, S.; Chun, B. B. S. (2009) Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chemistry*, 116 (3), 611-616

Gaur, R., Pant, H., Jain, R. & Khare, S. K. (2006). Galactooligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase. *Food Chemistry*, 97, 426-430.

Genari, A. N., Passos, F. V. & Passos, F. M. L. (2003). Configuration of a Bioreactor for Milk Lactose Hydrolysis, *Journal of Dairy Science*, 86, 2783-2789.

Haider, T. & Husain, Q. (2007a). Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase: its stability and application in the hydrolysis of lactose, *International journal of Biological Micromolecules*, 41, 72-80.

Haider, T. & Husain, Q. (2007b). Preparation of lactose free milk by using salt fractionated almond (*Amygdalus communis*) β -Galactosidase. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 87, 1278-1283.

Haider, T.; Husain, Q. (2009a). Immobilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 307-314.

Haider, T.; Husain, Q. (2009b). Immobilization of β -Galactosidase by bioaffinity on concanavalin a layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hidrolysis of lactose. *International Dairy Journal*, 19, 172-177.

Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, E., Mamma, D., Karagouni, A. D., Christakopoulos, P. & Kekos D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey per meate by a thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Enineering Journal*, 24, 161–172.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G. & Vicaria, J. M. (2002). A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 300-309.

Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B. C. C., Vian, A., Santos, A. & Garcia-Ochoa, F. (2006). Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -Galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 31, 14-24.

Lu, Q.; Burns, M. C.; Mcdevitt, P. J.; Graham, T. L.; Sukman, A. J.; Fornwald, J. A.; Tang, X.; Gallagher, K. T.; Hunsberger, G. E.; Foley, J. J.; Schmidt D. B.; Kerrigan, J. J.; Lewis, T. S.;

Kyung R. S.; Johanson, A. O. (2009). Optimized procedures for producing biologically active chemokines. *Protein Expression and Purification*, 65, 251–260.

Nadruz, Jr. W, Marques, E. T. A., Azevedo, W. M., Lima Filho, J. L. & Carvalho Jr., L. B. (1996). Immobilized xanthine oxidase on polyaniline silicone composite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 347-350.

Néri, D. F. M.; Balcão, V. M.; Carneiro-Da-Cunha, M. G.; Carvalho Junior, L. B.; Teixeira J. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 9 (14), 2334-2339, 2008..

Nicolas-Debarnot, D. & Poncin-Epaillard, F. (2003). Polyaniline as a new sensitive layer for gas sensors. *Analytica Chimica Acta*, 475, 1–15.

Numanoglu, Y. & Sungur, S. (2004). β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. *Process Biochemistry*, 39, 705-711.

Oliveira, G. B., Lima-Filho, J. L., Chaves, M. E. C., Azevedo, W. M. & Carvalho Jr., L. B. (2008). Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive & Functional Polymers*, 68, 27–32.

Ovsejevi, K., Grazi, V., Cuadra, K. & Batista-Vieira, F. (2004). Enzyme reduction on solid phase as a tool for the reversible immobilization of yeast β -Galactosidase onto a thiol-reactive support. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 203-209.

- Park, Y. K., DeSanti, M. S. S. & Pastore, G. M. (1979). Production and characterization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal Food Science*, 44, 100-103.
- Pessela, B. C. C., Mateo, C. M. Filho, Carrascosa, A., Fernández-Lafuente R. & Guisan J. M. (2007). Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -Galactosidases. *Enzyme Microbial Technology*, 40, 242-248.
- Roy I. & Gupta M. N. (2003). Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39, 325-332.
- Shankar, S. K. & Mulimani, V. H. (2007). α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 958-961.
- Smith, P. K., Krohn, R. J., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gardner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, C. K., Gocke, N. M., Olson, R. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A. & Horiuchi, T. (1975). Purification and properties of beta-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry*, 77, 241-247.
- Tanriseven A. & Dogan S. (2002). A novel method for the immobilization of β -Galactosidase. *Process Biochemistry*, 38, 27-30.
- David F.M. Neri, Victor M. Balcão, Maria G. Carneiro-da-Cunha, Luiz B. Carvalho Jr., José A. Teixeira. (2008). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications* 9, 2334–2339.

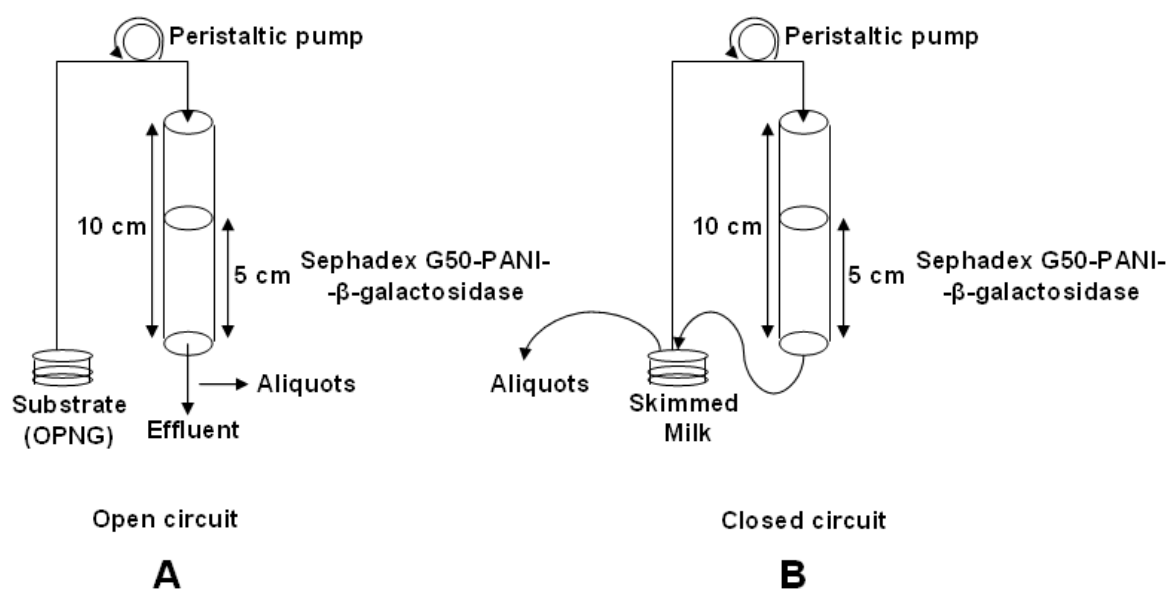
Givanildo Bezerra Oliveira, José Luiz Lima Filho, Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, Walter Mendes Azevedo, Luiz Bezerra Carvalho Jr (2008). Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive & Functional Polymers* 68, 27–32.

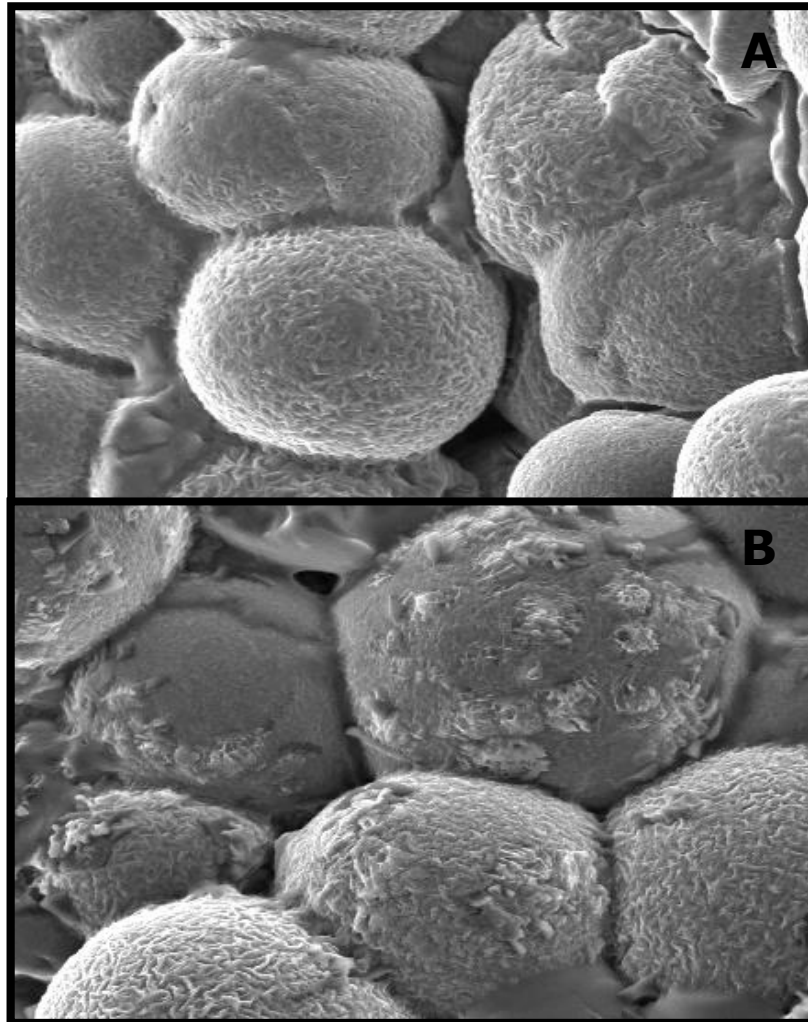
David F.M. Neri, Victor M. Balcão, Rafael S. Costa, Isabel C.A.P. Rocha, Eugénio M.F.C. Ferreira, Duarte P.M. Torres, Lígia R.M. Rodrigues, Luiz B. Carvalho Jr., José A. Teixeira (2009a). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* 115, 92–99.

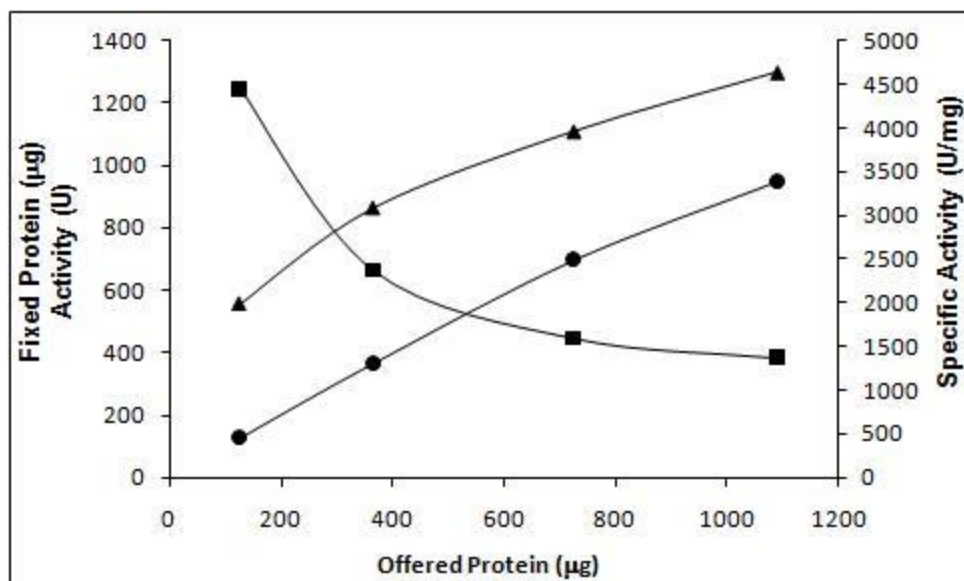
David F.M. Neri, Victor M. Balcão, Fernando O.Q. Dourado, José M.B. Oliveira, Luiz B. Carvalho Jr., José A. Teixeira (2009b). Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. *Reactive & Functional Polymers* 69, 246–251.

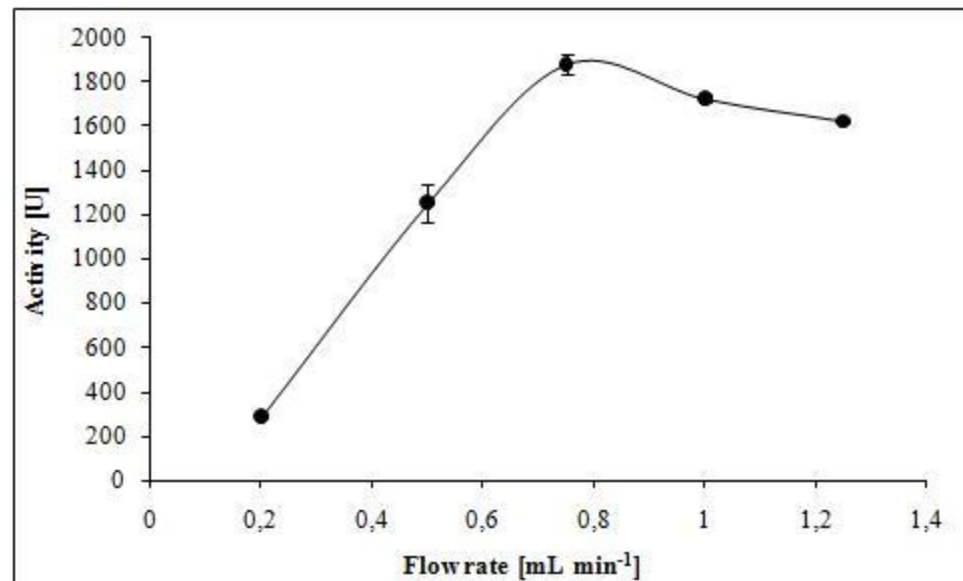
Stejskal J., Gilbert R. G. Polyaniline. Preparation of a conductive polymer (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.* 74 (5): 857-867, 2002.

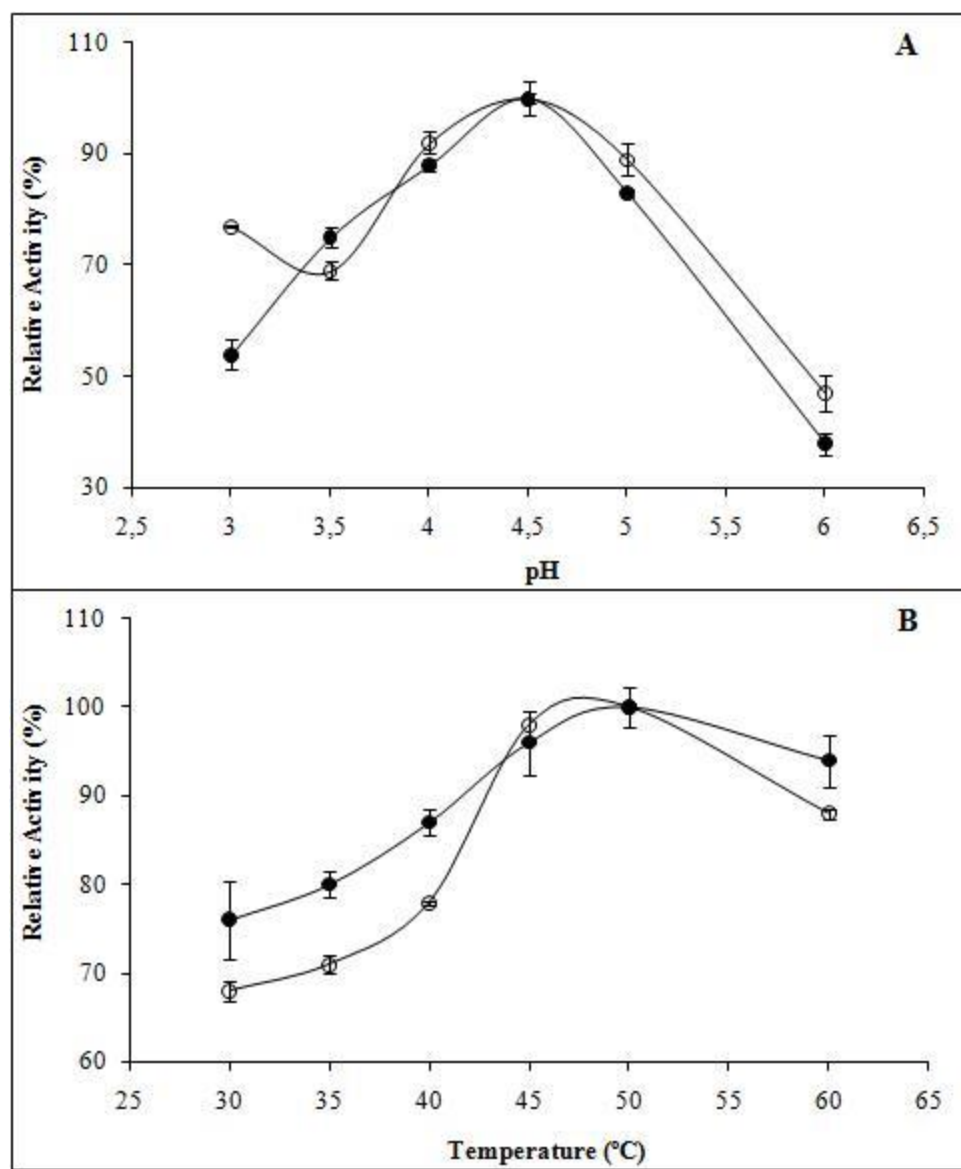
Vald'es, Rodolfo; Yenisley Medina; William Ferro; Biunayki Reyes; D'éborah Geadá; Jos'e Montero; Tatiana Alvarez a, Alberto Leyva c,Leonardo G'omez, Sigifredo Padilla a, Leonardo Pac'ín; Alejandro Figueroa a, Andrés Tamayoa, Lorely Mil'a d, Yurisleydi Aldamad, Galina Moya d,Jorge Reonde d, Mar'ia del Carmen Abrahantes. (2007). Comparison of different ligand densities in immunoaffinity chromatography of the plantibody HB-01 coupled to Sepharose CL-4B to purify the rHBsAg. *Journal of Chromatography B*, 852, 1–7.











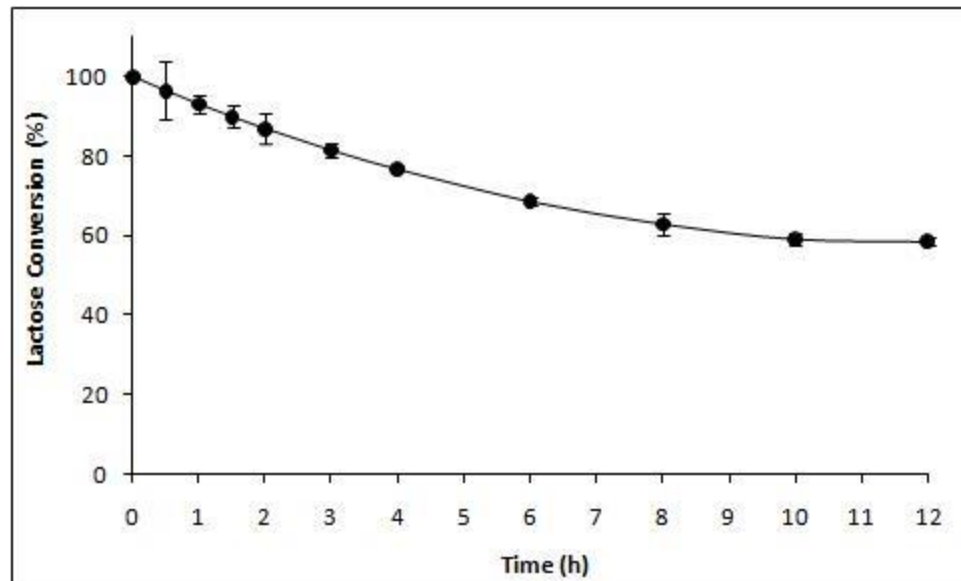


Table. Elemental analysis of PANI, Sephadex and Sephadex-PANI

Components	Element (%)		
	Nitrogen	Carbon	Hydrogen
Sephadex	0,0	38.9	6.8
PANI	10.8	23.2	6.7
Sephadex-PANI	3.4	45.1	6.5

Figure captions

Figure 1. Diagram of the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column and its activity determination.

Figure 2. Polyaniline synthesis scheme.

Figure 3. Proposed mechanism for β -galactosidase immobilization, via glutaraldehyde, on the surface of polyaniline beads.

Figure 4. SEM images of surface morphology of Sephadex (A) and Sephadex-PANI (B)

Figure 5. Relationship between the amount of protein offered, fixed protein, Activity and specific activity of the enzymatic derivative-Sephadex-PANI- β -Galactosidase.

Figure 6. Relationship between the Sephadex-PANI- β -Galactosidase column activity and the substrate (ONPG) circulation flow rate.

Figure 7. The pH-activity profile (A) for the immobilized () and soluble (). *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase; and temperature (B) on the activity of the Sephadex-PANI- β -Galactosidase. The highest activities at pH 4.5 and at 50° C were considered 100% and the other values related to this value.

Figure 8. Lactoses hydrolyses. Galactose releasing.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que:

- O derivado enzimático insolúvel em água, obtido pelo revestimento do Sephadex G50 com polianilina (PANI), mediado pelo glutaraldeído é uma alternativa promissora para aplicações biotecnológicas.
- Pode ser utilizado continuamente em coluna dada a sua simplicidade de síntese e da facilidade de imobilização.
- Os valores de pH (4,5) e temperatura (50°C) ótimos calculados revelaram-se semelhantes aos da enzima solúvel.
- Foi possível uma imobilização de 100% com 90% de retenção da atividade enzimática.
- Foi possível a retenção da sua atividade inicial ao fim de 10 utilizações.
- As colunas contendo o derivado enzimático foram capazes de hidrolisar o leite nos seus monossacarídeos constituintes.

7. GUIA DE AUTORES

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences

INTRODUCTION

Types of Paper

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing - Conflict of interest - Submission declaration - Copyright – Retained author rights - Role of the funding source - Funding body agreements and policies - Language and language services - Submission - Referees

PREPARATION

Use of wordprocessing software - Article structure - Subdivision - numbered sections - Introduction - Material and methods - Theory/calculation - Results - Discussion - Conclusions - Appendices - Essential title page information - Abstract - Keywords - Abbreviations - Acknowledgements - Nomenclature - Math formulae - Footnotes - Electronic artwork - Color artwork - Figure captions - Tables - References - Citation in text- Web references - References in a special issue - Reference Style - Journal abbreviations source - Supplementary material - Submission checklist

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier - Proofs – Offprints.

AUTHOR INQUIRIES

INTRODUCTION

The Journal of Chromatography B publishes papers on developments in separation science Journal of Chromatography B – Elsevier 2 de 10 4/6/2009 07:49 relevant to biology and biomedical research including both fundamental advances and applications. Analytical techniques which may be considered include the various facets of chromatography, electrophoresis and related methods, affinity and immunoaffinity-based

methodologies, hyphenated and other multi-dimensional techniques, and microanalytical approaches. The journal also considers articles reporting developments in sample preparation, detection techniques including mass spectrometry, and data handling and analysis. Developments related to preparative separations for the isolation and purification of components of biological systems may be published, including chromatographic and electrophoretic methods, affinity separations, field flow fractionation and other preparative approaches. Applications to the analysis of biological systems and samples will be considered when the analytical science contains a significant element of novelty, e.g. a new approach to the separation of a compound, novel combination of analytical techniques, or significantly improved analytical performance. Areas to be considered include:

- The qualitative and quantitative analysis of biopolymers including proteins, peptides and their post-translational modifications as well as nucleic acids and glycans • the comparative analysis of biological systems using proteomics, genomics, metabonomics and other "omics" approaches • clinical analysis, pharmacokinetics, metabolism, therapeutic drug monitoring, toxicological analysis, doping analysis, veterinary applications, analysis of environmental contaminants in biological systems
- The screening and profiling of body fluids, tissues, cells, biological matrices and systems, analysis of endogenous compounds, biomarkers.
- Identification of new bioactive compounds. Applications which utilize published or commercial analytical or preparative protocols with little or no modification or where the results of the application rather than the analytical methodology comprise the major element of novelty of the manuscript should be directed to more specialized journals. Modifications to a previously published method may be considered for a short communication in cases where the improvement in performance is significant. Reports of analytical methods for compounds in early pharmaceutical development often lack general interest and will not be published unless the authors can demonstrate the broader significance of the methodology involved. Quality control analyses of bulk drugs, natural products or pharmaceutical formulations are not within scope.

Types of Paper

The following types of papers are published in the Journal of Chromatography B: Regular research papers (full-length papers), Review articles, Short Communications, Discussions, and Letters to the Editor. Review articles are invited or proposed in writing to the Editors, who welcome suggestions for subjects. An outline of the proposed Review should first be forwarded to the Editors for preliminary discussion prior to preparation. Short Communications are usually descriptions of short investigations, or they can report technical improvements of previously published procedures: they reflect the same quality of research as full-length papers, but should preferably not exceed five printed pages (typically no more than 2850 words (including title, authors and references), with no more than five figures and tables combined).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same Journal of Chromatography B - Elsevier form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more

about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. Every paper must be accompanied by a letter from the senior author, stating that he/she is submitting the paper for publication in the Journal of Chromatography B.

Please submit your article via <http://www.elsevier.com/locate/jchromb>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Journal of Chromatography B - Elsevier author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for

example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature

Widely accepted symbols, abbreviations and units (SI) should be used. If there is any doubt about a particular symbol or abbreviation, the full expression followed by the abbreviation should be given the first time it appears in the text. Abbreviations used in tables and figures should be explained in the captions. In general, the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) should be followed and attention should be given to the recommendations of the Analytical Chemistry Division in the journal *Pure and Applied Chemistry: Nomenclature for Chromatography*, *Pure Appl. Chem.*, 65 (1993) 819-872. Decimal points should be indicated by full stops. All decimal numbers smaller than unity should include a leading zero (e.g. 0.11).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web

references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..." List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, J. Sci. Commun. 163 (2000) 51.
Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, Macmillan, New York, 3rd ed., 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.),

Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, New York, 1994, p. 281.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents.

The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: [http://www.adobe.com/products/acrobat /acrrsystemreqs](http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs). If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.