

Análise de técnicas cromatográficas para obtenção da enzima β -galactosidase recombinante

Matheus Loch Velvites Ferreira, Marianna Coelho Mendes, Bruna Coelho de Andrade, Victória Furtado Migliavacca, Gustavo Roth, Giandra Volpato (orientadora), Gaby Renard (coorientadora)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Porto Alegre

matheubfmv95@gmail.com, giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br

A β -galactosidase, também conhecida como lactase, é uma enzima de grande importância para a indústria farmacêutica e de alimentos, para obtenção de leite e derivados com baixo teor de lactose, devido à crescente demanda de pessoas com intolerância a este açúcar. Esta enzima é responsável pela hidrólise do dissacarídeo lactose, resultando em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. As β -galactosidasas utilizadas na indústria são produzidas principalmente por microrganismos, entre eles se destacam as de *Kluyveromyces*. Através da técnica do DNA recombinante, a expressão em *Escherichia coli* da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* surge como uma alternativa inovadora de otimização do processo produtivo. Esta técnica, assim como a maioria dos processos biotecnológicos, envolve a necessidade da purificação do bioproduto de interesse. O objetivo do presente trabalho foi analisar diferentes técnicas cromatográficas para obtenção da enzima recombinante. Cepas de *E. coli* recombinante BL21(DE3) transformadas com o gene que codifica a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp., foram cultivadas em batelada alimentada, em biorreator de 2 L em condições previamente determinadas. As células cultivadas foram ressuspensas em tampão TRIS HCl 50mM pH 7,5 (Tp-THCl), rompidas por pressão (Prensa de *French*) e a fração solúvel (extrato enzimático) foi recolhida. Esta fração passou por uma etapa de clarificação, através de centrifugação (13000 rpm, 10 min, 4°C), passando por uma etapa de precipitação do DNA utilizando sulfato de estreptomicina 0,1%. Em seguida a fração solúvel foi dialisada em Tp-THCl. Com a amostra, livre de DNA, foram testadas as técnicas de purificação de troca aniônica, utilizando as colunas cromatográficas Q XL HiPrep e Q HP HiPrep, e de interação hidrofóbica, utilizando a coluna Source 15Phe, respectivamente, em sistema *AKTA Purifier* (GE *Health Care*). Entre cada etapa cromatográfica a amostra foi dialisada com Tp-THCl e para aplicação na coluna de interação hidrofóbica a amostra foi previamente tratada com sulfato de amônio 750 mM. A avaliação da eficiência das técnicas de purificação testadas foi determinada pela análise da concentração de proteína durante o processo de purificação (detecção em comprimentos de onda de 215 nm, 254 nm e 280 nm); expressão da β -galactosidase, utilizando eletroforese vertical em géis de poliacrilamida 12 %; quantificação de proteínas totais, através do método de Bradford; e determinação da atividade da enzima β -galactosidase utilizando ONPG (o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo) como substrato. A melhor separação e concentração da enzima, assim como o maior rendimento do processo (aproximadamente 50%), foram observados utilizando apenas a coluna cromatográfica Q HP HiPrep. Entretanto foi possível constatar que não ocorreu uma purificação total da β -galactosidase, mas em todas as técnicas testadas, a proteína foi expressa em grande quantidade e manteve atividade enzimática.

Palavras-chave. Bioprocesso; purificação; β -galactosidase.

Financiamento/Apoio: IFRS (BICET), CNPq, FAPERGS.