

## **Avaliação da purificação da $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces sp.* com cauda de histidina**

**Paolla Pauli, Matheus Loch Velvites Ferreira, Juliane Carraro Nunes, Bruna Coelho de Andrade, Pedro Ferrari Dalberto, Joice Maria Chies, Gaby Renard (coorientadora), Giandra Volpato (orientadora)**

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

p-pauli@live.com, giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br

A enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose. Esta enzima apresenta grande interesse para a indústria de laticínios e farmacêutica, sendo utilizada na preparação de produtos para indivíduos intolerantes à lactose. A  $\beta$ -galactosidase pode ser obtida de forma recombinante, possibilitando a inserção de uma cauda de poli(histidina) a região C ou N-terminal da sequência da mesma, promovendo à purificação da proteína por meio de coluna cromatográfica de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces sp.* com cauda de histidina expressa em *Escherichia coli*. Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o gene da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces sp.*, contendo cauda de histidina na região N-terminal e mantidas em 40% de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*master cell bank*-MCB). Foram realizados cultivos em *Erlenmeyer* de 2 L, contendo 500 mL de meio de cultivo LB, 50  $\mu\text{g/mL}$  canamicina e 10% de pré-inóculo padronizado com densidade óptica (OD) de 0,1 a 600 nm, mantidos em agitação orbital de 180 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$ . Os cultivos foram induzidos quando alcançaram OD entre 0,4 e 0,6, com 10 g/L de lactose. Após 24 h, os meios de cultivos foram centrifugados ( $4^{\circ}\text{C}$ , 8.000 rpm por 15 minutos), as células foram ressuspendidas em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5 e rompidas utilizando Prensa de *French* com pressão de 30 kpsi. Posteriormente, as células foram centrifugadas ( $4^{\circ}\text{C}$ , 18.000 rpm por 30 minutos) e a fração solúvel foi dialisada utilizando membrana de 12-14.000 Da, em tampão de ligação (20 mM de imidazol, 20 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4 e 750 mM de NaCl). A purificação foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica *His-Trap HP (GE-HealthCare)*, em sistema *AKTA Purifier (GE-HealthCare)*, amostras foram recolhidas de forma fracionada utilizando um gradiente de eluição de 0 a 125 mM de Imidazol. A avaliação da eficiência do processo foi determinada por: SDS-PAGE (12%), concentração proteica pelo método de Bradford, atividade enzimática utilizando um método espectrofotométrico com o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), presença de DNA do hospedeiro (*E. coli*) utilizando a técnica de 16S e a homogeneidade e identidade da enzima foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Os resultados demonstraram a ausência de DNA do hospedeiro e a identidade da proteína foi confirmada com a identificação de 179 peptídeos únicos, 1596 contagens espectrais, e cobertura de sequência de 90%. A purificação da  $\beta$ -galactosidase ocorreu de forma parcial e houve redução da atividade enzimática após a purificação. Portanto, novos testes estão sendo realizados utilizando uma resina IMAC de maior afinidade, além da preparação de suportes visando a purificação e imobilização da  $\beta$ -galactosidase em uma única etapa.

**Palavras-chave.**  $\beta$ -galactosidase; His-Tag; IMAC.

Financiamento/Apoio: IFRS, Fapergs, CNPq, Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda.