

Avaliação das condições de purificação da enzima β -galactosidase recombinante

Marianna Coelho Mendes¹, Matheus Loch Velvites Ferreira¹, Bruna Coelho de Andrade¹
Gustavo Roth², Victória Furtado Migliavacca³, Gaby Renard², Giandra Volpato^{1*}
*Orientadora

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -
Campus Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) - *Campus* Porto Alegre.
Porto Alegre, RS, Brasil.

³Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) – *Campus* Novo Hamburgo. Novo
Hamburgo, RS, Brasil.

A enzima β -galactosidase (lactase) é responsável pela hidrólise do dissacarídeo lactose, resultando em seus constituintes monossacarídeos glicose e galactose. É amplamente explorada na indústria alimentícia, para produção de leite e derivados com baixo teor de lactose, assim como na indústria farmacêutica, devido a crescente demanda de pessoas intolerantes a lactose. As β -galactosidasas podem ser produzidas por microrganismos, estes são as principais fontes de obtenção da enzima para utilização industrial. Através da técnica do DNA recombinante, a expressão em *Escherichia coli* da β -galactosidase de *Kluyveromyces* surge como alternativa inovadora de otimização do processo produtivo. Esta técnica, assim como diversos processos biotecnológicos, envolve a necessidade da purificação do bioproduto de interesse. O objetivo do presente trabalho foi determinar as condições de purificação da enzima recombinante β -galactosidase, testando e avaliando a eficiência de diferentes técnicas. Cepas de *E. coli* recombinante BL21(DE3) transformadas com o gene que codifica a β -galactosidase de *Kluyveromyces sp.*, foram cultivadas em batelada alimentada, em biorreator de 2 L em condições previamente determinadas. As células cultivadas foram resuspendidas 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) e por uma etapa de precipitação do DNA utilizando sulfato de estreptomicina 1%. A fração solúvel foi então 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 *ÅKTA Purifier* (GE Health Care). Entre cada etapa cromatográfica a amostra foi dialisada com Tp-THCl e tratada com sulfato de amônio 750 mM para aplicação na coluna de interação hidrofóbica. A avaliação da eficiência das técnicas testadas ocorreu pela análise da concentração de proteína, através de diferentes comprimentos de onda, durante o processo de purificação; expressão da β -galactosidase, utilizando eletroforese vertical em géis de poli(acrilamida) 12 %; quantificação de proteínas, 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, concentração da enzima e o maior rendimento do processo (aproximadamente 50%), foram observados utilizando apenas a coluna cromatográfica Q HP HiPrep. Não houve a 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.

Trabalho executado com recursos do Edital PROPI Nº 012/2015- Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação.