

Utilização de técnicas cromatográficas visando a obtenção da enzima β -galactosidase recombinante

Bruna Coelho de Andrade¹, Victoria Furtado Migliavacca², Matheus Loch Velvites Ferreira³, Marianna Coelho Mendes⁴, Gustavo Roth¹, Jocelei Maria Chies⁵,
Gaby Renard¹, Giandra Volpato^{3*}

*Orientadora

¹Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)-
Campus Novo Hamburgo. Porto Alegre, RS

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) - Campus Porto Alegre. Porto Alegre, RS

⁴Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS

⁵Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento. Porto Alegre, RS

A β -galactosidase é uma enzima utilizada na preparação de leite e produtos lácteos com baixo teor de lactose, bem como suplementos alimentares, utilizados por indivíduos intolerantes a lactose. O uso industrial de enzimas ainda apresenta um aumento de custo que se reflete no valor do produto final, uma alternativa que poderá permitir a redução nos custos de produção é a obtenção da enzima β -galactosidase recombinante, onde uma das principais etapas do processo envolve a purificação da enzima, onde podem ser utilizadas técnicas cromatográficas. Com isso, objetivo deste trabalho foi determinar condições cromatográficas para a obtenção da enzima β -galactosidase 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 2L em condições previamente determinadas. As células cultivadas foram ressuspensas em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5 (TpA), rompidas em Prensa *French* e a fração solúvel foi coletada. Esta fração foi centrifugada (18.000 rpm, 30 min, 4°C) e passou por uma etapa de precipitação do DNA utilizando sulfato de estreptomicina a 0,1%. A fração solúvel foi dialisada em TpA e utilizada posteriormente. Foram testadas técnicas de purificação de troca aniônica, utilizando a coluna cromatográfica *HiPrep Q HP*, e de interação hidrofóbica, utilizando a coluna *Source 15 PHE*, em sistema *ÅKTA Purifier*. Entre cada etapa cromatográfica a amostra foi dialisada em TpA e para aplicação na coluna de interação hidrofóbica a amostra foi previamente tratada com sulfato de amônio 750 mM. Os cromatogramas obtidos foram analisados e as frações de interesse foram coletadas. Para todas as amostras, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford e a atividade enzimática foi determinada utilizando o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12%. Foi observado que o rendimento diminuiu posteriormente a cada etapa cromatográfica, porém a enzima permaneceu ativa em todas as etapas testadas. Após a etapa de troca aniônica o rendimento da cromatografia foi de aproximadamente 50%, quando utilizada na sequência a etapa de interação hidrofóbica o rendimento do processo diminuiu para 1,7%, sem alterar a eficiência da purificação. Os melhores resultados de purificação da β -galactosidase recombinante foram obtidos utilizando apenas a coluna cromatográfica de troca aniônica, apresentando atividade enzimática específica de 5,35 U/mg_{proteína}. Sendo assim, esses resultados são importantes para a realização de novos estudos com a utilização de novas técnicas de purificação, visando reduzir os custos da produção da enzima.

Palavras-chave: Cromatografia. Interação hidrofóbica. Troca iônica. Enzima recombinante.