

Análise de estratégias de controle de cultivo em biorreatores para a obtenção da enzima β -galactosidase recombinante

Victória Furtado Migliavacca¹, Bruna Coelho de Andrade², Juleane Lunardi³, Gustavo Roth²,
Claucia Fernanda Volken de Souza⁴, Jocelei Maria Chies³, Gaby Renard², Giandra Volpato⁵
*Orientadora

¹Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) - Unidade Novo Hamburgo, RS

²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS

³Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda., Porto Alegre, RS

⁴Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, RS

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), -
Campus Porto Alegre. Porto Alegre, RS

A β -galactosidase é uma enzima que hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos constituintes. Tem especial importância para a indústria alimentícia e farmacêutica sendo utilizada como suplemento alimentar e para produção de alimentos com baixo teor deste açúcar. Atualmente, há um aumento de pessoas diagnosticadas com graus de intolerância a lactose, levando a indústria a aumentar sua produção de produtos direcionados a estes indivíduos. O uso industrial de enzimas ainda apresenta um aumento de custo no processo refletindo no valor do produto final. Uma alternativa para aumentar a produtividade e rendimento do processo é a utilização da enzima recombinante e a produção através de batelada alimentada em biorreatores. O objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da enzima β -galactosidase recombinante em biorreatores por meio de cultivos em batelada alimentada. Utilizou-se cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada, contendo o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. Os cultivos foram realizados em biorreatores de bancada e temperatura de 30°C. Nos cultivos em batelada alimentada, a alimentação foi ligada após 5 h e conduzidos por 30h. Testou-se duas estratégias de alimentação: DO-stat, onde a concentração de oxigênio dissolvido (pO₂) foi mantida acima de 30%, e linear com variação de 1 a 3% da vazão total da bomba de alimentação. Nesta estratégia o pO₂ foi mantido em 30% através da cascata de agitação. Estudou-se três tempos de indução para expressão da enzima, utilizando 1 mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Ao longo dos cultivos, foram realizadas coletas nas quais foi determinada a concentração celular. Os precipitados foram ressuspensos em 500 μ L de tampão Tris HCl 50mM pH 8,0, rompido por sonicação e centrifugados a 4°C, 13.000rpm, 30min. Analisou-se a expressão da enzima recombinante nas frações solúveis, por meio de SDS-PAGE (12%). A proteína intracelular foi quantificada pelo método de Bradford. Determinou-se a atividade enzimática utilizando o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato. A maior atividade, produtividade e rendimento enzimáticos foram obtidos no cultivo com alimentação DO-stat e com indução em 12h de cultivo. Na estratégia Linear, a maior atividade específica e produtividade enzimática foram obtidos com 18h de indução. Verificou-se a grande influência das condições de cultivo para a expressão e atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *E. coli* recombinante. A estratégia DO-stat foi a melhor condição alcançada, mostrando a influência do tempo de indução. Os resultados demonstraram a importância dos estudos em batelada alimentada para aumento da produção desta enzima.

Palavras-chave: DO-stat. Linear. Enzima recombinante. Superexpressão