

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

Paolla Pauli<sup>1</sup>, Matheus Loch Velvites Ferreira<sup>1</sup>, Juliane Carraro Nunes<sup>1</sup>, Bruna Coelho de Andrade<sup>1</sup>, Pedro Ferrari Dalberto<sup>1</sup>, Jocelei Maria Chies<sup>1</sup>, Gaby Renard<sup>1</sup>, Giandra Volpato<sup>1\*</sup>

\*Orientador(a)

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) - *Campus* Porto Alegre. Porto Alegre, RS

A enzima  $\beta$ -galactosidase 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. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados cultivos em Erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio de cultivo LB, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 com 10 g/L de lactose. Após 24 h, as células foram separadas por centrifugação, ressuspensas em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5, rompidas utilizando Prensa de French com pressão de 30 kpsi e novamente centrifugadas ( $4^{\circ}\text{C}$ , 18.000 rpm, por 30 minutos) para a separação da fração solúvel que foi dialisada em tampão de ligação. Dois protocolos de purificação foram testados: o primeiro utilizando a resina His-Trap HP (GE-HealthCare), em sistema ÄKTA Purifier, com um gradiente de eluição de 0 a 125 mM de Imidazol; o segundo, a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) em batelada utilizando 50 e 100 mM de Imidazol. A avaliação dos protocolos 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) e presença de DNA do hospedeiro (*E. coli*) utilizando a técnica de 16S. A purificação da  $\beta$ -galactosidase ocorreu de forma parcial e a ausência de DNA do hospedeiro foi verificada nos dois protocolos testados. A atividade específica da  $\beta$ -galactosidase após a purificação foi de 8,4 U/mgproteína e 94,3 U/mgproteína, para o primeiro e para o segundo protocolo testados, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência da interação entre a cauda de poli(histidina) presente na enzima recombinante e os suportes IMAC testados, orientando o estudo de novos suportes visando a purificação e imobilização da  $\beta$ -galactosidase em uma única etapa.

Palavras-chave:  $\beta$ -galactosidase. His-Tag. IMAC.