



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MICAEL DE ANDRADE LIMA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces*
lactis UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO**

FORTALEZA

2014

MICAEL DE ANDRADE LIMA

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- L699r Lima, Micael de Andrade.
Recuperação e purificação de β Galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando cromatografia de modo misto / Micael de Andrade Lima. – 2014.
115 f. : il. color. , enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.
1. Engenharia Química. 2. Enzimas. 3. Fermentação. I. Título.

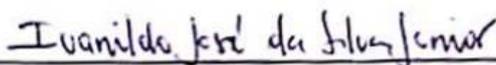
MICAEL DE ANDRADE LIMA

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

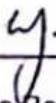
Aprovada em: 19/02/2014.

BANCA EXAMINADORA



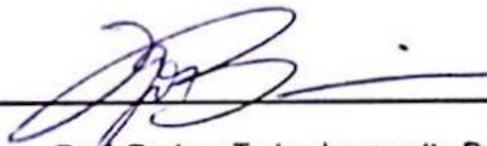
Prof. Dr Ivanildo José da Silva Júnior(Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o centro de toda a minha existência. Minha fonte inesgotável de forças, minha inspiração, minha direção, meu refúgio, meu sustento, minha alegria, minha razão de viver, princípio, meio e fim de absolutamente todos os meus sonhos. Não fosse por Ele, eu nunca teria chegado até aqui. Minha história seria incompleta e minha vida não teria qualquer sentido. Obrigado por tudo, Senhor.

Aos meus pais, Miguel e Helena, por todo apoio incondicional e sem reservas que sempre me deram. Por serem meus primeiros professores e meus exemplos de vida, em quem sempre me espelhei. Por fazerem o possível e o impossível para que eu nunca desistisse. Por, inúmeras e repetidas vezes, abrirem mão de seus próprios sonhos para que eu pudesse viver os meus. Palavras jamais seriam suficientes para expressar o quanto os admiro, os valorizo e os amo. Para sempre.

A minha irmã querida, Priscila, amiga de todas as horas e a minha companhia mais divertida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior, que sempre esteve disposto a me conduzir ao caminho certo, nas muitas vezes em que estive perdido na minha pesquisa. Por ter me recebido, desde o primeiro dia quando bati a sua porta, por ter confiado na minha capacidade quando decidi me aventurar em uma área que desconhecia quase que por completo e por me incentivar a continuar a ir em frente, a pesar das circunstâncias e dos muitos contratemplos.

Ao GPSA, na pessoa da Prof. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo, pela infraestrutura cedida e pelo vasto conhecimento compartilhado conosco, fundamental para o sucesso dessa dissertação.

À Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, coordenadora do grupo de pesquisa GPBIO, onde fiz boa parte de meus experimentos na área de fermentação e enzimas. Por ter gentilmente cedido seu laboratório e por ter direcionado minha pesquisa com observações que fizeram toda diferença.

Aos meus eternos amigos de graduação Tiago, Rosy, Valéria e Raquel, que compartilharam todos os momentos da minha formação até aqui, os bons e os ruins, os alegres e os tristes. Pelo tanto que me ensinaram e por terem me feito, com sua

eterna paciência, uma pessoa imensuravelmente melhor do que eu era antes de conhecê-los. Obrigado, meninos. Vocês me proporcionaram os momentos mais felizes, que ficarão gravados pra sempre em minha memória.

A todos os meus companheiros de laboratório. O pessoal do LP1 – Diego, Eurânio, Bruna, Natália, Letícia, Eric, Santângela e Thainá – pela amizade, companheirismo, cooperação e trabalho mútuo. O pessoal do GPBIO – Ítalo, Celina, Lucas, Fátima, Cris, Camila, Mary, Sandy, Edvan, e todos os outros – por estarem sempre dispostos a me ajudar em todos os momentos em que precisei e por me fazerem sentir como se estivesse em meu próprio laboratório.

À CAPES (Coordenação de Acompanhamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa cedida e apoio financeiro ao projeto aqui desenvolvido.

*“O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.”*
Isaac Newton (1642-1727)

RESUMO

As mais importantes lactases, em termos de interesse biotecnológico, são aquelas produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que são intracelulares e, em sua maioria, são obtidas por fermentação em cultura submersa. Esta técnica, assim como a maioria dos processos biotecnológicos, envolve a necessidade de purificação de proteínas e peptídeos a partir de uma variedade de fontes. Neste contexto, uma das técnicas mais notavelmente promissoras é a cromatografia de modo misto, que permite interações iônicas e hidrofóbicas simultaneamente entre o adsorvente e o adsorbato. O objetivo do presente trabalho foi estudar a viabilidade da recuperação e purificação da enzima β -galactosidase, produzida por meio de processo fermentativo e utilizando o micro-organismo *Kluyveromyces lactis*, por técnica de cromatografia de modo misto. Operações unitárias de precipitação proteica e diálise foram também realizadas com o intuito de concentrar a enzima de interesse e eliminar detritos celulares e outros interferentes advindos do meio de fermentação, o que ocasionaria uma diminuição do rendimento do processo. A produção se apresentou satisfatória, com uma média de valores de concentração de enzimas totais de 0,45 mg/mL, atividade enzimática de 67 U/mL, atividade específica de 167,9 U/mg. O Fator de Purificação obtido foi de 1,17. Uma precipitação seguida de diálise foi realizada e a posterior corrida cromatográfica em leito fixo com esse material rendeu valores de recuperação de 41,0 e 48,2% de proteína total e atividade total, respectivamente. A análise de eletroforese SDS-PAGE confirmou a evolução do processo de purificação no decorrer das operações unitárias, atestando a viabilidade do emprego das técnicas utilizadas para obtenção de enzimas com considerável grau de pureza com alto valor comercial agregado.

Palavras-chave: β -galactosidase. Cromatografia de Modo Misto. Purificação de Biomoléculas.

ABSTRACT

The most important lactases, as far as biotechnological interest is concerned, are those produced by *Kluyveromyces* yeasts, which are intracellular and currently obtained mostly by submerged-state fermentation. This technique, just as the mainstream biotechnological processes, involves a need for protein and peptide purification from a variety of sources. In this context, one of the most promising notable techniques that can be highlighted is Mixed Mode Chromatography, which allows simultaneous ionic and hydrophobic interactions between the adsorbent and the adsorbate. Thus, the aim of this work was to assess the feasibility of recovery and purification of a *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase, produced via fermentation process, by employing Mixed Mode Chromatography. Unit operations, such as protein precipitation and dialysis were also performed in order to concentrate the enzyme of interest and eliminate cell debris and other interferences inherent in the fermentation medium, something that would result in a decrease in the process yield. The production showed satisfactory results, with mean values for total enzyme concentration of 0.45 mg/mL, enzymatic activity of 77 U/mL and specific activity of 167,9 U/mg. The Purification Factor obtained was 1.17. A precipitation step, followed by a dialysis process, was performed and the later chromatographic run carried out in fixed bed with this material yielded recovery values of 41.0 and 48.2% of total protein and activity, respectively. SDS-PAGE Electrophoresis confirmed the purification evolution throughout the unit operations employed, confirming the viability of the employment of the techniques used to obtain an enzyme of considerable degree of purity and possessing high-added value.

Keywords: β -galactosidase. Mixed Mode Chromatography. Biomolecule Purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Aspecto estrutural do açúcar no β-galactosidase da <i>Kluyveromyces lactis</i>.....	06
Figura 1.2	Esquema representativo de uma diálise	16
Figura 1.3	Sistema típico de adsorção industrial	18
Figura 1.4	Representação de uma curva de <i>breakthrough</i>	19
Figura 1.5	Esquema simplificado da adsorção por cromatografia de troca iônica	23
Figura 1.6	Esquema simplificado de separação por interação hidrofóbica	25
Figura 1.7	Funcionamento dos ligantes multimodais	26
Figura 1.8	Estrutura da resina Cpto MMC	28
Figura 2.1	Aspectos morfológicos celulares da levedura <i>Kluyveromyces lactis</i>	31
Figura 2.2	Fluxograma de produção de lactase por fermentação	38
Figura 2.3	Sistema de agitação rotatória TECNAL utilizado nos ensaios em batelada ...	44
Figura 2.4	Empacotamento da coluna cromatográfica	42
Figura 2.5	Sistema utilizado para os ensaios de adsorção e desorção em leito fixo.....	43
Figura 2.6	Diagrama esquemático de obtenção de uma curva de <i>breakthrough</i>.....	49
Figura 2.7	Ilustração de uma curva típica de <i>breakthrough</i>.....	40
Figura 2.8	Esquema de diálise da solução advinda da precipitação proteica	26
Figura 3.1	Perfil de retenção de Azul Dextrana para cálculos de parâmetros hidrodinâmicos ...	50
Figura 3.2	Perfil de retenção de Acetona para cálculos de parâmetros hidrodinâmicos.....	50
Figura 3.3	Diagrama de Pareto para experimentos de adsorção	60
Figura 3.4	Superfície de resposta para adsorção em pH 6,5	62
Figura 3.5	Superfície de resposta para adsorção em pH 7,0.....	66
Figura 3.6	Superfície de resposta para adsorção em pH 7,5	67
Figura 3.7	Curvas de <i>breakthrough</i> de proteína total	66
Figura 3.8	Isoterma de adsorção de proteína total a 25°C.....	69
Figura 3.9	Curvas de <i>breakthrough</i> de atividade enzimática.....	68

Figura 3.10	Isoterma de adsorção de atividade enzimática a 25°C	62
Figura 3.11	Diagrama de Pareto para experimentos de eluição.....	72
Figura 3.12	Superfície de resposta para eluição em pH 6,5.....	77
Figura 3.13	Superfície de resposta para eluição em pH 7,0.....	78
Figura 3.14	Superfície de resposta para eluição em pH 7,5.....	79
Figura 3.15	Cromatograma para amostra fermentativa após a lise celular.....	79
Figura 3.16	Cromatograma para amostra fermentativa após a diálise.....	80
Figura 3.17	Perfil eletroforético das amostras	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Principais indústrias consumidoras de enzimas	05
Tabela 1.2	Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas	09
Tabela 1.3	Propriedades da resina Capto MMC	30
Tabela 2.1	Constituição do Agar YEPD	32
Tabela 2.2	Composição e características do soro de leite (por 100 g)	32
Tabela 2.3	Valores máximos, mínimos e pontos centrais das variáveis independentes utilizadas no planejamento para adsorção	39
Tabela 2.4	Delineamento completo gerado pelo software Statistica v.10 para as variáveis independentes do processo de adsorção	40
Tabela 2.5	Características do sistema de adsorção	43
Tabela 2.6	Valores máximos, mínimos e pontos centrais das variáveis independentes utilizadas no planejamento para eluição	50
Tabela 2.7	Delineamento completo gerado pelo software Statistica v.10 para as variáveis independentes do processo de eluição	51
Tabela 3.1	Volume de extrato obtido, concentração e atividade de cada fermentação	56
Tabela 3.2	Características hidrodinâmicas experimentais obtidas para o leito fixo	58
Tabela 3.3	Resposta ao planejamento experimental de adsorção	59
Tabela 3.4	Modelos de regressão do valor q	61
Tabela 3.5	Análise de variância das variáveis estudadas na adsorção	61
Tabela 3.6	Parâmetros do modelo de Langmuir para isoterma de adsorção de proteína total	68
Tabela 3.7		

Tabela 3.8	Parâmetros do modelo de Langmuir para isoterma de adsorção de atividade enzimática	69 71
Tabela 3.9	Resposta ao planejamento experimental de eluição	73
Tabela 3.10	Modelos de regressão para recuperação	73
Tabela 3.11	Análise de variância das variáveis estudadas na eluição	
Tabela 3.12	Proteína total e atividade enzimática das frações coletadas ao final de cada operação unitária	77
Tabela 3.13	Balço de massa (BM) em cada uma das etapas da corrida cromatográfica em função da concentração de proteínas totais e atividade para a amostra 1 (extrato bruto). Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl	80
Tabela 3.14	Balço de massa (BM) e atividade específica (AE) em cada uma das etapas da corrida cromatográfica em função da medida de proteína total, atividade total e atividade específica (AE) para a amostra 2 (extrato pós-diálise). Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl	81
Tabela A1	Comparação de recuperação entre amostras após cada uma das etapas de <i>downstream</i>	82
Tabela A2	Coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, com os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a resposta de valor q	97
	Coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, com os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a resposta de recuperação enzimática	97

LISTA DE SÍMBOLOS

A_h	Área delimitada pela curva, por $t = t_m$ e $C/C_0 = 1,0$
C	Concentração de equilíbrio do adsorbato na fase fluida, mg.mL^{-1}
C_0	Concentração inicial, mg.mL^{-1}
L	Comprimento do leito, cm
m_{ads}	Massa de adsorvente, g
Q	Vazão volumétrica de trabalho, mL.min^{-1}
q_{max}	Capacidade máxima de saturação de proteína no adsorvente, mg.mL^{-1}
T	Temperatura, °C
t	Tempo, min
t_m	Tempo morto, min
t_r	Tempo de retenção, min
U	Unidade de Atividade Enzimática, adimensional
V_c	Volume da coluna (leito), L
ε	Porosidade ou porção de vazios, adimensional

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	01
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
	1.1 ENZIMAS	04
	1.2 β -GALACTOSIDASE	06
	1.3 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	10
	1.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	12
	1.5 PRECIPITAÇÃO PROTEICA	13
	1.6 DIÁLISE	14
	1.7 CROMATOGRAFIA	17
	1.7.1 Leito Fixo	17
	1.7.2 Isotherma de Adsorção	20
	1.7.3 Cromatografia de Troca Iônica	22
	1.7.4 Cromatografia de Interação Hidrofóbica	24
	1.7.5 Cromatografia de Modo Misto	26
	1.7.6 O Adsorvente Capto MMC	27
2	METODOLOGIA	30
	2.1 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR <i>Kluyveromyces lactis</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	30
	2.1.1 Materiais utilizados	30
	2.1.2 Preparação do meio de cultura	31
	2.1.3 Preparo do inóculo	31
	2.1.4 Fermentação	31
	2.1.5 Determinação da concentração celular	32

2.1.6 Extração da enzima β -galactosidase	32
2.1.7 Fluxograma de produção	32
2.1.8 Medida da concentração de proteínas totais	35
2.1.9 Medida da atividade enzimática	35
2.1.10 Eletroforese SDS-PAGE	36
2.2 ENSAIOS DE ADSORÇÃO COM SOLUÇÃO COMERCIAL DE β - GALACTOSIDASE	37
2.2.1 Testes iniciais de adsorção	38
2.2.2 Empacotamento da Coluna Cromatográfica e características do sistema	41
2.2.3 Aparato e Condições Experimentais utilizados nos experimentos em leito fixo	42
2.2.4 Isoterma de Adsorção de β -galactosidase	44
2.2.5 Porosidade do Leito, Total e de Partícula	46
2.2.5.1 Porosidade do leito	46
2.2.5.2 Cálculo da porosidade total (ϵ_T)	47
2.2.5.3. Cálculo da porosidade da partícula (ϵ_p)	48
2.2.6 Testes de Eluição por Planejamento de Experimentos	48
2.3 PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ORIUNDA DE FERMENTAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO	51
2.3.1 Precipitação Proteica	51
2.3.2 Diálise da solução enzimática	52
2.3.3 Ensaio em coluna cromatográfica	54

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
	3.1 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR <i>Kluyveromyces lactis</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	55
	3.2 ENSAIOS DE ADSORÇÃO COM SOLUÇÃO COMERCIAL DE β - GALACTOSIDASE	56
	3.2.1 Caracterização do leite	56
	3.2.2 Testes de Adsorção por Planejamento Experimental	58
	3.2.3 Isoterma de adsorção de proteína total e atividade	65
	3.2.4 Testes de Eluição por Planejamento Experimental	70
	3.3 PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ORIUNDA DE FERMENTAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO	77
	3.3.1 Precipitação proteica e diálise	77
	3.3.2 Ensaio em coluna cromatográfica	79
	3.3.3 Eletroforese SDS-PAGE	83
4	CONCLUSÃO	85
	Sugestões para trabalhos futuros	87
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO ÚNICO	96

INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, muito superiores aos dos catalisadores químicos (LEHNINGER, 2008). A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: a natural, formada por tecidos animais e vegetais, de onde as enzimas podem ser extraídas e usadas *in natura*, ou extraídas e purificadas; e a cultivada, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas (REGULY, 2000). De acordo com o autor, as vantagens da utilização de enzimas microbianas são a sua versatilidade, grande aplicação e sofisticação dos processos que as empregam, possibilidade de utilização de matérias-primas baratas, rendimento de produção que podem ser aumentados pelo aprimoramento das linhagens microbianas e a otimização das condições de fermentação. Essas enzimas podem ser utilizadas tanto em sua forma livre como imobilizadas, com aplicações que são comprovadamente bastante promissoras para esta última forma.

Entre esses catalisadores, encontra-se a β -galactosidase (ou lactase), que é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose de leite e soro de queijo. É empregada em larga escala industrial, sendo a indústria de alimentos sua principal consumidora.

As características dos sistemas biotecnológicos fazem com que a biosseparação se torne a parte mais onerosa da obtenção de biomoléculas (SANTOS *et al*, 2002). Por este motivo, existe uma necessidade mandatória de se estudar e desenvolver novas técnicas e procedimentos que sejam capazes de realizar biosseparações eficientes e, ao mesmo tempo, econômicas.

A lactase produzida por *Kluyveromyces lactis* é intracelular, e, por isso há uma necessidade de rompimento celular e uma posterior purificação para a obtenção da enzima de interesse. Neste contexto, uma das técnicas promissoras que pode ser empregada com esta finalidade é a adsorção, onde a proteína se liga a um adsorvente por interações iônicas e/ou hidrofóbicas e é eluída posteriormente para recuperação.

Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi produzir, recuperar e purificar a enzima β -galactosidase oriunda de processo fermentativo utilizando a levedura *K. lactis*, com posterior submissão do material lisado, precipitado e dialisado à técnica de adsorção em uma coluna cromatográfica operando em leito fixo. Para que se alcançasse esse objetivo, várias metas específicas tiveram de ser atingidas, a saber:

- Produção, *via* fermentação, da enzima β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces lactis*, tendo o soro de leite como meio de cultivo;
- Realização de rompimento celular, com vistas à extração da enzima;
- Realização de operação de precipitação com sais de amônio com vistas à eliminação de impurezas oriundas dos detritos celulares após a lise e, por consequência, à concentração da enzima de interesse;
- Realização de operação de diálise para a retirada dos sais de amônio empregados na precipitação;
- Aplicação de Planejamentos Experimentais para a obtenção das melhores condições de adsorção e eluição;
- Obtenção das curvas de *breakthrough* com a enzima comercial e posterior construção das isotermas de adsorção de proteína total e atividade enzimática;
- Realização de ensaios em coluna cromatográfica com posterior avaliação da técnica por meio de cálculos de recuperação de proteína e atividade;
- Aplicação de análise de eletroforese após cada uma das operações unitárias com o objetivo de se acompanhar a evolução da purificação da enzima β -galactosidase.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS

Enzimas podem ser definidas como proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores químicos (LEHNINGER, 2008). Um catalisador, por sua vez, é um composto capaz de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo (BORZANI et al., 2005). Por meio de enzimas, a catálise é realizada em condições brandas e, na maioria das vezes, em soluções aquosas, sob pressão e temperaturas amenas. Essas são algumas características que diferenciam as enzimas dos catalisadores químicos, sendo a principal delas seu alto grau de especificidade em relação ao substrato (VIEIRA, 2009). As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (KRAJEWSKA, 2004). Vale ressaltar, porém, que tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam.

Biocatálise ou biotransformação são processos nos quais um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato por um número limitado de etapas enzimáticas. Para que este processo de biotransformação seja eficaz, é necessária a análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e otimização integrada de um processo biotecnológico (AIRES-BARROS, 2002).

Os principais consumidores industriais de enzimas estão listados na Tabela 1.1 (BORZANI et al., 2005).

Tabela 1.1 Principais indústrias consumidoras de enzimas

Indústria	Consumo (%)
Detergentes	40 – 45
Processamento de amido	20 – 25
Laticínios	12 – 15
Cervejarias	2 – 4
Suco de frutas / vinhos	3 – 5
Panificação	1 – 2
Têxtil e papel	4 – 6
Couro	1 – 2
Farmacêutica	6 – 10

Fonte: Borzani et al. (2005)

Para que se possa ter uma ideia da magnitude desse setor, o mercado de enzimas no Brasil, já em 2005, era avaliado em US\$ 147,2 milhões (3% do mercado internacional), sendo que 20,6 milhões em exportações e 126,6 milhões em importações, considerando enzimas industriais e terapêuticas, medicamentos contendo enzimas e kits de diagnóstico a base de enzimas. Deste total de 147,2 milhões de dólares, 86% correspondiam a importações, indicando grande desvantagem tecnológica e estratégica (BON, 2006). Os valores atuais certamente são ainda maiores, visto a comprovada expansão desse mercado.

A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: a natural, formada por tecidos animais e vegetais, de onde as enzimas podem ser extraídas e usadas *in natura*, ou extraídas e purificadas; e a cultivada, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas (REGULY, 2000). De acordo com o autor, as vantagens da utilização de enzimas microbianas são a sua versatilidade, grande aplicação e sofisticação dos processos que as empregam, possibilidade de utilização de matérias-primas baratas, rendimento de produção que podem ser aumentados pelo aprimoramento das linhagens microbianas e a otimização das condições de fermentação.

A maioria das enzimas tem aplicações vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico,

analítico e científico. As principais aplicações industriais encontram-se dentro da área de biotecnologia, envolvendo microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e de alimentos (BORZ'ANI et al., 2005).

As enzimas utilizadas nos setores industriais nos últimos anos tem sido, quase em sua totalidade, produzidas por micro-organismos. A tecnologia e engenharia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para a utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

1.2 β -GALACTOSIDASE

A β -D-galactosidase (β -D-galactosídeo, galactohidrolase, E.C. 3.2.1.23), mais comumente conhecida como lactase, é uma das enzimas mais importantes empregadas no processamento de alimentos. A enzima catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores de β -D-galactose em β -D-galactosídeos. Convencionalmente, a sua principal aplicação tem sido na hidrólise da lactose em leite e derivados, particularmente em soro de queijo. A lactose é um dissacarídeo formado por glicose e galactose que é encontrado no leite (PEREIRA-RODRÍGUEZ, 2012). Em humanos, a intolerância à lactose é um problema relativamente comum. De fato, estima-se que a intolerância à lactose ocorre em 70% da população mundial adulta, e o leste asiático tem o maior número de intolerantes à lactose, com mais de 90% da população (HUSAIN, 2010).

Má digestão e intolerância à lactose são causadas por insuficiência ou não persistência de β -galactosidase no organismo, que resulta de uma diminuição da atividade desta enzima, na membrana de borda da mucosa do intestino delgado de adultos (JUAJUN et al., 2011). Por esse motivo, existe um vasto mercado para leite e os produtos lácteos sem lactose ou com baixo teor desse sacarídeo, que pode ser obtido por hidrólise enzimática utilizando β -galactosidasas (OLIVEIRA et al., 2011). A estrutura da enzima é mostrada na Figura 1.1, a seguir.

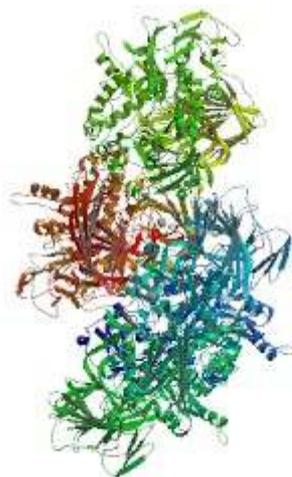


Figura 1.1 Base estrutural da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (PEREIRA-RODRÍGUES, 2012).

Além da má digestão de lactose, a cristalização desse sacarídeo pode ser um problema em produtos lácteos, como sorvetes e leite condensado. β -galactosidasas derivadas de organismos de grau alimentar podem ser utilizadas com sucesso contra estes problemas relacionados com a lactose (JUAJUN et al., 2011). Os produtos da hidrólise da lactose, isto é, glicose e galactose, são mais doces e também muito mais solúveis que a própria lactose (GANZLE E HAASE, 2008). Além disso, a eliminação de grandes quantidades de subprodutos da lactose a partir da fabricação de queijo e soro de queijo provoca sérios problemas ambientais. Estima-se que aproximadamente 160 milhões de toneladas de soro de leite são produzidos no mundo a cada ano (GUIMARÃES et al., 2010). No entanto, o soro pode ser utilizado como uma fonte de açúcares baratos, renováveis e fermentáveis após a hidrólise catalisada por β -galactosidase para a produção de moléculas de valor agregado ou produtos de larga produção por micro-organismos lactose-negativos (OLIVEIRA et al., 2011).

Além da hidrólise de lactose, β -galactosidasas com atividade de transgalactosilação são altamente atraentes para a produção de derivados de lactose com valor agregado. Em particular, os galacto-oligosacáridos (GOS), prebióticos que podem estimular o crescimento bactérias benéficas tais como lactobacilos e bifidobactérias, estão cada vez encontrando mais aplicações em

alimentos funcionais, como por exemplo, em edulcorantes de baixa caloria em produtos lácteos fermentados, doces, pães e bebidas (GANZLE E HAASE, 2008; GOSLING et al., 2010; PARK e OH, 2010).

Muitos organismos sintetizam naturalmente β -galactosidase, incluindo animais, plantas e microrganismos. No entanto, a fácil manipulação e os rendimentos promissores obtidos com micro-organismos têm favorecido o estabelecimento destes como principal fonte para a produção industrial de β -galactosidasas (PEREIRA-RODRÍGUEZ, 2012). Os micro-organismos mais comuns para a produção comercial de lactase são os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, as leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis* e a bactéria *Escherichia coli*. Embora as bactérias podem oferecer mais versatilidade, o corroborado estado GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) de leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, e de fungos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, ainda os coloca entre as fontes favoritas de β -galactosidase na biotecnologia de alimentos e na indústria farmacêutica (RUBIO-TEIXEIRA, 2006).

Entre as vantagens tecnológicas e ambientais de aplicação industrial da lactase, destacam-se (MANERA, 2006):

- Aumento da doçura, não necessitando adicionar outro carboidrato aos alimentos produzidos;
- Ausência de cristalização nos produtos congelados (nos sorvetes pode ser substituído 20% da sacarose por xaropes de lactose hidrolisada);
- Eliminação de lactose de concentrados lácteos, já que este dissacarídeo pode causar a agregação da caseína durante o processo de congelamento;
- O processo de maturação de queijos pode ser acelerado por meio da β -galactosidase;
- Na adição de xarope de soro hidrolisado em iogurtes, a etapa de pré-evaporação necessária para concentrar o leite é dispensada;

- Formação de GOS durante a hidrólise da lactose, favorecendo o crescimento da microflora intestinal;
- Maior biodegradabilidade do soro quando a lactose é hidrolisada, devido à alta quantidade de substâncias orgânicas presentes, representada principalmente pela lactose;

As propriedades da lactase variam conforme sua fonte. O peso molecular da enzima pode variar de 850.000 Daltons para a enzima de *E. coli* e até 201.000 e 90.000 Daltons para *K. marxianus* e *A. oryzae*, respectivamente. A temperatura e o pH ótimos de operação também diferem de acordo com a preparação comercial particular (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

O pH operacional é a característica que define a aplicação de uma dada β -galactosidase. Ele controla a atividade enzimática e influencia na estabilidade. Para o processamento de soro ácido ou produtos lácteos fermentados, as lactases provenientes de fungos filamentosos são mais indicadas, pois possuem o pH ótimo de operação de 3,0 a 5,0. Já as β -galactosidasas provenientes de leveduras possuem pH ótimo próximo ao neutro. A atividade máxima da lactase de *K. lactis* é obtida em pH 6,0 a 6,9 e de *K. marxianus* é alcançada em pH entre 6,5 e 7,0, respectivamente. Por este motivo possuem aplicação na hidrólise do soro doce (pH 6,1) e de leite (pH 6,6) (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

A temperatura ótima de operação de uma lactase comercial também depende de sua origem. β -galactosidasas provenientes de fungos filamentosos possuem maior atividade e maior estabilidade a temperaturas elevadas que as lactases de leveduras. As primeiras são utilizadas nas hidrólises de lactose entre 50 e 55°C, enquanto que com as últimas ocorre a desnaturação da enzima acima de 40°C.

A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* apresenta massa molecular em torno de 120-150 kDa (ZHOU e CHEN, 2001), sendo, por este motivo, considerada uma proteína de alta massa molecular. Esta enzima, por sua elevada atividade hidrolítica, tem sido usada para produzir alimentos livres de lactose (BEZERRA, 2012). Além disso, durante esta hidrólise, a produção de GOS via transgalactosilação também tem atraído interesse durante os últimos anos (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008).

A Tabela 1.2 descreve algumas das características das β -galactosidases microbianas. As enzimas com pH ótimo ácido e temperatura ótima relativamente alta são convenientes para a hidrólise de lactose em soro ácido. Comparada com a lactase de bactérias e leveduras, as fúngicas são proteínas relativamente pequenas, que não requerem íons metálicos para estabilidade ou atividade, como se pode notar na Tabela 1.2, o que é uma grande vantagem no processamento de alimentos. As enzimas provenientes de leveduras tem um pH ótimo neutro, conveniente para a hidrólise de lactose do leite ou soro doce. Elas são menos estáveis que as fúngicas e devem ser usadas somente em temperaturas moderadas (VIEIRA, 2009).

Tabela 1.2 Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas.

Fonte	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Cofatores necessários	M. Molec. (kDa)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	2,5 – 8,0	55-60	Nenhum	124	Widmer e Leuba (1979)
<i>Escherichia coli</i>	6,0 – 8,0	40	Na ⁺ , K ⁺	540	Wallenfeus e Malhotra (1960)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,5 – 7,5	37	K ⁺ , Mn ⁺ , Mg ⁺	200	Mahoney e Witaker (1977)
<i>Kuyveromyces lactis</i>	6,5 – 7,5	35	Na ⁺ , Mg ⁺ , Mn ⁺	135	Cavailles e Combes (1995)
<i>Penicillium canescens</i>	4,0 – 5,0	30	Nenhum	120	Budriene et al. (2005)
<i>Thermus sp.</i> T2	6,0 -10,0	70	Nenhum	550	Laedro et al. (2002)

1.3 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a purificação de proteínas tem sido um pré-requisito essencial para muitos dos avanços feitos na área de biotecnologia. A purificação de proteínas varia desde uma simples etapa de precipitação até processos de produção em larga escala. Na maioria dos casos, mais que um passo de purificação é necessário para atingir a pureza desejada. A chave para uma purificação de proteínas bem sucedida e eficiente é selecionar as técnicas mais adequadas, otimizando o desempenho para que se atenda às necessidades e combinando tudo de forma a maximizar o rendimento e minimizar o número de passos necessários (AMERSHAM, 2001).

As características dos sistemas biotecnológicos fazem com que a biosseparação se torne a parte mais onerosa da produção de biomateriais (SANTOS *et al*, 2002). Para que se tenha uma ideia, existem casos onde a etapa de *downstream* é responsável por 80% dos custos totais da produção (AMERSHAM, 2001). Por este motivo, existe uma necessidade mandatória de se estudar e desenvolver novas técnicas e procedimentos que sejam capazes de realizar biosseparações eficientes e, ao mesmo tempo, econômicas.

Nos últimos anos vê-se uma crescente pressão econômica na produção de produtos biotecnológicos. Desta forma, bioprocessos em geral, especialmente os processos de separação e recuperação (também denominados de *downstream processing*), enfrentam uma forte demanda na intensificação e integração dos passos processuais para aumentar o rendimento, reduzir o tempo de processo e cortar os custos e gastos excessivos de capital (CAMPOS, 2007). Nos Estados Unidos, o gasto no setor biotecnológico chega a US\$ 400 bilhões para produtos químicos e US\$ 800 bilhões para as indústrias alimentícias e mais de US\$ 1 trilhão nas indústrias de Biomateriais (Simon e Kotler, 2003).

A maioria dos esquemas de purificação envolve alguma forma de cromatografia. Primeiramente, devido à alta pureza que se pode conseguir empregando-se esta técnica, assim como também devido à versatilidade e grande aplicação que ela apresenta, o que é altamente vantajoso, em termos econômicos e práticos. Como resultado, esta se tornou uma ferramenta

essencial em cada laboratório onde a purificação de proteínas é necessária. Diferentes técnicas de cromatografia com seletividades diferentes podem formar combinações poderosas para a purificação de qualquer biomolécula.

A maioria dos protocolos de purificação requer mais do que um passo para atingir o desejado nível de pureza do produto. Isto inclui qualquer tipo de procedimento necessário para transferir o produto, em condições adequadas, a partir de uma técnica para realizar a próxima técnica. Cada etapa do processo causará alguma perda de produto. Por esse motivo, para alcançar os objetivos de rendimento e pureza, com o número mínimo de passos e da forma mais simples possível, não é aconselhável sobrepor várias etapas até que a pureza necessária seja alcançada. Ocasionalmente, quando uma amostra é prontamente disponível, esta pureza pode ser obtida simplesmente adicionando ou repetindo etapas. Contudo, a experiência mostra que, mesmo para as aplicações mais exigentes, alta pureza e rendimento podem ser obtidos eficientemente pouquíssimos passos de purificação, quando se toma uma técnica adequada e otimizada (AMERSHAM, 2001).

1.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Existem 3 etapas básicas em um processo de purificação de proteínas. Na fase de *captura*, os objetivos são isolar, concentrar e estabilizar o produto alvo. Durante a fase de *purificação intermediária*, o objetivo é remover a maioria das impurezas mais relevantes, tais como outras proteínas e ácidos nucleicos, endotoxinas e vírus. Na fase de *polimento*, o objetivo é obter elevado grau de pureza através da remoção de quaisquer vestígios restantes de impurezas ou substâncias afins (AMERSHAM, 2001).

A seleção e combinação ótima de técnicas de purificação para a captura, purificação intermediária e polimento são cruciais para garantir um desenvolvimento rápido do método, um tempo mais curto para a obtenção do produto puro e boa economia (AMERSHAM, 2001).

O processo de purificação final deve, idealmente, consistir da preparação da amostra, incluindo a extração e clarificação, quando necessárias, seguidas

dos três principais passos de purificação. O número de etapas dependerá sempre das exigências de pureza e da utilização pretendida para a proteína.

A cromatografia tem se destacado entre as muitas técnicas de purificação e, a adsorção em leito fixo, especificamente, encontra-se como uma das técnicas de mais amplo estudo pelo seu custo relativamente baixo e a praticidade e rendimento que o seu emprego pode trazer. A adsorção de biomoléculas em uma interface líquido-sólido é um fenômeno comum que tem sido amplamente utilizada em várias áreas como biologia, medicina, biotecnologia e processamento de alimentos (NAKANISHI et al., 2001). Especificamente em processos biotecnológicos, a adsorção tem sido utilizada como uma das etapas no processo de recuperação e purificação das mais diversas enzimas.

A cromatografia por adsorção em leito fixo se baseia na propriedade que alguns materiais (adsorventes) possuem de reter moléculas (adsorbato) sobre sua superfície. A busca de adsorventes com elevada capacidade de adsorção e elevada seletividade tem sido um grande desafio no desenvolvimento de processos de recuperação e purificação de bioprodutos. Vários adsorventes podem ser usados para este propósito e a escolha de uma deles depende de suas propriedades, como resistência mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico, hidrofílico, capacidade de adsorção e custo (VILLENEUVE et al., 2000).

Uma das maiores limitações desta técnica, porém, é a necessidade de algumas operações unitárias prévias, principalmente quando o material a ser purificado é advindo de processos fermentativos. A presença de vários contaminantes e materiais indesejados, como subprodutos e detritos celulares, é altamente prejudicial ao fluxo de operação e ao rendimento da técnica de purificação. Entupimento das colunas cromatográficas e competição pelos sítios de ligação do adsorvente (o que, por consequência, prejudica a capacidade de adsorção da resina) são exemplos de inconveniências que a presença desses materiais podem trazer. Por este motivo, antes de abordarmos as técnicas cromatográficas propriamente ditas, é necessário discorrer sobre duas etapas de *downstream* altamente relevantes e que serão ativamente empregadas neste trabalho: a precipitação proteica por sais e a diálise.

1.5 PRECIPITAÇÃO PROTEICA

Com o rompimento celular, etapa que será discutida mais adiante (seção 2.1.6) e que se faz necessária para a extração da enzima de interesse, o meio fermentativo acaba se tornando ainda mais contaminado com detritos celulares, organelas e outros componentes das células do micro-organismo utilizado na fermentação. Devido ao fato de esses contaminantes não serem eliminados na etapa de centrifugação, outras operações unitárias precisam ser empregadas com este fim, visto que a eficiência da adsorção e o rendimento da purificação podem ser altamente comprometidos na presença destes detritos. Isso ocorre porque alguns compostos presentes no meio também apresentam interações com o adsorvente, causando competição pelos sítios de adsorção na resina. Dentre tantos relatos na literatura a esse respeito, podemos destacar o de Pereira (1999), que relatou a interferência de polifenóis e de peptídeos de baixo peso molecular na adsorção de β -galactosidase em resinas trocadoras de ions. Também de origem fermentativa, as soluções foram submetidas a etapas de ultrafiltração para a eliminação destas impurezas.

Entre as técnicas utilizadas com este objetivo específico, encontramos a precipitação proteica por sais, com destaque para o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tal método se baseia nas diferenças de solubilidade que as proteínas apresentam em função da força iônica da solução. Os sais neutros têm efeitos profundos na solubilidade das proteínas globulares. Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas proteínas, um fenômeno denominado “solubilização por salificação”, ou, como comumente denominado, *salting-in*. Por outro lado, à medida que a força iônica é aumentada, a solubilidade da proteína se reduz gradativamente. Em forças iônicas suficientemente elevadas, uma proteína pode ser quase completamente precipitada de sua solução um efeito denominado “precipitação por salificação” ou *salting-out*. A concentração elevada de sais pode remover a água de hidratação das moléculas proteicas reduzindo, dessa maneira, sua solubilidade. A solução supersaturada de sal começa a consumir a água presente nas regiões hidrofóbicas das proteínas. Estas regiões, expostas, interagem entre si,

formando um aglomerado proteico. Com a aglutinação, a densidade do emaranhado de proteínas aumenta, e estas, por consequência, acabam precipitando. O sulfato de amônio é o preferido para esta precipitação devido sua elevada solubilidade em água, que lhe permite produzir forças iônicas elevadas.

O fracionamento com sulfato de amônio é usado sempre no início do processo de purificação. Este fracionamento não nos rende uma purificação muito alta, porém é extremamente útil na eliminações de impurezas que, certamente, terão efeitos sobre a adsorção.

1.6 DIÁLISE

Para a retirada dos sais de amônio empregados na etapa de precipitação proteica, uma nova operação unitária se faz necessária: a diálise da amostra. Embora outras técnicas possam ser empregadas com esse fim (gel filtração, por exemplo), a diálise é um método prático, simples e barato. É um processo de separação que combina a remoção de solutos da amostra com a introdução de um novo solvente (que pode ser, por exemplo, água) na amostra.

A membrana de diálise é a chave do processo. Esta é semipermeável, usualmente constituída por acetato de celulose e contém poros de tamanho conhecido que deixam os solutos de baixo peso molecular passarem, retendo os compostos de elevado peso molecular (como por exemplo proteínas e ácidos nucléicos). As membranas usadas em laboratório têm uma espessura de 12-30 μm , poros de diâmetro na ordem de Å , não deixando passar solutos maiores do que 15000 a 20000 Da (MARSHAK, 1996). A membrana deve garantir uma boa relação entre a difusão dos compostos de baixo peso molecular e a sua estrutura, de modo a que a separação seja o mais eficiente possível.

A solução a ser purificada, designada por alimentação ou retentato e que se encontra no estado líquido, contém solvente, solutos de baixa massa molecular e macromoléculas como por exemplo proteínas ou outro tipo de solutos. O retentato é a solução que é colocada dentro da membrana, ou seja,

no saco de diálise. A membrana possui a característica de ser microporosa, o que leva a que os solutos de baixo peso molecular consigam atravessar, ao contrário dos restantes constituintes do retentato. Do outro lado da membrana encontra-se o dialisado, que consiste numa quantidade enorme de solvente ou de um líquido relativamente ao retentato, onde está colocada a membrana e que não contém quaisquer tipos de solutos. A relação volume de retentato/volume de dialisado é um parâmetro importante a ter em conta, e é favorável ao processo que o volume do dialisado seja consideravelmente maior. Ocorre a difusão de solutos que conseguem permear a membrana do retentato para o dialisado devido à força motriz causada pela diferença de pressão osmótica da solução exterior e interior, ou seja, que existe nas duas interfaces da membrana. Não há transporte das macromoléculas, que devido ao seu tamanho não conseguem permear a membrana, ficando retidas na solução inicial de alimentação (DE CASTRO et al., 2008).

Simultaneamente, ocorre difusão de solvente para o interior da membrana (osmose), também devido à diferença de pressão osmótica. Quando se lida com uma amostra com elevada concentração de solutos ou de solvente orgânico na amostra, a osmose é o primeiro fenómeno a ocorrer na diálise antes da difusão do soluto, levando a um aumento considerável de volume do retentato nos instantes iniciais da diálise. Este é um processo que se realiza à pressão atmosférica (LUO et al., 2011).

Eventualmente, passado algum tempo do início da diálise, a concentração de solutos em ambos os lados equilibra, levando a que não exista diferença de pressão osmótica. A taxa de diálise abranda à medida que a concentração de solutos se aproxima do equilíbrio anteriormente referido. Este fenómeno leva a que a remoção completa dos solutos de uma amostra não ocorra apenas numa diálise, pois os compostos que se encontravam inicialmente dentro da membrana são distribuídos simultaneamente no solvente e no saco de diálise. Para resolver esta questão, troca-se o solvente que se encontra no exterior da membrana as vezes necessárias, para criar novamente diferença de pressão osmótica, até que a remoção do soluto atinja um valor aceitável. A agitação do dialisado é também uma solução muitas vezes aplicada para aumentar a taxa de diálise, e um sistema bem agitado pode atingir o equilíbrio a 90% em 2/3 horas

(SCOPES, 1994). A utilização de um volume maior no exterior da membrana é preferível a um volume pequeno como já referido, pois permitirá separar uma quantidade dos solutos que permeiam a membrana, reduzindo o número de trocas de solvente.

A Figura 1.2 representa bem o processo de separação que ocorre durante a diálise.

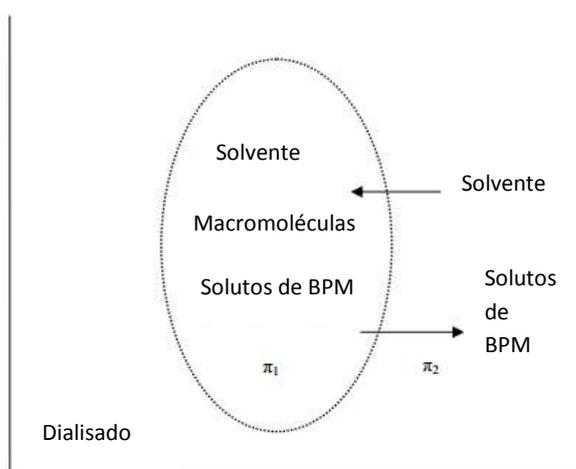


Figura 1.2 Esquema representativo de uma diálise (as setas que atravessam a membrana indicam o sentido do fluxo de solvente e solutos e a oval a tracejado a membrana de diálise). [BPM = Baixo Peso Molecular].

Uma das aplicações mais recorrentes da diálise a nível laboratorial é a purificação e a concentração de soluções que contêm proteínas, por exemplo na preparação de amostras. Apesar de ser um procedimento simples e uma rotina bem estudada, apresenta duas grandes questões que em muitos casos são situações desvantajosas: a necessidade de trocar de dialisado, e o fato de demorar várias horas até estar concluída e ser caracterizada por ser um processo com taxas de fluxo baixas em comparação com outros processos de separação com membranas. Esta última consideração pode ser importante em determinadas circunstâncias, como no caso em que as espécies a separar são sensíveis à degradação mecânica quando sujeitas a stress mecânico (HAGIYA

et al., 2005). O procedimento padrão que existe para uma diálise de proteínas é o seguinte: i) iniciar a diálise à temperatura ambiente durante duas horas; ii) trocar o dialisado e colocar a amostra a dialisar durante mais duas horas à mesma temperatura; iii) trocar o dialisado novamente e deixar a amostra a dialisar de noite à temperatura de 4°C o tempo necessário. Como se verifica neste protocolo, o tempo de operação de uma diálise pode ser muito elevado, e é uma variável que pode ser importante otimizar, de modo a que a diálise se torne cada vez mais vantajosa.

A temperatura à qual a diálise ocorre é outra variável importante do processo, e que afeta o coeficiente de difusão como já referido anteriormente. A temperatura é um parâmetro termodinâmico que afeta a difusão das moléculas, pois um aumento de temperatura significa um aumento de energia para o movimento livre das partículas, o que faz aumentar a sua difusão favorecendo o processo de diálise. A maior parte das diálises que envolve proteínas, porém, é efetuada à temperatura de 4°C para minimizar as perdas de atividade biológica e de modo a que as proteínas envolvidas não sofram desnaturação (ANONYMOUS, 2009).

1.7 CROMATOGRAFIA

1.7.1 Leito Fixo

O processo de adsorção de componentes de misturas fluidas através de colunas de leito fixo de materiais adsorventes porosos é uma das várias aplicações em Engenharia Química. Além de processos industriais, estes incluem processos cromatográficos para propósitos preparativos e analíticos. Industrialmente, um sistema de adsorção utiliza duas colunas. A primeira trabalha em um ciclo de adsorção e a segunda num ciclo de dessorção, seguido de uma regeneração do adsorvente. A regeneração é o tratamento que se emprega no adsorvente para remover o soluto adsorvido com vistas à realização de um novo ciclo de adsorção. Em adsorção em fase líquida, esta etapa geralmente consiste na passagem de um solvente químico (na maioria das vezes

de caráter básico) através do leito. A Figura 1.3 apresenta um sistema típico de adsorção industrial.

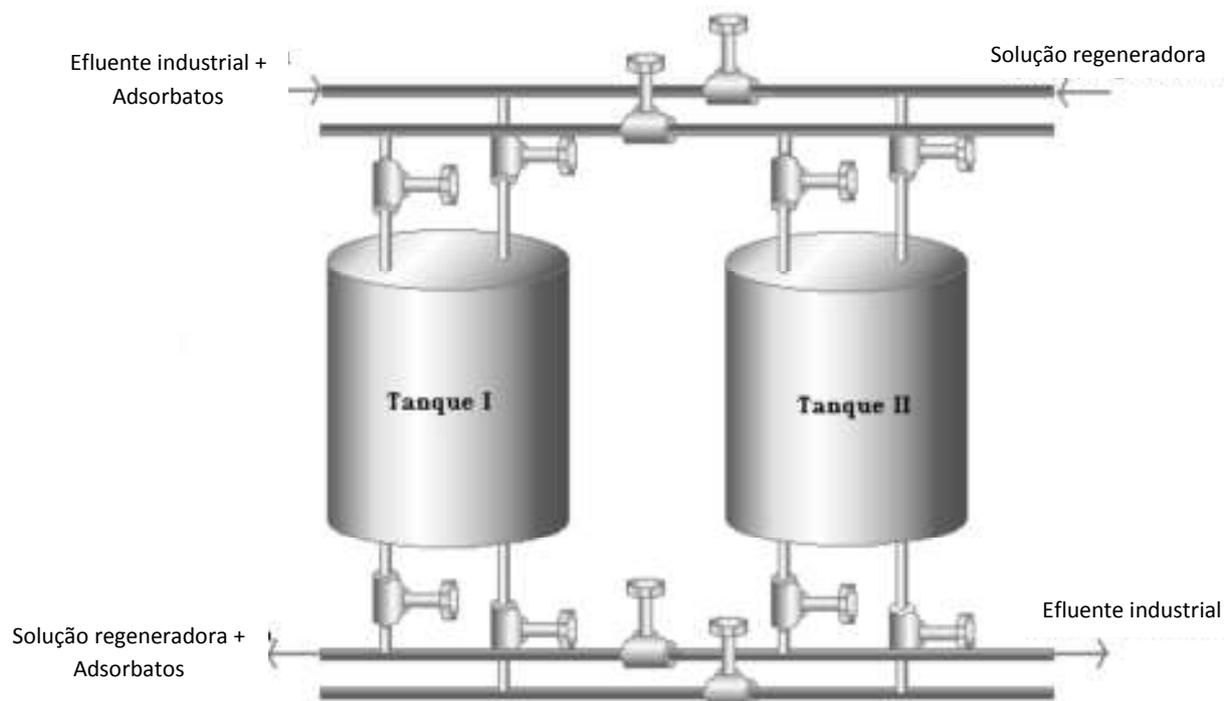


Figura 1.3 Sistema típico de adsorção industrial.

Um processo de adsorção em leito fixo geralmente envolve um ciclo constituído por etapas de carga (injeção de amostra), lavagem, eluição e regeneração. No primeiro estágio, a amostra entra em contato com a resina adsorvente, que é responsável pela adsorção do material de interesse (adsorbato) à superfície da mesma. Na etapa da lavagem a coluna de adsorção é alimentada com um tampão, que geralmente é o mesmo utilizado na etapa de injeção. Isso se faz necessário para que as frações de adsorbato não adsorvidas ou adsorvidas fracamente sejam carreadas para fora do sistema. Dependendo do tipo de cromatografia, a eluição pode ser conseguida com o aumento ou diminuição da concentração de sal no tampão, abaixamento de pH, eluição isocrática ou por aumento da concentração de algum agente competidor. O último passo é a etapa de regeneração, já explicada no parágrafo anterior.

A nível operacional, uma coluna de leito fixo possui um tempo de trabalho determinado pela sua capacidade de adsorver um determinado adsorbato, até que, à saída do efluente, verifique-se que a concentração é a mesma da entrada, o que indica que o adsorvente já não tem mais capacidade de adsorver material, atestando que o leito está completamente saturado. Este tempo de trabalho pode ser expresso mediante a denominada curva de *Breakthrough*, ou curva de ruptura, e está representada de acordo com a Figura 1.4.

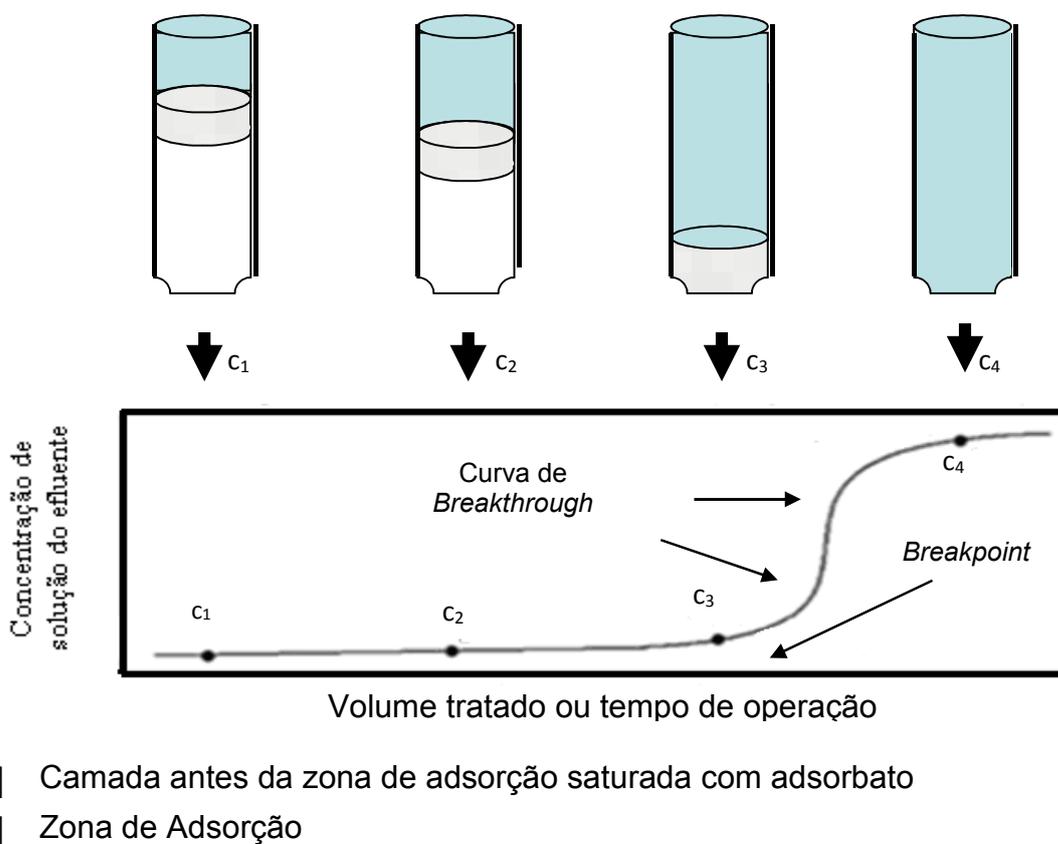


Figura 1.4 Representação de uma curva de “Breakthrough”

A solução passa através de uma camada de adsorvente inicialmente livre de adsorbato. A camada superior de adsorvente, em contato com o líquido contendo a proteína de interesse adsorve a biomolécula rapidamente e efetivamente. Neste instante de tempo, o efluente na camada de saída é praticamente livre de enzimas (ponto C_1). A parte superior da camada é

praticamente saturada e o volume de adsorção tem lugar sobre uma estreita faixa denominada *zona de adsorção* na qual a concentração muda rapidamente.

Conforme o líquido continua o fluxo, o comprimento da zona de adsorção se movimenta no sentido de cima para baixo, similar a uma onda, em uma taxa usualmente menor que a velocidade linear do líquido através do leito. Em algum instante de tempo, a metade do leito é saturada com o adsorbato, porém a concentração do efluente C_2 na saída ainda é praticamente zero.

Finalmente em C_3 a parte baixa da zona de adsorção tem alcançado o fundo do leito e já começa a se notar alguma concentração de proteínas. Diz-se que o leito atingiu seu *breakpoint*. A concentração do adsorbato no líquido efluente agora aumenta rapidamente porque a zona de adsorção passa através do fundo da coluna e em C_4 praticamente atinge o valor inicial C_0 . No ponto C_4 a coluna está praticamente saturada. A porção da curva entre C_3 e C_4 é denominada de curva de *breakthrough*. Pouca ou nenhuma adsorção acontece com o fluxo posterior de líquido através da coluna e, para propósitos práticos, atinge-se o equilíbrio.

1.7.2 Isoterma de Adsorção

A adsorção de uma substância presente em uma fase fluida na superfície de uma fase sólida, em um sistema específico, gera uma distribuição definida termodinamicamente entre estas fases, quando o equilíbrio é atingido. Uma maneira comum de descrever essa distribuição é expressar a quantidade de substância adsorvida por uma quantidade de adsorvente (q^*) como uma função da concentração de adsorbato (C) em solução. Uma expressão desse tipo é denominada *isoterma de adsorção*. A isoterma é feita a uma temperatura constante, visto que esse parâmetro afeta diretamente o fenômeno da adsorção.

As isotermas mais utilizadas atualmente para descrever o equilíbrio sólido-líquido das proteínas são as de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Essas isotermas têm permitido uma correta descrição dos dados experimentais em vários estudos envolvendo soluções diluídas de um componente fortemente adsorvido em um adsorvente puro (GUIOCHON *et al.*, 1994).

A isoterma de Langmuir consegue explicar de forma adequada os dados de adsorção adquiridos em concentrações baixas ou moderadas. Em altas concentrações, por outro lado, os coeficientes de atividade das espécies em soluções são dependentes da concentração, e dessa forma, desvios do modelo de Langmuir são observados. A derivação da isoterma de Langmuir pode ser considerada como a base da maioria dos tratamentos teóricos do fenômeno de adsorção. É importante frisar que essa isoterma corresponde a um modelo idealizado, que considera as seguintes hipóteses (GUIOCHON *et al.*, 1994):

- (1) As moléculas são adsorvidas em sítios discretos da superfície, denominados sítios de adsorção. Cada sítio pode acompanhar apenas uma única espécie;
- (2) A energia de cada sítio de adsorção da superfície é igual e independente da população de espécies adsorvidas. Portanto, todos os sítios têm entalpia de adsorção e independe do grau de cobertura da superfície;
- (3) A quantidade máxima da espécie adsorvida corresponde à formação da monocamada;
- (4) A adsorção é localizada e ocorre pela colisão das moléculas com sítios vagos da superfície;
- (5) A velocidade de dessorção depende apenas da quantidade de material adsorvido na superfície.

Para adsorção em fase líquida, a Equação 1.1 representa o modelo de Langmuir:

$$q^* = \frac{q_{max}kC_{eq}}{1+kC_{eq}} \quad (1.1)$$

em que q_{max} representa a capacidade máxima de saturação (mg/g), C_{eq} é a concentração de equilíbrio na fase fluida e k é a constante de dissociação de Langmuir (mL/mg), que está relacionada com a energia de adsorção.

Os parâmetros k e q_{max} são constantes que encerram significado físico. O parâmetro k representa a razão entre as constantes de velocidade de adsorção e dessorção, considerando a adsorção como uma pseudorreação reversível.

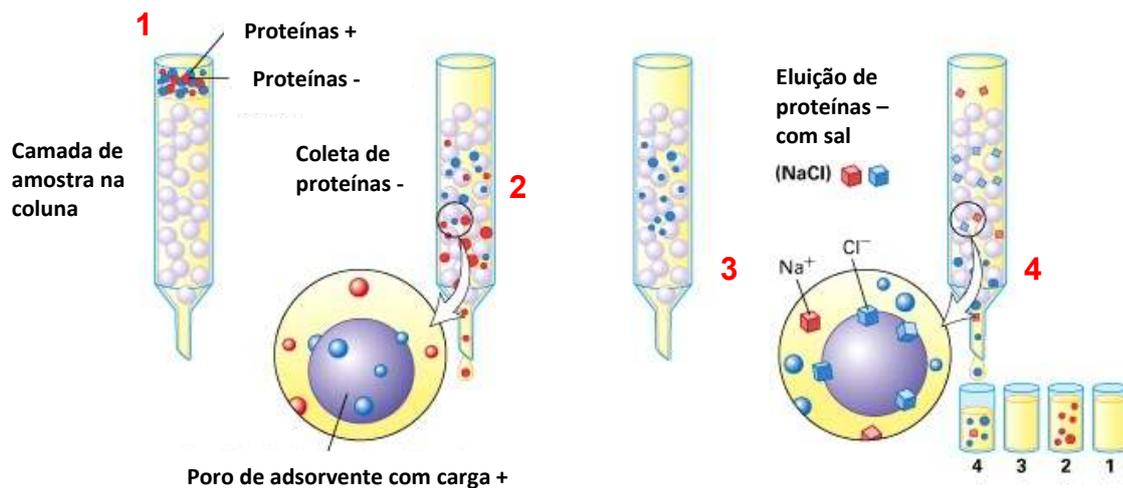
Altos valores de k indicam alta afinidade do sorbato pelos sítios do material adsorvente. O parâmetro $q_{máx}$ representa o número total de sítios ativos disponíveis no material adsorvente.

1.7.3 Cromatografia de Troca Iônica

A Cromatografia de Troca Iônica (CTI) é empregada usualmente em etapas iniciais de purificação, separando grupos de compostos baseados em suas cargas elétricas, sendo em geral necessárias outras etapas de purificação subsequentes. Ela é usada na separação de proteínas, baseando-se na carga da proteína que se deseja isolar. Se esta possuir carga positiva, a solução deve passar por uma coluna com carga negativa (impedindo, assim, a passagem de proteínas com carga positiva). O processo de purificação por troca iônica tem como objetivo a adsorção à matriz da proteína-alvo ou dos contaminantes, com posterior eluição (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

A nível bioquímico, o princípio básico da cromatografia de troca iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária. As moléculas de proteína têm em sua superfície grupamentos com cargas positivas e negativas. As cargas positivas são oriundas, sobretudo, dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e das aminas terminais, enquanto as cargas negativas são devidas ao ácido aspártico e glutâmico e aos grupamentos carboxílicos terminais (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

A Figura 1.5 a seguir mostra, de forma resumida, como ocorre a adsorção por troca iônica.



FONTE: Amersham Biosciences (2001)

Figura 1.5 Esquema simplificado da adsorção por cromatografia de troca iônica.

Em (1), uma amostra contendo uma proteína carregada positivamente e outra carregada negativamente é injetada na coluna contendo um adsorvente que está carregado positivamente. Naturalmente, a resina coletará as proteínas com carga negativa e deixará passar as de carga positiva (2). Para a desorção das proteínas que ficaram adsorvidas no adsorvente (3), é necessário injetar uma solução de eluição (neste caso, NaCl), que carregará as proteínas carregadas positivamente (4), completando assim o ciclo de separação.

De uma forma mais minuciosa, o primeiro estágio da cromatografia de troca iônica é estabelecer o equilíbrio do trocador iônico em termos de pH e força iônica, que permitirão sua ligação com as moléculas de soluto desejadas. Os grupos trocadores ficam associados com contra-íons, usualmente simples cátions ou ânions como cloreto ou sódio. O segundo estágio é a aplicação da amostra e sua subsequente adsorção. Nesta etapa, as moléculas de soluto carregadas com cargas apropriadas, deslocam os contra-íons e se ligam reversivelmente com a matriz. Substâncias não ligadas podem ser lavadas do leito trocador utilizando a fase móvel tamponante. No terceiro estágio, as substâncias são removidas da coluna por mudanças. Isso normalmente envolve o aumento da força iônica do tampão de eluição ou troca de pH. A desorção é alcançada pela introdução de um gradiente crescente de concentração salina e as moléculas do soluto são liberadas da coluna na ordem de suas forças de

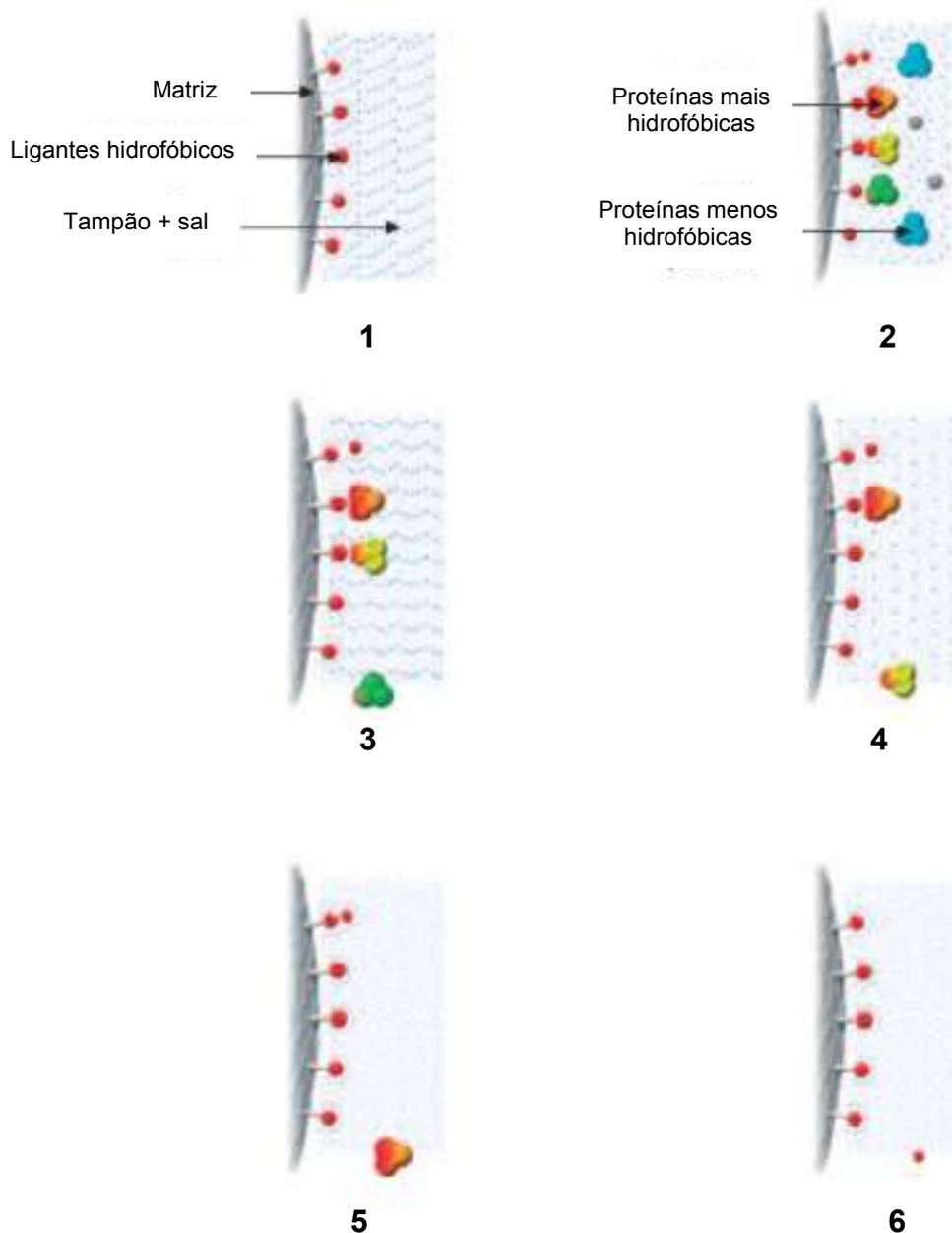
ligação. As moléculas fracamente ligadas são eluídas primeiro. O quarto e o quinto estágios são: remoção de substâncias não eluídas da coluna e o reestabelecimento do equilíbrio da coluna para as condições iniciais para a próxima purificação (AMERSHAM, 1997).

O ajuste do pH da solução tampão é muito importante no processo de adsorção de proteínas. O pH do tampão pode ser ajustado para favorecer a adsorção e eluição. O tampão deve ser escolhido de forma a causar pouca variação do pH e proporcionar a máxima adsorção. São comumente utilizados para adsorção de proteínas os tampões acetatos (pH 4,8 – 5,2), citratos (pH 4,2 – 5,2) e fosfatos (pH 6,7 – 7,6) (DENIZLI et al., 1999). Outras variáveis de influência destacada no processo de adsorção em geral é a força iônica do tampão e a concentração de sal no tampão de eluição.

1.7.4 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH) é amplamente utilizada na purificação de proteínas, como um complemento para outras técnicas que realizam separação por cargas (CTI), tamanho ou reconhecimento bioespecífico (cromatografia de afinidade). A técnica é um passo ideal após as amostras serem submetidas a precipitação com sulfato de amônio (frequentemente usado para a concentração inicial da amostra e *clean-up*, vide seção 1.5) ou após a separação por cromatografia de troca iônica. Em ambas as situações a amostra contém uma alta concentração de sal e pode ser aplicada diretamente sobre a coluna HIC com pouca ou nenhuma preparação adicional. O nível elevado de sal aumenta a interação entre os componentes hidrofóbicos da amostra e do ligante cromatográfico. Durante a separação, as amostras são purificadas e eluídas em volumes menores, concentrando a amostra de modo que esta possa seguir diretamente para filtração em gel, ou, após uma mudança de tampão, para uma separação por troca iônica. A CIH pode ser utilizada para captura, purificação intermediária, ou etapa de polimento de um protocolo de purificação.

A Figura 1.6 exemplifica bem como ocorre uma adsorção por interação hidrofóbica.



FONTE: Amersham Biosciences (2001)

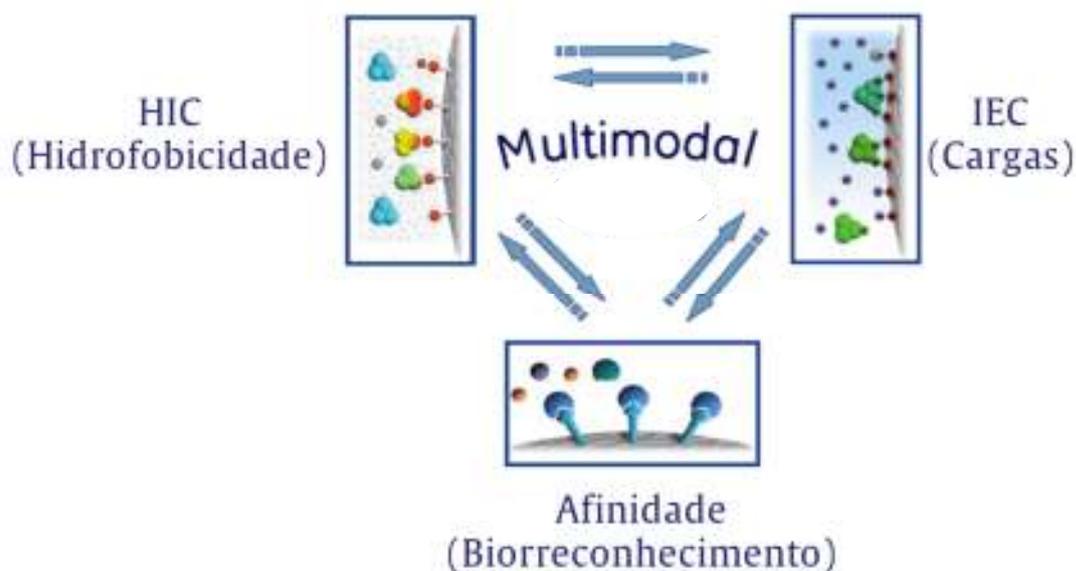
Figura 1.6 Esquema simplificado de separação por interação hidrofóbica

Primeiramente, o meio é equilibrado com o tampão de corrida contendo uma alta concentração de sal (1). Logo em seguida, a amostra é injetada na coluna (2). Neste estágio, o tampão de corrida faz com que as proteínas hidrofóbicas se liguem às partículas do adsorvente hidrofóbico, concentrando-as na coluna. Obviamente, proteínas com baixa hidrofobicidade eluem junto com o tampão ou logo na lavagem, após a injeção de amostra. Para a eluição (3, 4 e 5), começa-se a diminuir a concentração de sal na amostra. Neste exemplo,

todas as três proteínas interagem com a superfície hidrófoba do meio de HIC, mas, à medida que a força iônica do tampão vai sendo reduzida, a interação é invertida e a proteína com o menor grau de hidrofobicidade é eluída primeiro. A proteína mais hidrofóbica elui por último, exigindo uma maior redução na concentração de sal para reverter a interação. Por último (5), realiza-se uma lavagem com tampão sem sal para remover as possíveis proteínas que ainda estejam aderidas à superfície do adsorvente.

1.7.5 Cromatografia de Modo Misto

Tendo explicado os princípios de CTI e CIH, o entendimento do funcionamento da Cromatografia de Modo Misto (CMM) fica simplificado. Como o próprio nome já sugere, essa nova modalidade de cromatografia se utiliza de dois ou mais tipos de interação molecular para eliminar as desvantagens de cada técnica, quando aplicadas individualmente, e também para aumentar a capacidade de ligação entre o adsorvente e o adsorbato, visto que o emprego de uma única modalidade limita os rendimentos devido aos mais diversos meios de onde as proteínas são oriundas (Figura 1.7).



FONTE: Amersham Biosciences (2001)

Figura 1.7 Funcionamento dos ligantes multimodais.

A CMM confere seletividades únicas que não pode ser reproduzidas por cromatografias simples, como CTI. Ela também confere uma economia considerável nos custos de produção, longa vida-útil para as colunas cromatográficas, e grande flexibilidade de operação comparado com métodos de afinidade tradicionais (GE, 2005). É importante frisar, porém, que devido às propriedades multimodais destes ligantes, as condições de adsorção e eluição diferem daqueles ligantes tradicionais que se baseiam em um único modo de operação. Portanto, uma otimização destas condições é extremamente necessária por contribuir significativamente para a produtividade global e viabilidade econômica na etapa de captura. Com esse intuito, uma ferramenta bem eficiente de obtenção das melhores condições de operação pode ser utilizada: o Planejamento de Experimentos. Esta é uma técnica eficaz para a investigação do efeito de diversos parâmetros sobre a adsorção de proteínas, a fim de estabelecer um protocolo de com condições adequadas de trabalho. Outra vantagem de tal ferramenta é a possibilidade de prever, a partir de um modelo validado obtido no planejamento, a resposta de um experimento antes mesmo de realizá-lo, observando-se sempre a faixa limite das variáveis independentes estudadas no processo.

O desenvolvimento dos protocolos de operação para CMM pode representar uma carga pesada no desenvolvimento dos processos, pois um estudo de todos os parâmetros de todas as etapas é necessário para se atingir o potencial total da técnica. O desenvolvimento do método é, na maioria das vezes, complicado, imprevisível e pode exigir pesquisa intensiva para que se consiga a recuperação adequada devido à complexidade do mecanismo cromatográfico (WENGER e WOODLING, 2011).

1.7.3 O Adsorvente Capto MMC

O ligante Capto MMC, fabricado pela GE Life Sciences (Uppsala, Suécia) é um dos poucos adsorventes que operam em modo de cromatografia de modo misto. Por se tratar de uma resina nova, pouquíssimos estudos na literatura relatam seu uso. Podemos relatar os estudos de Nfor (2011) e Wenger (2010),

que a utilizaram na purificação das proteínas IgE e IgG, respectivamente. A Figura 1.8, em seguida, descreve sua estrutura.

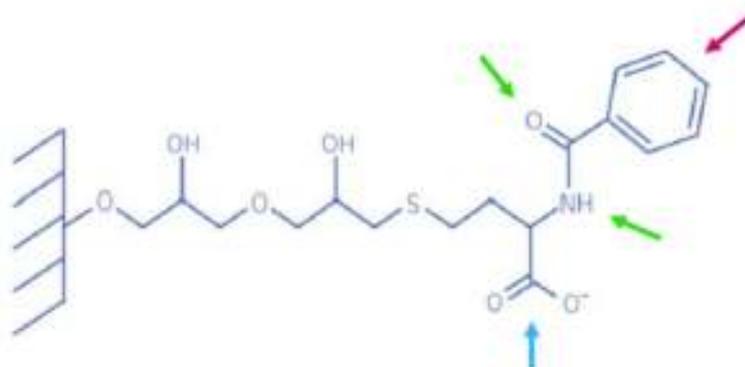


Figura 1.8 Estrutura da resina Canto MMC.

Este adsorvente apresenta duas características principais. Primeiro, por se tratar de um ligante multimodal, em sua matriz há a possibilidade de realização de interações iônicas (sítios com seta azul), hidrofóbicas (sítios com seta rosada) e pontes de hidrogênio (sítio com setas verdes). Isso aumenta consideravelmente o rendimento da adsorção, dada a possibilidade de ligações por três mecanismos distintos. A segunda propriedade diferencial da Canto MMC é a tolerância a altas concentrações de sal, ou seja, as ligações são independentes da condutividade do meio. Tal característica é especialmente útil no caso de materiais oriundos de meios com alta condutividade, minimizando assim a necessidade pré-tratamento do meio de alimentação. Ligantes tradicionais tem pouquíssima ou nenhuma eficiência quando operam sob essas condições.

A maioria das resinas de modo misto usados para aplicações na purificação de proteínas são funcionalizadas com ligantes expondo ambas as propriedades hidrofóbicas e eletrostáticas. A parte eletrostática pode afetar a adsorção a baixas e médias condutividades, enquanto a parte hidrofóbica influencia meios de médias e altas condutividades, alargando assim a gama de seletividade do adsorvente. A principal vantagem de resinas de modo misto é o intervalo mais amplo de seletividade que pode ser alcançado em uma única coluna em relação à IEC ou CIH. Assim, uma coluna cromatográfica operando em modo misto pode

potencialmente substituir dois etapas de um processo de purificação de proteína, com benefícios de custos evidentes (NFOR, 2011).

A Tabela 1.3 a seguir apresenta as características e propriedades principais do ligante Capto MMC.

Tabela 1.3 Propriedades da resina Capto MMC.

PROPRIEDADES	DESCRIÇÃO
Trocador de íon	Trocador multimodal
Estrutura da matriz	Agarose altamente reticulada
Capacidade iônica total	0,07-0,09 mmol H ⁺ /mL meio
Tamanho médio de partícula	75µm
Velocidade de fluxo	Mín. 600cm/h
Estabilidade de Ph	- Curto prazo: 2-14 - Longo prazo: 2-12
Temperatura de operação	4-30°C
Estabilidade química	- Todos os tampões aquosos usados comumente; - Ácido acético 1M; - NaOH 1M; - Ureia 8M; - HCl guanidina 6M; - Etanol a 70%; - Sensível a agentes oxidantes e detergentes catiônicos.

Fonte: GE Life Sciences (2006).

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

2.1 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A metodologia seguida para a obtenção da enzima, explicada detalhadamente nos itens a seguir, foi realizada com base nos procedimentos empregados por Freitas (2013). Este autor estudou a produção de β -galactosidase em soro de leite por *Kluyveromyces lactis* (Figura 2.1) e a sua imobilização em suportes à base de quitosana.

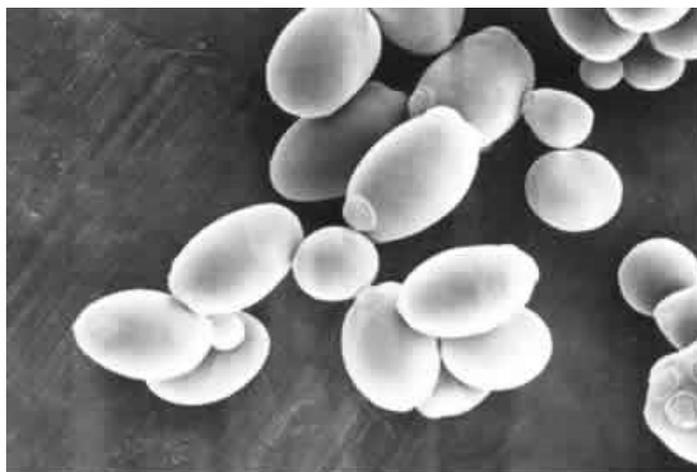


Figura 2.1. Aspectos morfológicos celulares da levedura *Kluyveromyces lactis*.

2.1.1 Materiais utilizados

A levedura *Kluyveromyces lactis*, dentre as estudadas no trabalho de Lima (2011), foi a que apresentou o maior consumo de lactose em meio sintético. Por esta razão, este foi o micro-organismo escolhido para a produção da enzima de interesse para este trabalho.

A espécie *K. lactis* NRRL Y1564 foi doada pelo USDA (United States Department of Agriculture) e pertence à coleção de cultura da ARS (Agricultural Research Service). A cultura estoque foi mantida em meio Agar YEPD (Yeast

Extract Peptone-Dextrose) sob refrigeração. A constituição do Agar encontra-se na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Constituição do Agar YEPD

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Agar bacteriológico	20 g/L

Soro de leite em pó, fornecido pela Indústria Alibra Ingredientes Ltda (Campinas-SP), foi utilizado na formulação do meio de propagação do inóculo e de fermentação para a produção da enzima β -galactosidase. Segundo as especificações técnicas do fabricante, a tabela 2.2 mostra composição do soro (por 100 g do produto):

Tabela 2.2 Composição e características do soro de leite (por 100 g)

Carboidratos totais	74 g
Proteínas	11 g
Gorduras totais	1 g
Gorduras saturadas	0,5 g
Colesterol	6,0 mg
Cálcio	800 mg
Ferro	0,9 mg
Sódio	1080 mg
pH	6,5
Acidez titulável máxima	2,5% (em ácido láctico)

2.1.2 Preparação do meio de cultura

O soro de leite foi submetido a um pré-tratamento ácido para a precipitação de proteínas não interessantes ao trabalho, que foi realizado de acordo com Santiago et al (2004) e Lima (2011). Inicialmente, diluiu-se o soro a uma

concentração de 50 g/L de lactose em água destilada e, logo após, submeteu-se essa solução a um aquecimento em chapa sob agitação até 85 °C. Ao atingir-se essa temperatura, ácido láctico comercial 50% foi adicionado até pH 4,8 e continuou-se aquecendo até 90 °C. Neste momento, o aquecimento e a agitação foram interrompidos e a solução, mantida em repouso por 15 minutos, para sedimentação das proteínas. O soro de leite foi filtrado em papel de filtro qualitativo, adicionado de 1 g/L de extrato de levedura (fonte de nitrogênio) e, finalmente, corrigiu-se o pH para 6,0 com KOH 4M. O soro foi, então, particionado em Erlenmeyers (50 mL por erlenmeyer) e estes, levados à autoclave a 115°C por 15 minutos. Assim, o soro estava pronto para ser usado tanto como meio de propagação quanto como meio de fermentação, como descritos nos itens 1.3 e 1.4 a seguir.

2.1.3 Preparo do inóculo

A cepa de *Kluyveromyces lactis* utilizada nesse estudo foi repicada em meio ágar YEPD (composição: ver Tabela 2.1) e incubada em estufa bacteriológica a 30 °C por 24h, para ativação. Após esse período, três alçadas das colônias de leveduras foram transferidas para os respectivos meios de propagação de inóculo e incubadas novamente a 30 °C, desta vez sob agitação a 180 rpm por 24 h. Após este período, a densidade ótica (DO) a 620 nm foi lida em espectrofotômetro, para assegurar que a absorbância estivesse sempre próxima a 1,0, o que, de acordo com a curva do micro-organismo construída previamente, asseguraria uma concentração de biomassa de aproximadamente 10 g/L de meio.

2.1.4 Fermentação

Prosseguia-se então para o ensaio do cultivo do micro-organismo em Erlenmeyers inoculando 10% (v/v) do volume de inóculo em 50 mL do meio de cultivo, descrito no item 1.2. As condições do ensaio foram as mesmas condições da propagação do inóculo (30 °C e 180 rpm), por um tempo de 14 h. Após o

término da fermentação, as amostras foram retiradas para análise de biomassa e determinação da atividade enzimática e concentração proteica.

2.1.5 Determinação da concentração celular

Após o crescimento do inóculo em meio de cultivo apropriado, retirou-se uma alíquota e determinou-se a densidade ótica (DO) a 620 nm em um espectrofotômetro (Spectronic Modelo Genesys, Série 20). Logo após, o valor foi convertido em gramas por litro, conforme a curva padrão do micro-organismo, construída em ensaios prévios.

2.1.6 Extração da enzima β -galactosidase

Por tratar-se de uma enzima intracelular, um rompimento para extração da enzima fez-se necessário. Freitas (2013) estudou métodos de extração enzimática, como emprego de banho ultrassônico, permeabilização por solventes e rompimento com pérolas de vidro. Este último mostrou-se bem mais eficiente frente aos demais, e, por isso, foi o método utilizado neste trabalho.

Para a realização deste procedimento, a amostra do caldo já fermentado foi centrifugada a 10.000g por 15 min a 4°C para obtenção da massa celular, lavada com água destilada e centrifugada novamente. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio pH 6,6 adicionado de 0,1 mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ e 0,2 mM de $MgCl_2$. De acordo com o estudo de Freitas (2013), a adição de sais de manganês e magnésio aumenta consideravelmente a atividade da enzima a ser produzida. Adicionou-se então o meio a tubos de centrifugas com cargas de pérolas de vidro e procedeu-se uma rotação em agitador do tipo Vortex por um período de 30 min, com intervalos de 2 min em banho de gelo a cada 5 min de processo.

2.1.7 Fluxograma de produção

A Figura 2.2 apresenta um fluxograma de produção que sucintamente resume os passos para a obtenção do caldo fermentado bruto.

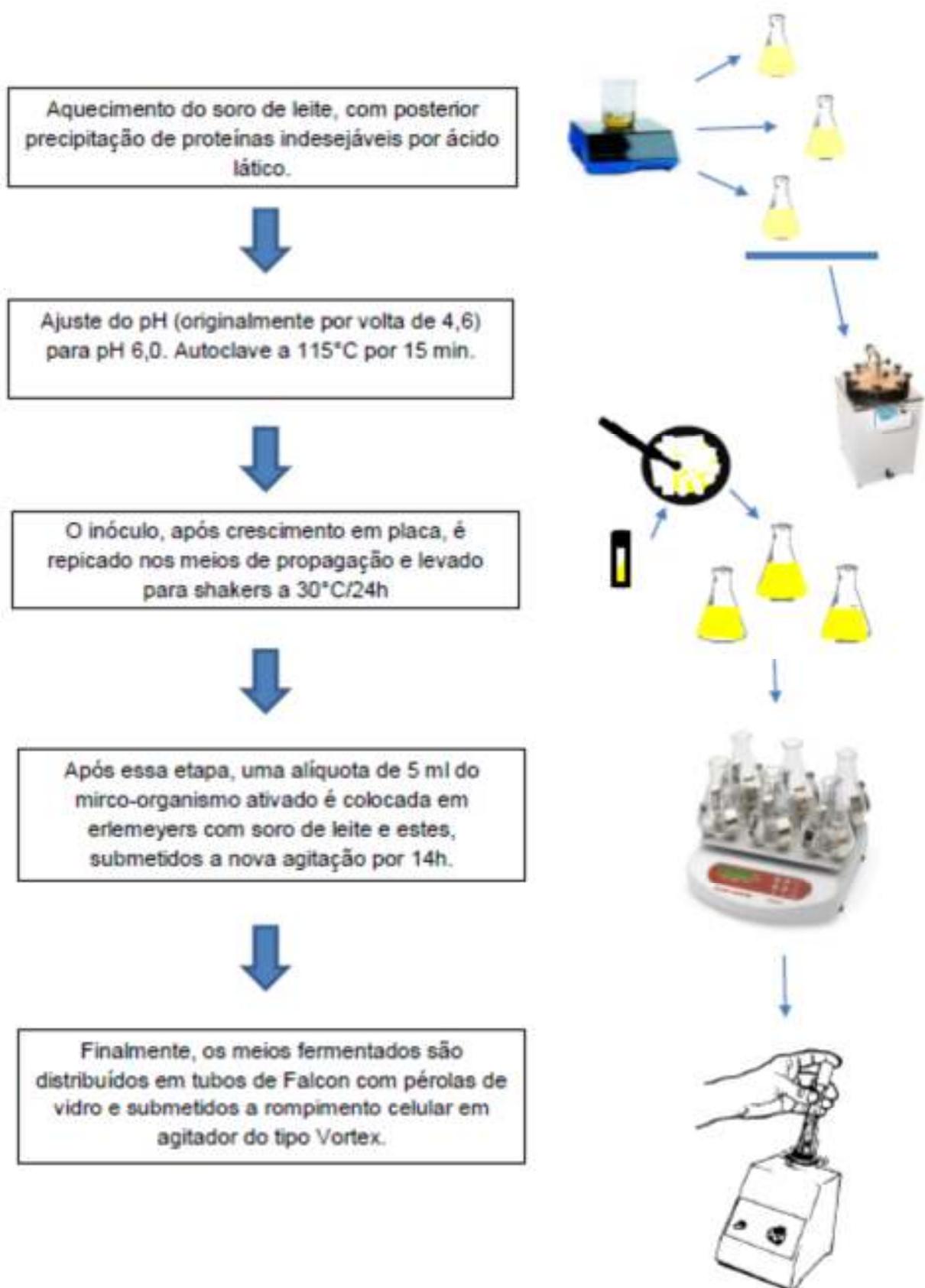


Figura 2.2 Fluxograma de produção de β -galactosidase por fermentação.

2.1.8 Medida da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Utilizou-se uma curva de calibração, tomando-se como padrão albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich). Como procedimento, uma alíquota de 0,1 mL de amostra foi colocada em contato com 1,0 mL do Reagente Coomassie Blue G-250, a 25 °C por 10 minutos. A absorbância foi medida a 595 nm utilizando um espectrofotômetro e, em seguida, obteve-se a concentração de proteína total em mg/mL de amostra.

2.1.9 Medida da atividade enzimática

A análise de atividade enzimática foi realizada por meio de hidrólise da lactose, com o auxílio do Kit Glicose Pap Liquiform (Labtest), que permite o cálculo do valor de atividade em U/mL a partir da identificação da glicose formada no meio reacional quando a enzima realiza a hidrólise da lactose, conforme o procedimento a seguir.

A análise consistiu em colocar 5 mL de uma solução de lactose 5% m/v em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,0, já previamente preparada, em banho maria por 10 min a 37 °C. Após este procedimento, uma alíquota de 150 µL desta solução foi retirada, acrescentada de 80 µL da enzima diluída a uma razão de 1:5 e novamente submetida à temperatura de 37 °C. Após 10 minutos, interrompeu-se a reação com a desnaturação da enzima pela adição de 150 µL de NaOH 1N. Por fim, triplicatas de 40 µL da solução obtida anteriormente foram acrescentadas a 2 mL do reagente colorimétrico disponível no Kit e levado ao banho maria ainda uma última vez, para o desenvolvimento da cor. Uma solução padrão de glicose com concentração conhecida, também disponibilizada pela Labtest no próprio Kit, foi submetida a esse último procedimento, para efeito de cálculos. A absorbância foi medida a 550 nm em espectrofotômetro. Os cálculos para a obtenção do valor de atividade enzimática foram feitos seguindo-se as equações 2.1 a 2.3.

O cálculo do Fator de Conversão (F_c) é dado por:

$$F_c = \frac{100}{A_{padr\tilde{a}o}} \quad (2.1)$$

Em que $A_{padr\tilde{a}o}$ é a absorbância da solução padrão de glicose. Para a concentração de glicose em mg/L, tem-se:

$$C_{glic} = \frac{Dil \times Abs \times F_c}{100} \quad (2.2)$$

Em que Dil é o fator de diluição da enzima e Abs é a média das absorbâncias das triplicatas da amostra.

Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de glicose por minuto. Pode-se então calcular a atividade enzimática, em unidades de atividade, de acordo com a equação 2.3 a seguir:

$$Ae = \frac{C_{glic} \times V_t \times 5,5}{t \times V_e} \quad (2.3)$$

Em que V_t é o volume total (5 mL), t o tempo de reação (10 min) e V_e o volume de enzima utilizado (0,08 L).

2.1.10 Eletroforese SDS-PAGE

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutora (SDS-PAGE) foi utilizada para determinação da pureza das frações enzimáticas do extrato bruto obtido logo após a lise celular e

da amostra efluente do leite fixo, tanto das soluções comerciais de β -galactosidase, quanto das oriundas de processo fermentativo, o que será detalhado em tópicos posteriores. Essa análise também é importante para a determinação da massa molecular das proteínas presentes em solução contendo a enzima de interesse, antes da utilização em testes de adsorção em coluna cromatográfica, bem como de frações coletadas durante a eluição das proteínas que estavam adsorvidas na resina, tanto de amostras previamente precipitadas quanto não precipitadas (vide *precipitação proteica*, item 3.1).

As análises foram realizadas no equipamento Mini Protean III (Bio Rad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 12,5% para o gel de corrida e de 7,5% para o gel de concentração. As diferentes soluções da enzima foram aquecidas a 100°C por 10 min e alíquotas de 10 a 15 μ L de cada amostra foram aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V e corrente de 50 A, em cubas verticais e a revelação foi realizada com nitrato de prata.

O marcador de ampla faixa utilizado (Novex Life Technologies) é constituído por proteínas modificadas que apresentavam pesos moleculares entre 10 e 220 kDa. O marcador continha as seguintes proteínas: fosforilase B, albumina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina e alfalactoalbumina.

A acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina de soro bovino (BSA), persulfato de amônio, N, N, N', N'- tetra-metilenodiamina (TEMED), glicerol e ditiotrietol, todos empregados nesta análise, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

2.2 ENSAIOS DE ADSORÇÃO COM SOLUÇÃO COMERCIAL DE β -GALACTOSIDASE

A segunda parte do trabalho focou no estudo da adsorção de β -galactosidase comercial obtida da Sigma Adrich. Utilizou-se o produto

Lactozyme 3000, que originalmente continha uma concentração de 12 mg/mL de enzima total, atividade total de aproximadamente 2500 U/mL e atividade específica 208 U/mg. A partir desta solução padrão, preparou-se todas as outras soluções utilizadas no desenvolvimento desta parte do trabalho.

2.2.1 Testes de Adsorção por Planejamento de Experimentos

Sabendo da influência que os parâmetros pH, força iônica do tampão fostato (FI) e concentração de sal (NaCl) no tampão apresentam sobre a adsorção (como já comentado na seção 1.7), e com o objetivo de se encontrar as melhores condições para o trabalho, testes preliminares de adsorção variando-se estes parâmetros foram realizados, todos a 25°C e sempre em duplicata, para assegurar a reprodutibilidade dos dados.

A Tabela 2.5, a seguir, mostra as condições de valor máximo, mínimo e o ponto central, para cada variável independente.

Tabela 2.3 Valores máximos, mínimos e pontos centrais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental para adsorção

	Valor máximo	Ponto central	Valor mínimo
pH	6,5	7,0	7,5
FI	25 mM	50 mM	100 mM
Sal	0 M	0,5 M	1,0 M

Para verificar a influência do pH no processo de adsorção, foram preparadas soluções de fosfato de potássio em pH 6,5, 7,0 e 7,5, visto ser essa a faixa de tamponamento do tampão empregado. Já para o estudo da influência da Força Iônica, utilizaram-se soluções a 25, 50 e 100mM de fosfato de potássio.

Em se tratando de uma resina que opera em modo misto, a concentração de sal no meio também foi avaliada, devido às prováveis influências que esta

parâmetro exerce sobre a adsorção, visto que a resina apresenta características multimodais de ligação à molécula alvo. Soluções com diferentes concentrações molares de NaCl (0; 0,5; 1,0 M) foram preparadas para este estudo, devido ao fato de que raramente concentrações maiores de sais são encontradas em amostras advindas de processos fermentativos. Vale também ressaltar que este parâmetro será doravante referido como SAL, para simplificação de nomenclaturas.

Uma vez fixados esses valores, o software STATISTICA v.10 apresenta uma planilha com 17 corridas (com um ponto central em triplicata, para validação de resultados). A tabela de combinações dos valores das variáveis está disponível na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Delineamento completo gerado pelo software Statistica v. 10 para as variáveis independentes do processo de adsorção.

EXP.	FI (mM)	pH	SAL (M)
01	50	6,5	0,0
02	150	6,5	0,0
03	50	6,5	1,0
04	150	6,5	1,0
05	50	7,5	0,0
06	150	7,5	0,0
07	50	7,5	1,0
08	150	7,5	1,0
09	100	6,2	0,50
10	100	7,8	0,50
11	100	7,0	0,0
12	100	7,0	1,34
13	15,9	7,0	0,50
14	184,1	7,0	0,50
15 (C)	100	7,0	0,50
16 (C)	100	7,0	0,50
17 (C)	100	7,0	0,50

Vale observar que o Software fornece alguns pontos em condições fora dos valores de máximo e mínimo delimitados nas condições escolhidas pelo autor.

Esse pontos axiais servem para o cálculo de extrapolação feito pelo próprio programa, para dar margem de confiabilidade aos resultados que se encontram já nos limites das condições estabelecidas (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

Seguindo a combinação de todos os parâmetros, em cada uma das condições descritas acima, 3 mL de cada amostra foram colocadas em contato com 50 mg de adsorvente (previamente equilibrado com tampão fosfato) e submetidas a uma agitação de aproximadamente 30 rpm a 25 °C por 3 horas (tempo que foi fixado por meio de ensaios prévios de cinética de adsorção). Alíquotas foram coletadas em tempos regulares e analisadas em espectrofotômetro a 280 nm em função dos valores de proteína total, para a obtenção do valor de quantidade adsorvida. O sistema utilizado durante os ensaios foi o agitador rotatório da TECNAL, modelo TE-165, conforme mostrado na Figura 2.4.



Figura 2.3 Sistema de agitação rotatória TECNAL, modelo TE-165, utilizado nos ensaios em batelada.

A quantidade adsorvida, que é a variável resposta do planejamento, (q^*) foi calculada por meio de um balanço de massa, sendo o balanço descrito pela Equação 2.4:

$$q^* = \frac{V_{sol}(C_0 - C_{eq})}{m_{ads}} \quad (2.4)$$

em que q^* é a quantidade adsorvida por grama de adsorvente (mg/g), C_{eq} a concentração de proteína total na fase líquida (mg/mL) em equilíbrio com q^* , C_0 é a concentração inicial na fase líquida (mg/mL), ou seja, anterior ao contato com o adsorvente fresco, m_{ads} é a massa de adsorvente seca (g) e V_{sol} é o volume da solução (mL) adicionada para o contato com o adsorvente.

2.2.2 Empacotamento da Coluna Cromatográfica e características do sistema

A Figura 2.4 ilustra o esquema de empacotamento da coluna com a resina Capto MMC.

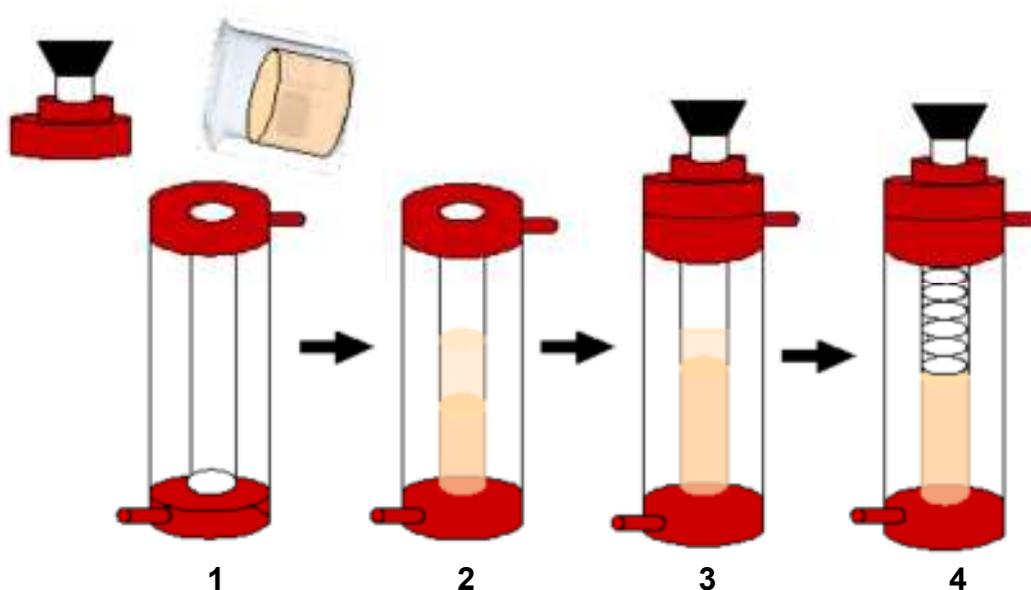


Figura 2.4 Empacotamento da coluna cromatográfica

Uma coluna de vidro GE C10/10 (10 cm de altura e 10 mm de diâmetro) foi preenchida com o adsorvente Capto MMC de acordo com o seguinte procedimento experimental: com o pistão montado apenas na extremidade inferior da coluna, foi medido o tamanho de todas as conexões utilizadas e o volume útil da coluna. Uma suspensão de aproximadamente 70 % (m/v) de adsorvente em água foi preparada e colocada aos poucos no interior da coluna com auxílio de uma espátula (1). A base superior da coluna, juntamente com o

pistão superior, foi colocada de forma a não comprimir a suspensão (2) ajustando-a até a altura desejada e deixando escoar o excesso de líquido no sistema (3). Fez-se passar água deionizada numa vazão de 1,0 mL/min através da coluna no sentido descendente por aproximadamente 1 hora para acomodar o recheio (4).

As características físicas e condições experimentais do leito são mostradas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Características do aparato experimental utilizado nas corridas cromatográficas em leito fixo.

PARÂMETRO	VALOR
Diâmetro da coluna (cm)	1,0
Altura da coluna (cm)	10,0
Altura do enchimento (cm)	1,77
Massa do adsorvente (g)	1,0
Volume do adsorvente (ml)	2,04
Temperatura (°C) de trabalho	25

2.2.3 Aparato e Condições Experimentais utilizados nos experimentos em leito fixo

Os ensaios de adsorção em leito fixo, para β -galactosidase comercial e produzida por fermentação, foram realizados utilizando o sistema mostrado na Figura 2.5.

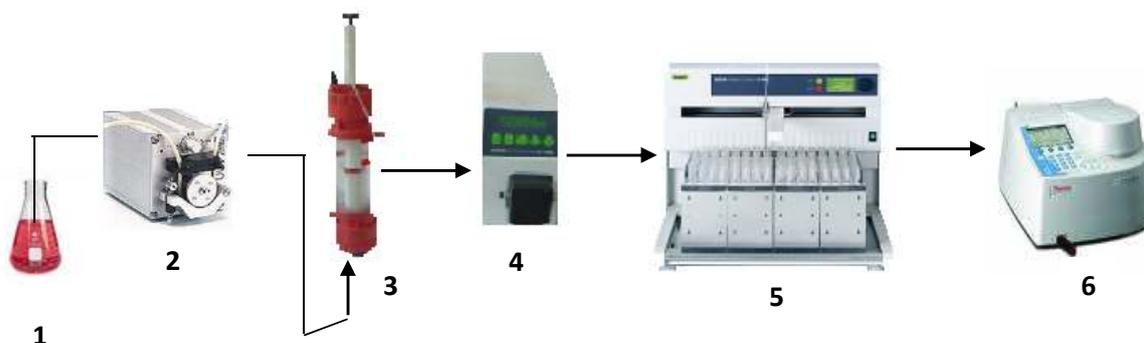


Figura 2.5 - Sistema utilizado para os ensaios de adsorção e dessorção em leito fixo: (1) solução de enzima, (2) bomba peristáltica, (3) Coluna de vidro (GE, Modelo C 10/10), (4) Detector UV/Visível, (5) Coletor de frações, (6) Espectrofotômetro Thermo Scientific – Biomate 3.

O sistema utilizado para realização dos experimentos é composto por uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Modelo Q 400), uma coluna de vidro (GE, Modelo C 10/10) com diâmetro de 1,0 cm, recheada com a resina multimodal Capto MMC, com massa de aproximadamente 1,0 g, um detector UV/Visível (Buchi, Modelo C-635), um coletor de frações (Buchi, Modelo C-660) e um espectrofotômetro.

Como procedimento padrão para os experimentos em leito fixo, temos: Com a coluna já empacotada, o sistema era sempre equilibrado com a passagem contínua da solução tampão, para condicionamento da resina. Após a estabilização do leito, começava-se a bombear a solução em sentido ascendente e nas concentrações previamente determinadas. Amostras eram coletadas, pelo coletor de frações, em volumes pré-determinados e em intervalos de 1 minuto, na maioria dos experimentos realizados. O detector UV/vis acoplado na saída da coluna monitorava o sinal de absorbância da solução tampão e das soluções a serem analisadas, quando das análises de caracterização hidrodinâmica do leito, detalhado nos tópicos seguintes. As alíquotas foram analisadas utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Na segunda etapa, após a passagem das soluções de β -galactosidase, era realizada a lavagem do sistema com a solução tampão até que a medida de absorbância voltasse à linha de base. Em seguida, a eluição era realizada com uma solução de NaCl, em concentrações variadas, dependendo do experimento. Por fim, a coluna era regenerada com KOH 1M, para o desprendimento de quaisquer frações enzimáticas que ainda se encontrassem adsorvidas nos poros do adsorvente e para reestabelecer a forma iônica da resina, e lavada com água em abundância, para a retirada da solução de regeneração. Deste modo, o sistema estava pronto para uma nova corrida.

2.2.4 Isotherma de Adsorção de Atividade e Concentração de β -galactosidase

As Isotermas de adsorção em resina trocadora de íons, tanto em função da atividade de β -galactosidase como de proteína total em solução, foram obtidas através de ensaios já em coluna cromatográfica, nas condições de adsorção selecionadas (tampão, pH e força iônica), obtidas anteriormente no Planejamento Experimental.

Para a realização deste experimento, uma massa de 1g de resina CAPTO MMC foi empacotada em uma coluna cromatográfica de vidro (GE HEALTHCARE) com 10 cm de altura e 10 mm de diâmetro. A resina, uma vez colocada na coluna, era equilibrada com tampão Fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5. Após esse condicionamento, 10 ml de soluções com concentrações de proteína total que variaram de 0,5 mg/mL a 0,1 mg/mL e atividades entre 250 e 800 U/mL foram injetadas com o auxílio de uma bomba peristáltica, a uma vazão de 0,5 mL/min.

Após este passo, determinaram-se os valores de atividade e concentração enzimática total nas amostras coletadas. Pela razão de concentração de saída e entrada (C/C_0), tanto de atividade quanto de proteína total, obtiveram-se as curvas de ruptura e, a partir delas, pode-se construir a isoterma de equilíbrio, expressando-se a capacidade do adsorvente (em mg de proteína por grama da resina, ou ainda em unidades de atividade da enzima por grama da resina) *versus* a concentração no líquido, C (mg de proteína por mL de solução, ou unidades de atividade por mL de solução).

As isotermas foram obtidas a partir da integração das curvas de *breakthrough*. Cada curva de *breakthrough* obtida em leito fixo forneceu um ponto da isoterma. Nestes experimentos, a quantidade adsorvida em equilíbrio com a concentração de entrada pode ser calculada através de um balanço de massa conforme se ilustra nas Figuras 2.6 e 2.7.

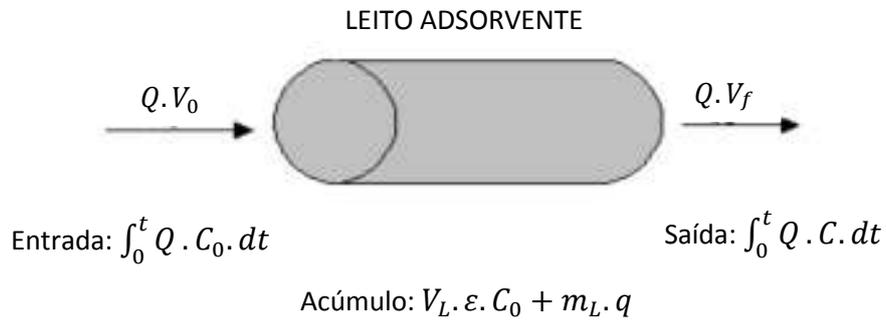


Figura 2.6 Diagrama esquemático de obtenção de uma curva de *breakthrough*

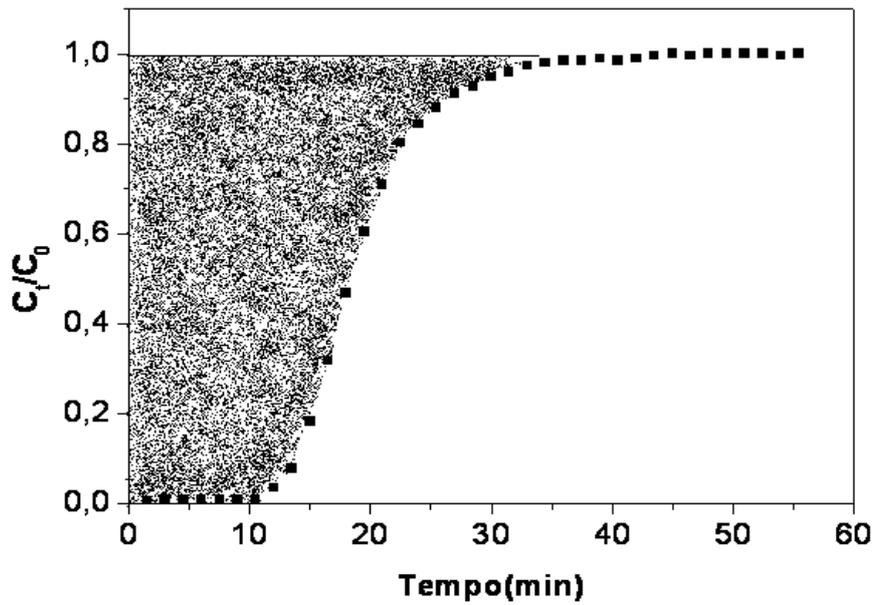


Figura 2.7 Ilustração de uma curva típica de *breakthrough*.

Rearranjando as equações da Figura 2.7, obteremos:

$$\int_0^{\infty} Q \cdot C_0 \cdot dt - \int_0^{\infty} Q \cdot C \cdot dt = V_L \cdot \epsilon \cdot C_0 + m_L \cdot q \quad (2.5)$$

Para o cálculo da capacidade de adsorção e excluindo-se volumes mortos, a Equação 2.5 foi reescrita como:

$$q = \frac{C_0}{m_L} \left[Q \cdot \int_{t_{morto}}^{\infty} \left(1 - \frac{C}{C_0} \right) \cdot dt \cdot V_L \cdot \varepsilon \right] \quad (2.6)$$

em que q é a quantidade adsorvida em mg por g do adsorvente (mg/g), Q é a vazão em mL/min, C_0 é a concentração inicial do adsorbato em mg/mL, m_L é a massa do adsorvente no leito, a integral de $\int_{t_{morto}}^{\infty} \left(1 - \frac{C}{C_0} \right) \cdot dt$ é a área hachurada demonstrada na Figura 2.7, ε é a porosidade do leito e V_L é o volume do leito preenchido.

2.2.5 Porosidade do Leito, Total e de Partícula

A caracterização hidrodinâmica do leito, com vistas à obtenção de parâmetros hidrodinâmicos é indispensável tanto para o cálculo das isotermas como também para a posterior modelagem matemática dos dados.

2.2.5.1 Porosidade do leito

Para o cálculo das porosidades do leito empacotado empregou-se a cromatografia em pulso, que se fundamenta no registro da concentração de um traçador à saída da coluna como resposta à injeção de uma certa quantidade à entrada da coluna sob uma determinada vazão do líquido de arraste (RAMOS, 2008). Para se determinar a porosidade do leito, utilizou-se o traçador azul-dextrana, de alto peso molecular (aprox. 2MDa), o que impedia a penetração deste nos poros da partícula, fazendo-o percorrer todo leito sem interagir quimicamente com o recheio ou se difundir em seus poros.

Primeiramente, foi necessário calcular o volume morto (V_m). Este volume diz respeito ao caminho de todas as tubulações e conexões existentes,

excetuando-se o leito, desde o injetor até a saída da coluna. Este volume é dado por:

$$V_m = Q \cdot t_m \quad (2.7)$$

em que Q é a vazão do fluido e t_m , o tempo morto. Entende-se como tempo morto o intervalo de tempo necessário para que uma dada porção de fluido percorra os trechos de um sistema cromatográfico que não fazem parte do leito adsorvente (tubulações antes e após a coluna, bombas, injetor, etc.).

Para a determinação desse parâmetro, foi empregada uma solução de acetona a 20%, que foi bombeada a uma vazão de 0,5 mL/min (na ausência da coluna) para que se pudesse observar o pulso de concentração no detector IR à saída do capilar. O tempo morto foi determinado com um cronômetro e o procedimento repetido por 3 vezes, para confirmar a repetitividade dos dados, pois, como já frisado anteriormente, esses valores não são somente importantes para o estudo da dinâmica em leito fixo, mas também essenciais para o cálculo de isothermas de equilíbrio.

Com V_m já conhecido, experimentos com a azul-dextrana foram realizados na coluna, desta vez, com o leito já empacotado. A quantidade de azul-dextrana 0,2% injetada em cada resina foi de 5 mL a uma vazão de 0,5 mL/min. A partir do tempo de retenção da azul dextrana (t_r) registrado pelo sistema de detecção IR, foi possível calcular o valor da porosidade do leito pela equação 2.8 a seguir:

$$t_r - t_m = \varepsilon \cdot \frac{V_c}{Q} \quad (2.8)$$

Sendo ε é a porosidade do leito, t_r o tempo de retenção e V_c o volume da coluna.

2.2.5.2 Cálculo da porosidade total (ε_T)

Para a determinação da porosidade total do leito, utilizou-se como traçador uma solução de acetona 20% v/v em água e realizaram-se experimentos de pulsos cromatográficos na resina empacotada. A quantidade de acetona 20%

injetada em cada resina foi de 5 mL a uma vazão de 0,5 mL/min. A partir do tempo de retenção da acetona (t_r) registrado pelo sistema de detecção IR e do tempo morto (t_m) já calculado anteriormente, foi possível obter o valor da porosidade total, conforme a equação 2.9 a seguir:

$$t_r - t_m = \varepsilon_T \cdot \frac{V_c}{Q} \quad (2.9)$$

2.2.5.3. Cálculo da porosidade da partícula (ε_p)

Por fim, para a determinação da porosidade da partícula utilizaram-se os valores obtidos da porosidade do leito (ε), pela injeção de azul-dextrana, e da porosidade total (ε_T), pela injeção de acetona 20%, e por meio da equação 2.10 a seguir, é possível obter o valor da porosidade da partícula da resina Capto MMC.

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (2.10)$$

2.2.6 Testes de eluição por Planejamento de Experimentos

O adsorvente multimodal Capto MMC, na maioria das vezes, requer condições de eluição diferentes das utilizadas em trocadores de íons tradicionais. Os motivos principais para tal exigência é a própria característica multimodal do adsorvente (que permite trabalhar em uma ampla faixa de pH e possibilita diferentes tipos de interações, como interações iônicas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) e sua tolerância a altas concentrações de sal no meio. Esses atributos favorecem bastante a etapa de adsorção, tendo em vista a possibilidade de se utilizar meios em condições extremas de condutividade sem a necessidade de tratamentos prévios, mas, por outro lado, dificultam consideravelmente a etapa de dessorção pelos mesmos motivos. O fato de a resina Capto MMC permitir a adsorção eficiente de proteínas em soluções de elevada condutividade, em muitos casos limita a utilidade do aumento da concentração de sal como única forma eficiente de eluição, o que exige um protocolo diferente para esta etapa, se comparado aos trocadores de íons

tradicionais (GE, 2011). Estivesse este trabalho empregando adsorção de troca iônica ou de interação hidrofóbica individualmente, as condições de eluição ótimas seriam, instintivamente, aquelas de menor adsorção observadas no primeiro planejamento experimental realizado. Porém, como ambos os fenômenos ocorrem simultaneamente, um novo planejamento tem de ser realizado, haja vista não se poder prever o comportamento da dessorção neste caso específico. Portanto, a eluição ideal será conseguida por uma combinação de alterações no pH, concentração de sal e força iônica do tampão de eluição, a exemplo da etapa de adsorção.

Em geral, três são os parâmetros cruciais a serem observados para que se obtenha uma efetiva eluição da proteína adsorvida: pH, concentração de sal no meio e força iônica do tampão. A Tabela 2.6, a seguir, mostra as condições de valor máximo, mínimo e o ponto central, para cada variável independente.

Tabela 2.6 Valores máximos, mínimos e pontos centrais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental para eluição.

	Valor máximo	Ponto central	Valor mínimo
pH	6,5	7,0	7,5
FI	25 mM	50 mM	75 mM
Conc. Sal	0,5 M	0,75 M	1,0 M

Uma vez fixados esses valores, o software STATISTICA v.10 apresenta uma planilha com 17 corridas (com um ponto central em triplicata, para validação de resultados) (Tabela 2.7). Realizaram-se então os 17 experimentos nas condições fornecidas pelo software. O procedimento experimental seguido segue como descrito posteriormente na seção 2.3.3, com a etapa de adsorção sendo interrompida imediatamente após o surgimento do *breakpoint*, momento onde as primeiras concentrações de proteína são identificadas na saída do aparato. Utilizou-se uma coluna de vidro GE, com 10 cm de altura e 10 mm de diâmetro empacotada com um volume de 2,04 mL (correspondente a uma massa de 1g) do adsorvente Capto MMC. O fluxo empregado foi de 0,5 mg/mL e a concentração enzimática foi de 0,4 mg/mL em todos os experimentos, devido ser

esse o valor encontrado nas amostras fermentativas, para que assim, pudéssemos obter resultados passivos de comparação.

Tabela 2.7 Delineamento completo gerado pelo software Statistica v. 10 para as variáveis independentes do processo de eluição.

EXP.	FI (mM)	pH	SAL (M)
01	25,0	6,5	0,50
02	25,0	6,5	1,00
03	25,0	7,5	0,50
04	25,0	7,5	1,00
05	75,0	6,5	0,50
06	75,0	6,5	1,00
07	75,0	7,5	0,50
08	75,0	7,5	1,00
09	7,95	7,0	0,75
10	92,0	7,0	0,75
11	50,0	6,2	0,75
12	50,0	7,8	0,75
13	50,0	7,0	0,33
14	50,0	7,0	1,17
15 (C)	50,0	7,0	0,75
16 (C)	50,0	7,0	0,75
17 (C)	50,0	7,0	0,75

A variável-resposta a ser obtida nesse ensaio é a *recuperação* que, neste trabalho, é entendida como a razão (em porcentagem) de concentração proteica e/ou atividade enzimática recuperada na etapa de eluição em relação à etapa de injeção.

2.3 PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ORIUNDA DE FERMENTAÇÃO POR CROMATOGRÁFIA DE MODO MISTO

Esta seção se propõe a estudar a adsorção, recuperação e purificação das soluções advindas do caldo fermentativo obtidos com os procedimentos já descritos anteriormente. Para isso, utilizaram-se as condições otimizadas de processos que foram obtidas ao longo da seção 2.2.

2.3.1 Precipitação Proteica

Ao extrato bruto, já livre de células por etapa de centrifugação, adicionou-se sulfato de amônio a 85% de saturação. O sal foi adicionado de forma progressiva, esperando a dissolução de cada fração e agitando sempre vagarosamente até a agregação das proteínas e que todo o soluto estivesse dissolvido. Cobriu-se o recipiente com filme de plástico e a solução foi armazenada na geladeira (8°C) durante 24 h. Posteriormente, submeteu-se a solução resultante a uma centrifugação a 12.000g por 30 minutos a 4°C, guardando o precipitado e o sobrenadante até a sua utilização. Ao analisar o sobrenadante, se ainda houvesse concentrações ou atividades significativas de enzima, um novo fracionamento era iniciado, a fim de se obter a quantidade máxima possível de enzimas na solução final.

Por fim, o precipitado foi ressuspensionado em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e este, submetido a uma dessalinização, realizada por membranas de diálise.

2.3.2 Diálise da solução enzimática

Nos ensaios experimentais de diálise das frações precipitadas, utilizou-se uma membrana da marca Sigma Aldrich, com diâmetro de 16 mm, largura de 25 mm, comprimento de 30 cm e corte de 12 a 14 kDa. A membrana foi aquecida numa solução com 2% de bicarbonato de sódio e 1mM de EDTA a 80°C durante 30 minutos, sendo de seguida lavada com água destilada. Foi guardada em água destilada a 4°C.

O dispositivo experimental consistia de um frasco que continha a membrana de diálise e o volume de dialisado, como é representado na Figura

2.10. Relativamente à membrana de diálise, amarrou-se uma das extremidades e colocou-se dentro desta 10 mL da solução a dialisar (retentato). Fechou-se, usando fio simples, a membrana com um nó, colocando-a de seguida dentro do frasco de diálise. Preencheu-se o máximo de volume do frasco de diálise com água destilada a 8°C, registrando o volume desta (aproximadamente 2 L).

A medição da condutividade foi utilizada para estimar o conteúdo de sal tanto no retentato como no dialisado após cada ensaio experimental, utilizando-se um condutímetro simples de laboratório. Deste modo, obtinha-se uma estimativa rápida da quantidade de sal, o que permitia verificar e controlar como estava evoluindo a difusão de sal do retentato para o dialisado.

A Figura 2.8, a seguir, ilustra o sistema de diálise utilizado.

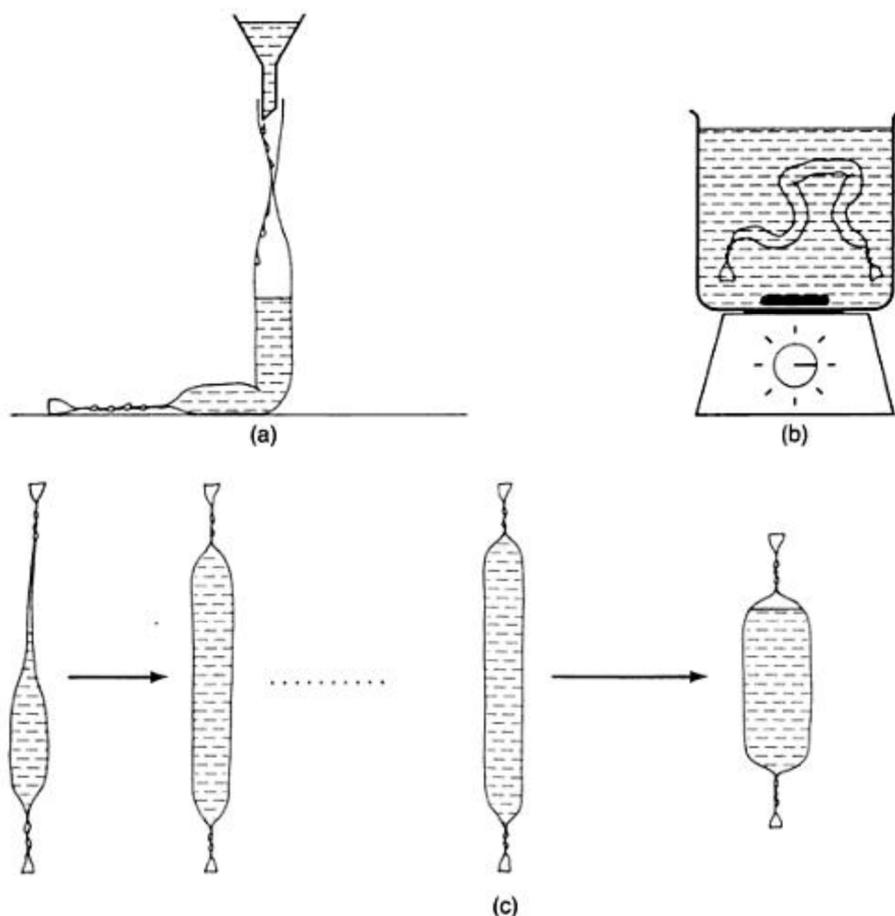


Figura 2.8 Esquema de diálise da solução advinda da precipitação proteica. (a) Enchimento da membrana de diálise (b) Agitação e constante troca da água (c) Aumento de volume devido à osmose que ocorre no sistema.

O procedimento padrão que se empregou na diálise de proteínas foi o seguinte: (1) iniciou-se a diálise à temperatura ambiente durante 2h; (2) Trocou-se o dialisado e colocou-se a amostra a ser dialisada por mais duas horas à mesma temperatura; (3) Trocou-se o dialisado novamente e deixou-se a amostra a dialisar em *overnight* à temperatura de 4°C. (4) Trocou-se a água do recipiente por tampão fosfato de potássio, para que, desta vez, os sais tamponantes migrassem da solução para a amostra, e deixou-se por mais 4h, finalizando-se assim o procedimento

2.3.3 Ensaio em coluna cromatográfica

Os ensaios cromatográficos com a β -galactosidase oriunda de meio fermentado, precipitado e dialisado foram realizados utilizando-se um aparato experimental como o já descrito na Figura 2.6. Primeiramente, a solução a ser estudada, com concentração e atividades iniciais conhecidas, foi alimentada na coluna empacotada com 1 g da resina Cpto MMC, a um fluxo constante de 0,5 mL/min, até que o *breakpoint* (momento onde as primeiras concentrações começaram a ser notadas na saída do sistema) fosse atingido. Isso foi realizado com o intuito de maximizar os valores de recuperação (tanto de atividade quanto de proteína total). Logo após, a resina foi lavada, para a retirada das frações proteicas não adsorvidas. Em seguida, realizou-se a eluição das proteínas com tampão fosfato de potássio, nas condições de dessorção ótimas encontradas nos experimentos de planejamento experimental. Por fim, a coluna foi regenerada com KOH 1,0M, para a retirada das possíveis frações enzimáticas ainda ligadas à superfície do adsorvente, garantindo assim a limpeza total do adsorvente e a possibilidade de se iniciar um novo ciclo de adsorção. As amostras estudadas foram: 1. Amostra antes da precipitação proteica e 2. Amostra após a precipitação proteica. As corridas foram realizadas em duplicata, para a validação e asseguarção da reprodutibilidade dos dados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Como já enfatizado no capítulo referente à Metodologia desse trabalho, a produção da lactase de interesse já havia sido estudada e otimizada anteriormente por Freitas (2013), o que já nos permite saber que os valores de concentração e atividade enzimática aqui encontrados seriam os melhores possíveis, dentro das condições empregadas.

Para o estudo realizado, foram necessárias 6 bateladas de fermentação e, ao final de cada uma delas, medidas de concentração de proteína total e atividade enzimática eram realizadas, segundo os procedimentos descritos na seção 2.1.8 e 2.1.9, do capítulo anterior.

A Tabela 3.1 descreve quantitativamente cada fermentação, quanto aos valores volume de extrato obtido (mL), concentração proteica (mg/mL), atividade enzimática total (U/mL) e atividade específica (U/mg). Como já definido na seção 2.1.9, uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de glicose por minuto. Assim, a atividade enzimática total, é calculada em unidades de atividade por mL. A atividade específica, por sua vez, é a atividade total em função da massa de proteína, obtida pela divisão da atividade enzimática pela concentração de proteínas totais.

Observando-se a Tabela 3.1 nota-se que, embora o volume tenha se mantido uniforme, é notável o decréscimo dos valores de concentração e atividade, especialmente nas últimas bateladas. Porém, desde o princípio, fixou-se o valor de concentração padrão para os ensaios cromatográficos em 0,4 mg/mL. Assim, em todas as análises, diluições do extrato eram realizadas com o objetivo de se padronizar os ensaios para esta concentração, sempre que possível. Vale salientar, ainda, que embora os valores de atividade enzimática e concentração tenham diminuído, a atividade específica do extrato permaneceu

consideravelmente constante, o que, de certa forma, pôde nos conferir uma razoável confiabilidade e reprodutibilidade de dados.

Tabela 3.1 Volume de extrato obtido, concentração e atividade de cada fermentação realizada.

Batelada	Volume de Extrato Obtido (mL)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	60	0,58	92	158,6
2	75	0,49	86	175,5
3	60	0,46	78	169,5
4	70	0,41	71	173,2
5	70	0,40	69	172,5
6	60	0,31	49	158,1

3.2 ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM SOLUÇÃO COMERCIAL DE β -GALACTOSIDASE

Os dados obtidos neste capítulo são de extrema importância para a comparação da performance de adsorção da resina Cpto MMC, quando frente a uma solução monocomponente comercial e a uma solução advinda diretamente de um processo fermentativo.

3.2.1 Caracterização do leito

A caracterização dos leitos foi realizada segundo método descrito no item 2.2.5. Com os valores do volume da coluna, tempo morto, tempo de retenção da azul dextrana e da acetona, foi possível realizar o cálculo da porosidade total, porosidade do leito e de partícula.

Os gráficos nas Figuras 3.1 e 3.2 a seguir mostram o perfil dos ensaios com os picos de azul dextrana e acetona, respectivamente. A Tabela 3.2, logo em

seguida, apresenta os valores medidos e calculados na caracterização do leito com a resina Capto MMC. O tempo de retenção (t_r) corresponde ao ponto onde observou-se o maior valor de absorvância.

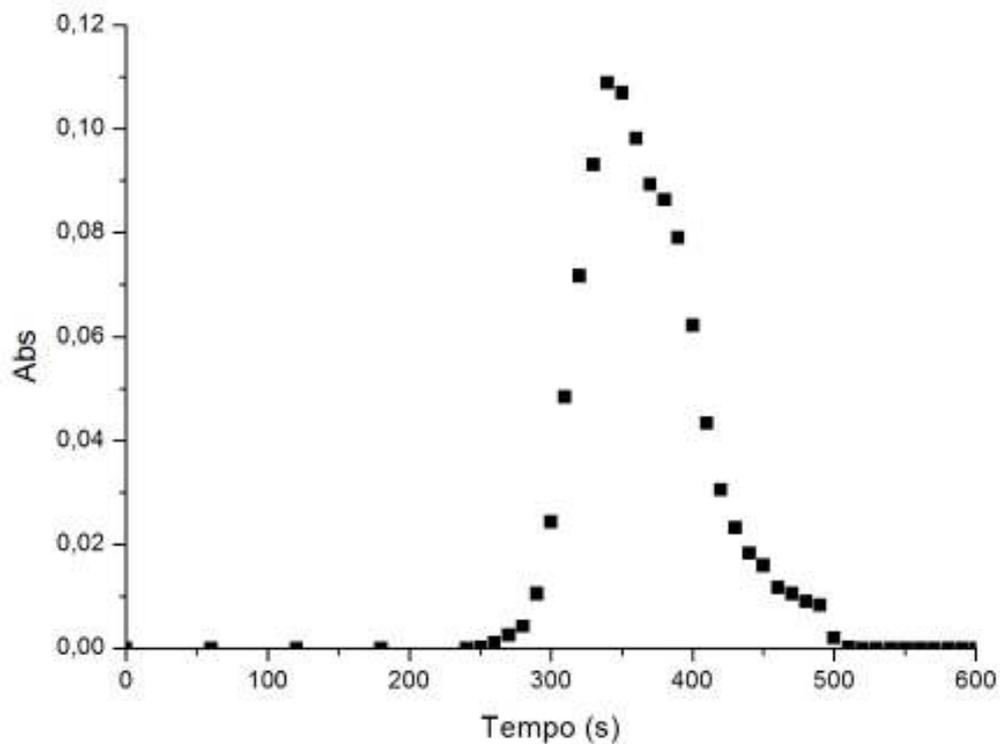


Figura 3.1 Perfil de retenção de Azul Dextrana para cálculos de parâmetros hidrodinâmicos

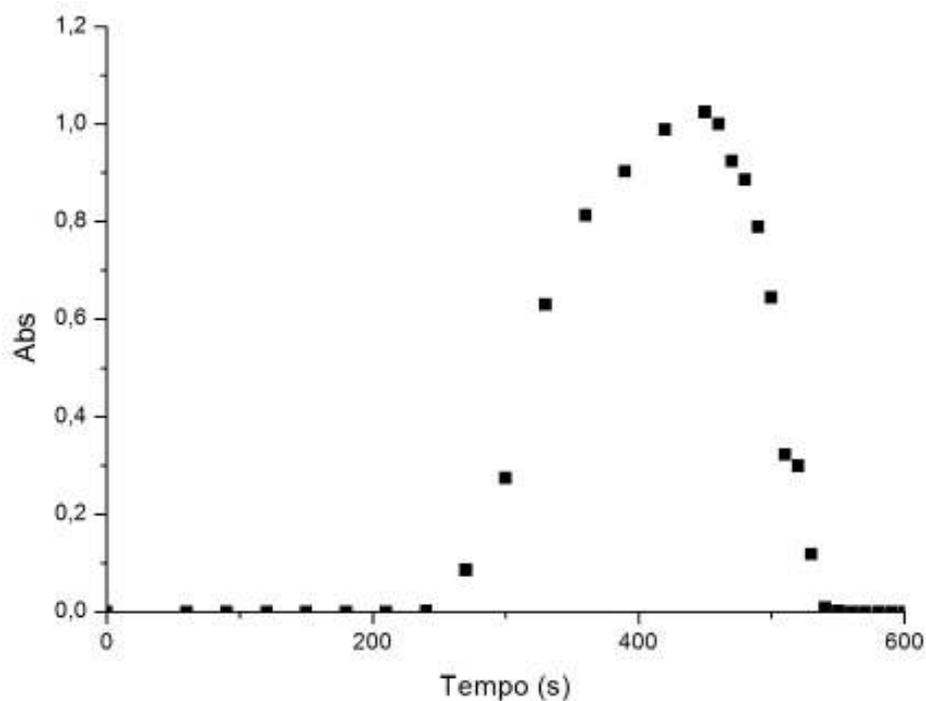


Figura 3.2 Perfil de retenção de Acetona para cálculos de parâmetros hidrodinâmicos

Tabela 3.2 Características hidrodinâmicas experimentais obtidas para o leito fixo utilizado nos experimentos.

Parâmetro	Valor
Tempo morto (sem as resinas)	240 s
Tempo médio de retenção da azul-dextrana	360 s
Tempo médio de retenção da acetona	430 s
Volume da coluna	2,04 mL
Porosidade do leito	0,39
Porosidade total	0,73
Porosidade de partícula	0,55

O valor de porosidade do leito que foi obtido é condizente, visto se tratar de um empacotamento manual. Muito raramente se encontram valores inferiores a 0,3 em empacotamentos desse tipo. Wenger (2010) obteve, para um leito empacotado com a mesma resina deste estudo, um valor de 0,38 para este parâmetro.

Os valores de caracterização dinâmica do leito são de extrema importância para os cálculos de q_{max} através da isoterma. Outra aplicação desses resultados é na modelagem matemática dos dados, com vistas a uma futura ampliação de escala do processo.

3.2.2 Testes de Adsorção por Planejamento Experimental

Para os testes de adsorção, estudou-se a influência dos três parâmetros mais importantes no fenômeno, que foram o pH, a concentração de sal no meio enzimático (SAL) e a força iônica do tampão fosfato (FI). A seguir, na tabela 3.3, segue o delineamento completo fornecido pelo programa STATISCA v.10, relacionando os três parâmetros supracitados, cada um em três condições diferentes, o que resultou em 17 condições experimentais, com um ponto central

em triplicata. A variável dependente (ou resposta) foi a quantidade adsorvida na resina (q), calculado pela equação 2.4.

Tabela 3.3 Resposta ao planejamento experimental de adsorção.

EXP.	FI (mM)	pH	SAL (M)	q (mg/g)
01	50,0	6,5	0,00	2,42
02	150,0	6,5	0,00	0,26
03	50,0	6,5	1,00	2,24
04	150,0	6,5	1,00	1,72
05	50,0	7,5	0,00	1,68
06	150,0	7,5	0,00	0,09
07	50,0	7,5	1,00	3,54
08	150,0	7,5	1,00	1,98
09	100,0	6,2	0,50	1,21
10	100,0	7,8	0,50	2,21
11	100,0	7,0	0,00	1,32
12	100,0	7,0	1,34	3,22
13	15,9	7,0	0,50	2,88
14	184,1	7,0	0,50	0,99
15 (C)	100,0	7,0	0,50	2,28
16 (C)	100,0	7,0	0,50	2,41
17(C)	100,0	7,0	0,50	2,33

Observou-se uma variação considerável nos valores de valor q entre as condições estudadas, o que já nos dá uma ideia da importância real deste estudo. Os valores de q variaram desde 0,09 (no ponto 6) até 3,54 (na condição 7).

O gráfico a seguir, denominado Diagrama de Pareto (Figura 3.3), também cedido pelo Software após a inserção dos resultados, que mostra as variáveis que apresentam real influência na etapa de adsorção, ao nível de 90% de significância.

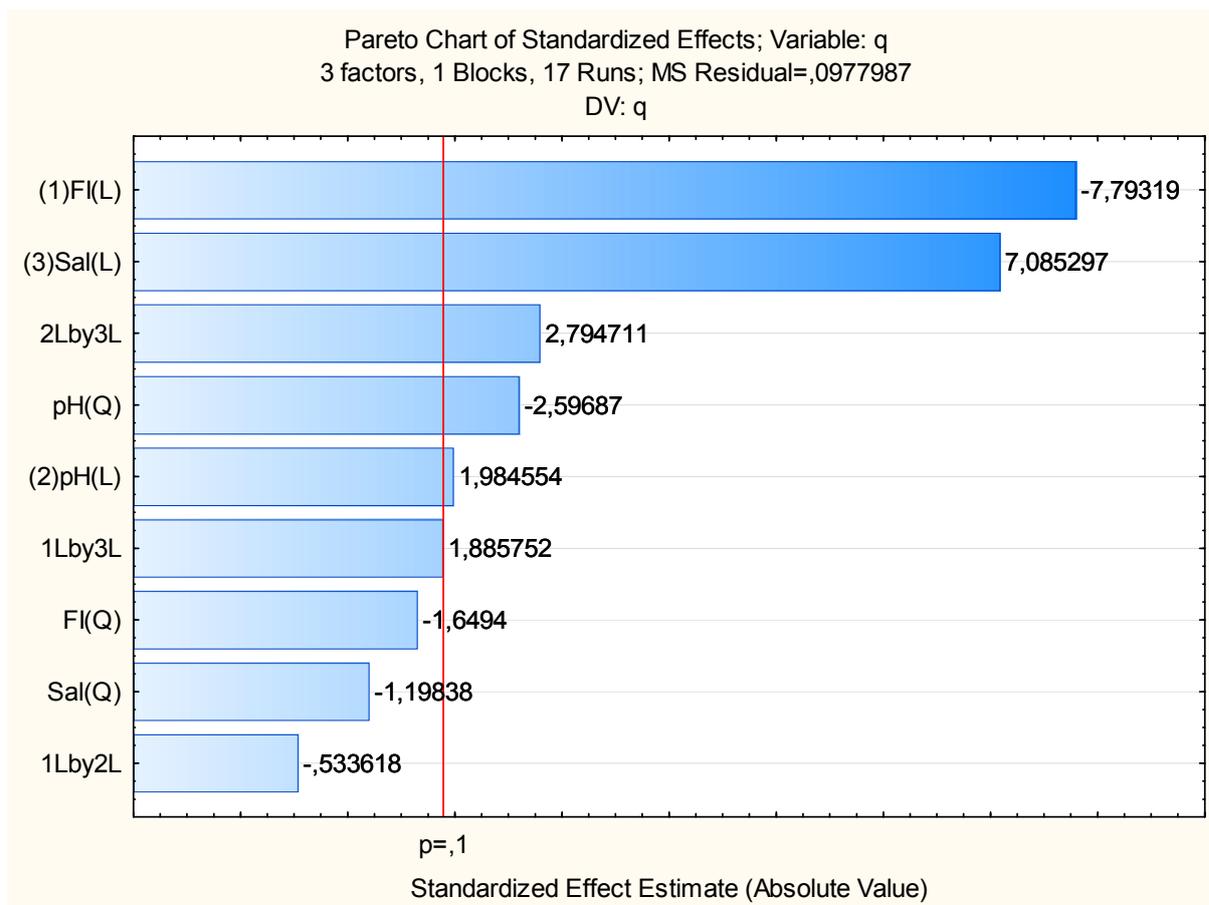


Figura 3.3 Diagrama de Pareto para os experimentos de adsorção.

Todos os parâmetros que ultrapassam a linha do valor de $p = 10\%$ apresentam variáveis que influenciam significativamente o valor de q na etapa de adsorção. Observa-se que todas as variáveis lineares estudadas (pH, Sal e FI) têm influência significativa no estudo. Também apresentam alguma influência o pH quadrático e a interação entre FI e Sal.

A Tabela A1, disponível no anexo ao final desta dissertação, descreve os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, apresentando os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a resposta de valor q . Para a resposta analisada, as variáveis que apresentaram significância a nível de 10% encontram-se destacadas em negrito.

Os modelos de regressão obtidos para o valor q , utilizando-se dos dados fornecidos pelo software, podem ser definidos pelas equações encontradas na

Tabela 3.4. A grande importância de modelos como esses é a de, uma vez validado estatisticamente, nos permitir conhecer o valor da variável resposta (neste caso, q), dado quaisquer condições dentro do intervalo estudado, antes mesmo de realizar o experimento. Esta predição é altamente relevante na otimização de análises laboratoriais (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

Tabela 3.4 Modelos de regressão do valor q

pH	Modelo	
6,5	$z = 0,01x - 0,0001x^2 + 0,4y - 0,55y^2 + 0,0083xy + 3,68$	(3.1)
7,0	$z = - 0,09x - 0,0001x^2 + 0,9 y - 1,55y^2 + 0,0083xy + 2,32$	(3.2)
7,5	$z = 0,01*x - 0,0001x^2 - 1,8y - 0,55y^2 + 0,0083xy + 2,39$	(3.3)

em que x é Força iônica do tampão, y = Concentração de sal e $z = q$.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.5), o valor do número de Fischer (F) calculado para os modelos de valor q na etapa de adsorção foi de 15,28, ou seja, bem maior do que o valor de $F_{9,7,10\%}$ tabelado, que é de 2,78. Assim sendo, o modelo obtido pode ser considerado estatisticamente significativo e, conseqüentemente, válido para descrever o estudo desenvolvido.

Tabela 3.5 Análise de variância das variáveis estudadas na adsorção

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	P-valor
Regressão	13.45169	9	1,49457	15,28	10%
Residual	0,68459	7	0,0978		
Total	14,13718	16			
F_{tab} (90%)				2,72	

Por fim, pode-se plotar a superfície de resposta (Figuras 3.4, 3.5 e 3.6) para o valor q nos três pH estudados (6,0, 7,0 e 7,5) correlacionando a força iônica do tampão e a concentração de sal no meio submetido à adsorção.

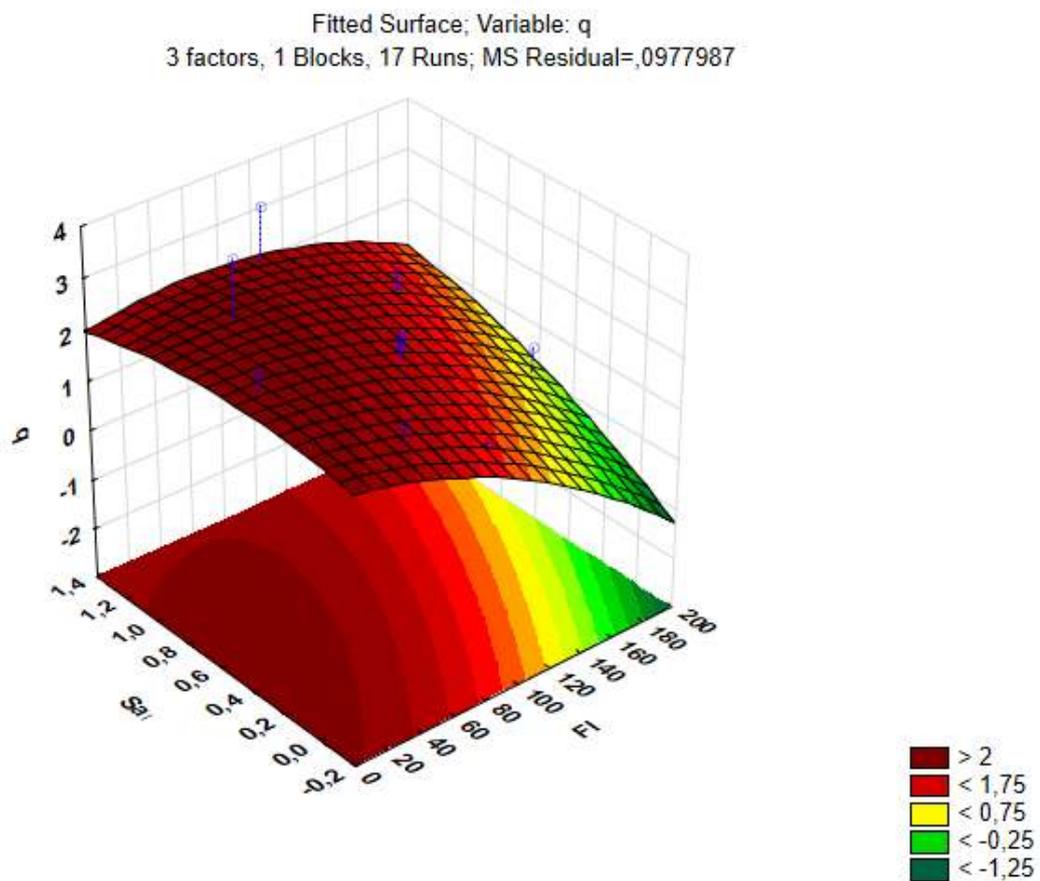


Figura 3.4 Superfície de resposta para adsorção em pH 6,5

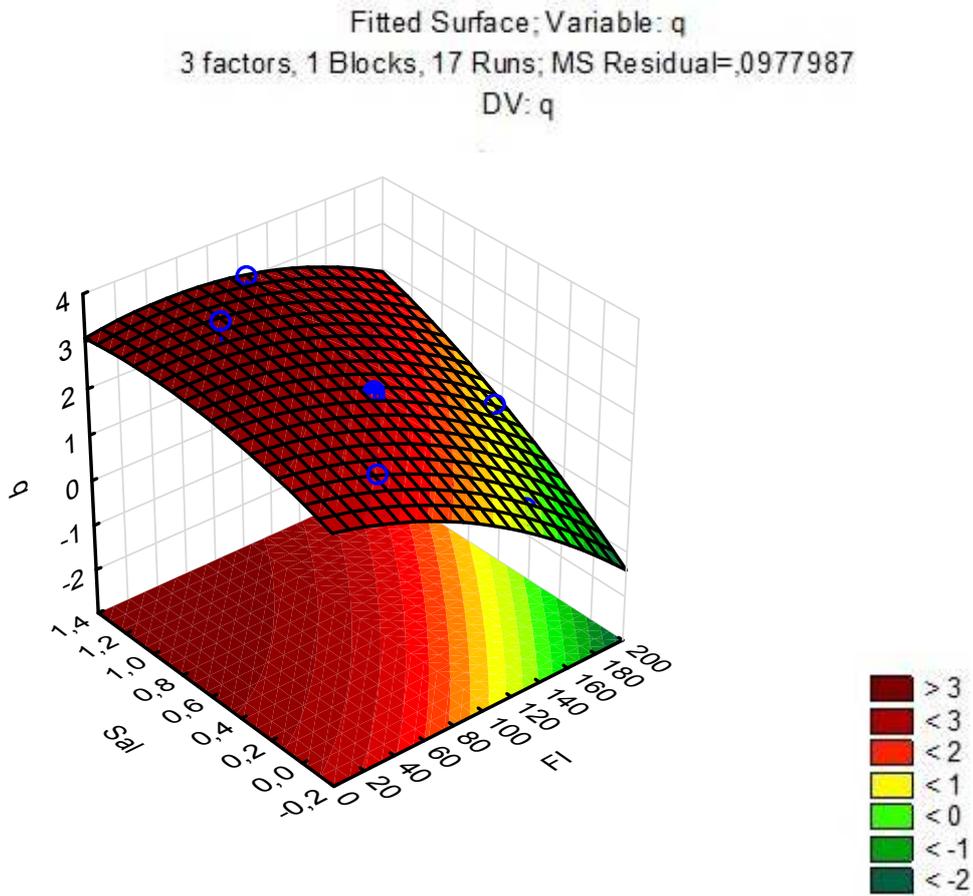


Figura 3.5 Superfície de resposta para adsorção em pH 7,0

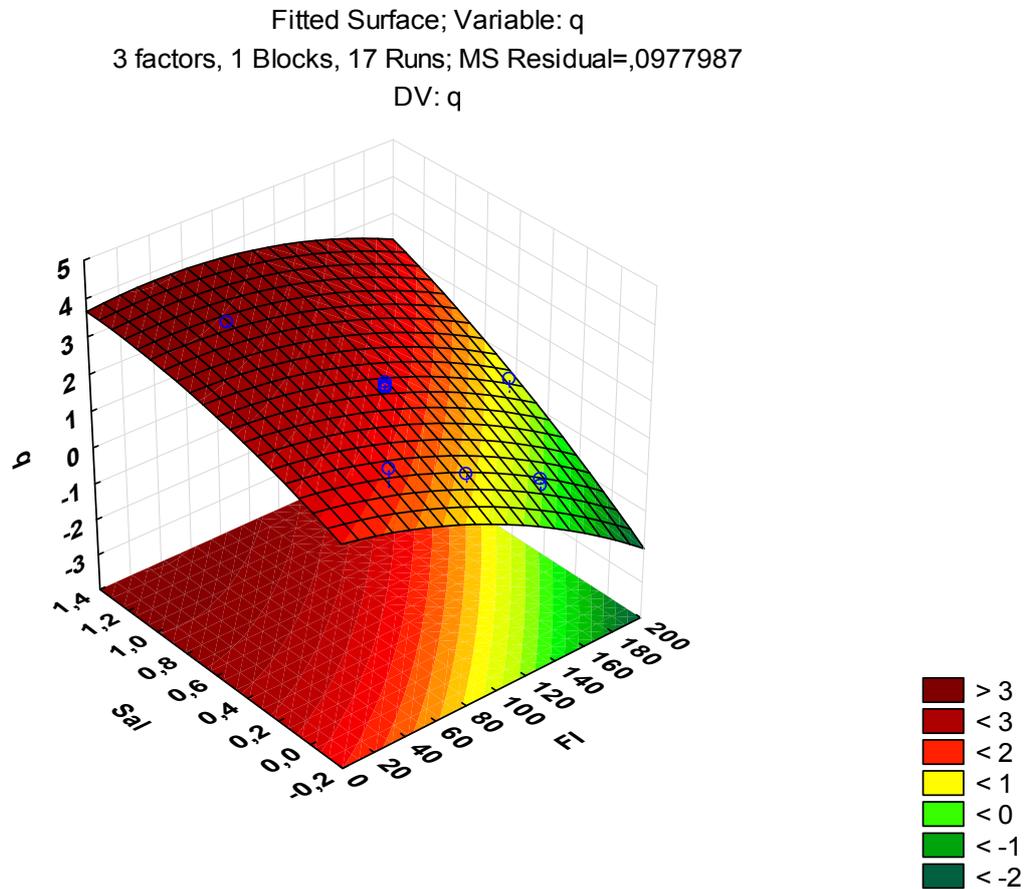


Figura 3.6 Superfície de resposta para adsorção em pH 7,5

Como as superfícies de resposta apresentam uma região bem definida para o máximo valor de q , as condições ótimas para a adsorção foram encontradas através da determinação do ponto crítico (onde a derivada da equação é igual a zero). Observa-se que as melhores condições estão sob os pH 7,0 e 7,5, visto que nestes, os valores de q são maiores que 3,0.

Observa-se também, por meios dos gráficos de superfície de resposta, que menores valores de Força Iônica do tampão são mais eficazes na adsorção, fato que pode ser comprovado no Diagrama de Pareto, onde este parâmetro linear apresenta valor negativo.

Quanto ao parâmetro concentração de sal, maiores valores nos dão melhores resultados. Isso já era esperado, visto se tratar de resina de Cromatografia de Modo Misto, onde o adsorbato tem sua adsorção melhorada em presença de sal devido a possibilidade de interações hidrofóbicas (além de interações iônicas) com o adsorvente. Neste tipo de interação, a presença de sal expõe as frações hidrofóbicas da proteína que se liga mais eficientemente ao adsorvente, fomentando os resultados aqui encontrados.

Assim sendo, dentro desses parâmetros, para o pH 7,0, a força iônica do tampão de adsorção deverá ser de 50 mM e a concentração de sal no meio de 1,0 M.

3.2.3 Isoterma de adsorção de proteína total e atividade

Para a obtenção da isoterma de adsorção a 25 °C, foram obtidas as curvas de *breakthrough* para as concentrações 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1 mg/mL e para as atividades de 800, 600, 400, 300 e 250 U/mL, respectivamente. As concentrações foram escolhidas por estarem dentro da faixa daquelas já encontradas no extrato bruto proveniente do processo fermentativo, para que os resultados se aproximassem ao máximo dos valores a serem possivelmente encontrados posteriormente na amostra advinda da fermentação. Já as atividades são as obtidas na amostra comercial correspondentes a estas concentrações. Utilizaram-se as mesmas condições ótimas obtidas na etapa de Planejamento Experimental para adsorção.

As curvas de *breakthrough* de concentração de proteína total obtidas em cada ensaio foram compiladas e são apresentadas na Figura 3.7. Cada curva reflete a variação da concentração de adsorbato com o tempo à saída da coluna, permitindo calcular um ponto na isoterma de adsorção (q^* , C_0).

Observa-se que as curvas apresentam perfis bem semelhantes e estão dispostos muito proximamente uns dos outros. Isso ocorre devido ao baixo intervalo de concentrações empregado na realizações dos ensaios. Porém, ainda assim é possível observar que concentrações mais altas apresentam *breakpoints* que se manifestam mais rapidamente que concentrações menores.

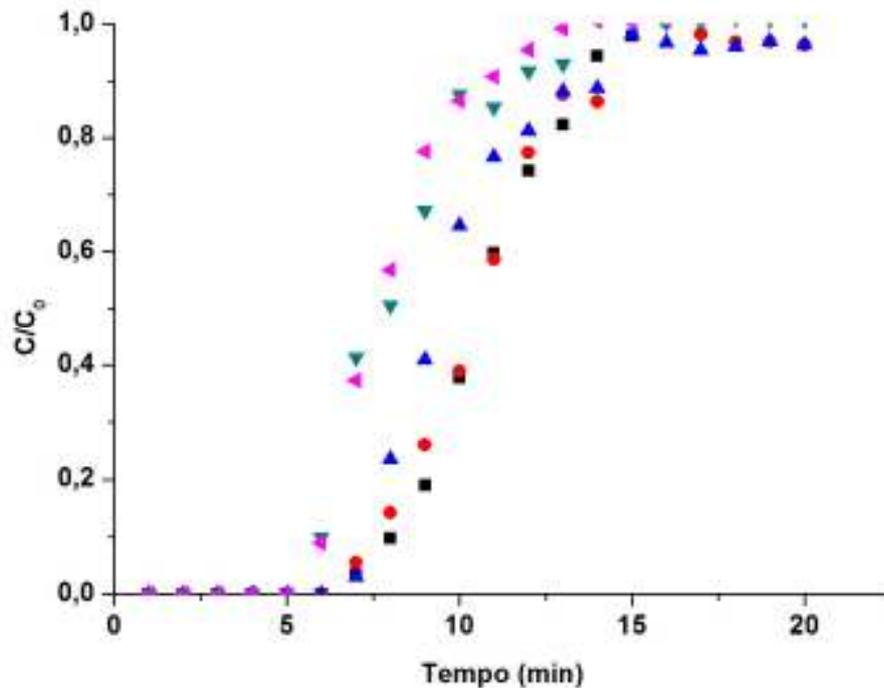


Figura 3.7 Curvas de *breakthrough* de proteína total. (•) 0,1 mg/ml; (●) 0,2mg/mL (▲) 0,3 mg/mL; (▼) 0,4mg/mL; (◄) 0,5 mg/mL. Condições: Tampão fosfato pH 7,0 FI 50mM + 1,0M NaCl

A partir das curvas de *breakthrough* obtidas com diferentes concentrações de alimentação da enzima, e utilizando-se das Equações 3.1 a 3.3, relativas aos modelos de regressão, a isoterma de adsorção a 25 °C foi construída (Figura 3.8). A curva representa a equação de Langmuir ajustada aos dados experimentais. O comportamento observado na Figura 3.4 é típico de uma isoterma do tipo Langmuir. O modelo de Langmuir considera que a área superficial do adsorvente, capaz de acomodar o adsorbato numa monocamada, é limitada e o número total de moléculas que podem ser acomodadas é finita (RAMOS, 2008). Dessa forma, com a formação da monocamada, ou seja, após o preenchimento de todos os sítios ativos, as enzimas não serão mais adsorvidas na fase sólida e o adsorvente atingiu a saturação.

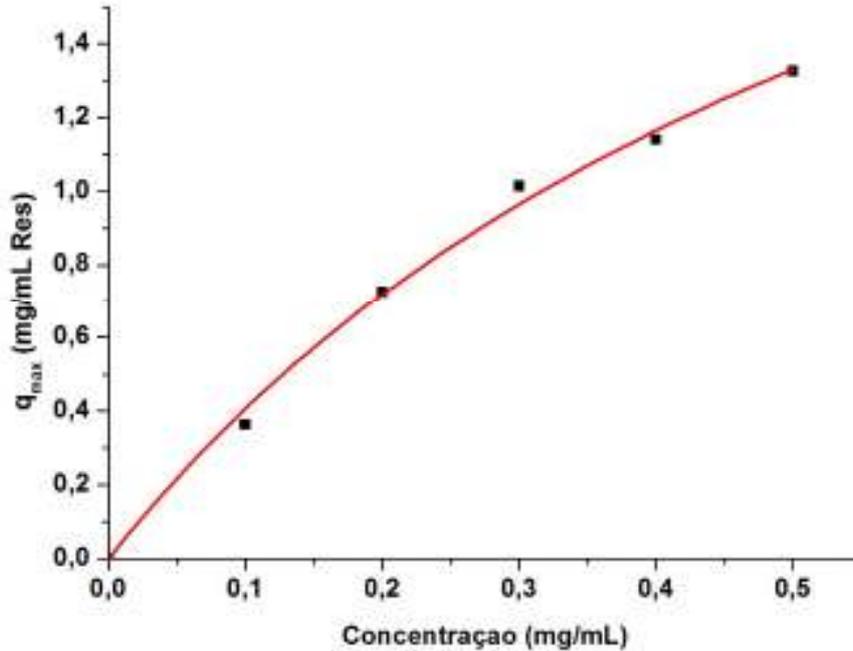


Figura 3.8 Isoterma de adsorção de proteína total a 25°C. Condições: Tampão fosfato pH 7,0 FI 50mM + 1,0M NaCl. (•) Pontos experimentais (-) Modelo de Langmuir.

Para o cálculo de q , utilizou-se a equação 3.4, abaixo.

$$q = \frac{C_0(A_h Q - \varepsilon V_c)}{(1 - \varepsilon)V_c} \quad (3.4)$$

em que C_0 é a concentração na entrada da coluna (mg/mL), q é a quantidade de proteína adsorvida na resina (mg/mL) em equilíbrio com C_0 , A_h é a área hachurada delimitada pela curva e ε , a porosidade do leito. A área A_i está ilustrada na Figura 2.8, como sendo a região hachurada da figura, que representa a capacidade adsortiva da resina frente à enzima.

Os parâmetros dos ajustes não-lineares das isotermas de adsorção do modelo são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Parâmetros do modelo de Langmuir para isoterma de adsorção de proteína total.

Parâmetro	Valor	Erro
q_{\max} (mg/mL)	3,0831	$\pm 0,417$
K (mL/mg)	1,5197	$\pm 0,321$
Chi ²	0,0012	-
R ²	0,9960	-

Com um R² bem próximo a 1 e um valor de chi² muito baixo, pode-se concluir que o modelo utilizado se aplica bem na descrição dos dados obtidos experimentalmente.

Gráficos semelhantes para curvas de ruptura de atividade (Figura 3.9), isoterma de adsorção de atividade (Figura 3.10) e tabela com os parâmetros do ajuste (Tabela 3.7) são apresentados a seguir.

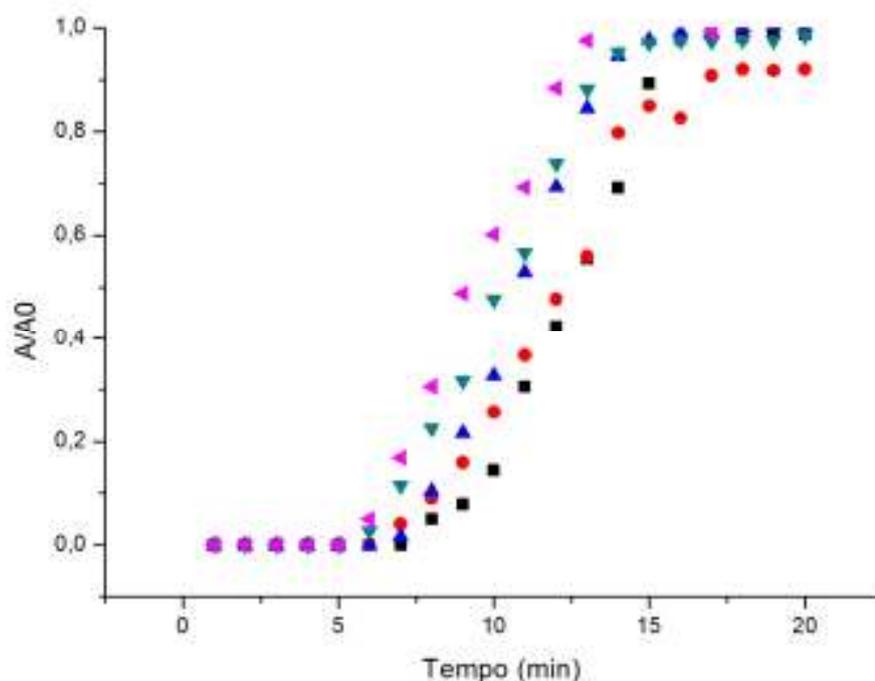


Figura 3.9 Curvas de *breakthrough* de atividade enzimática (+) 250 U/ml; (●) 300 U/mL (▲) 400 U/mL; (▼) 600 U/mL; (◄) 800 U/mL. Condições: Tampão fosfato pH 7,0 FI 50mM + 1,0M NaCl.

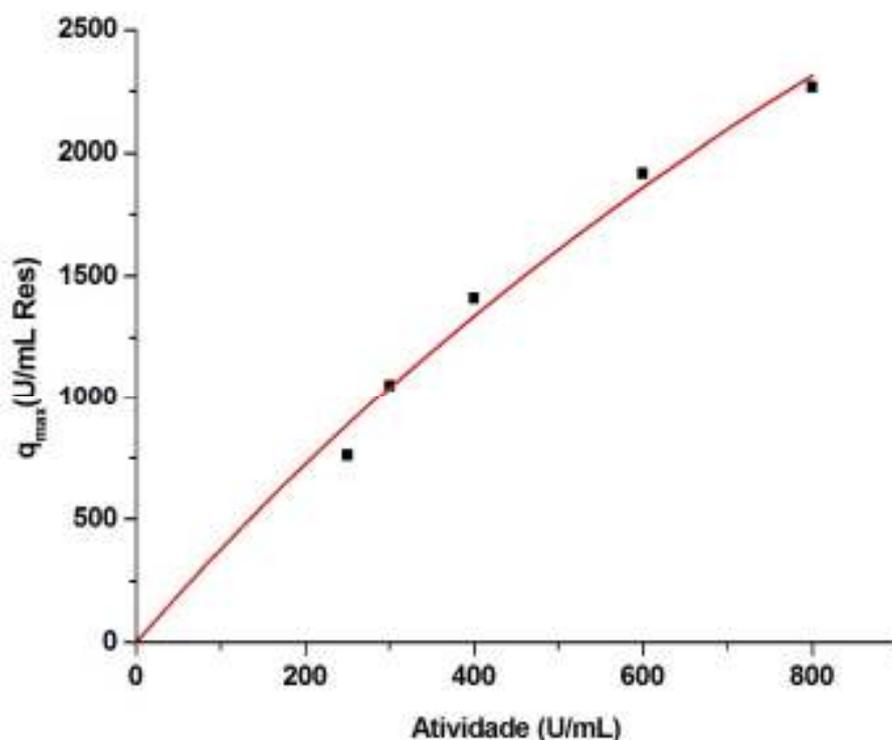


Figura 3.10 Isotherma de adsorção de atividade enzimática a 25°C. Condições: Tampão fosfato pH 7,0 FI 50mM + 1,0M NaCl. (•) Pontos experimentais (-) Modelo de Langmuir.

Tabela 3.7 Parâmetros do modelo de Langmuir para isoterma de adsorção de atividade enzimática.

Parâmetro	Valor	Erro
q_{max} (U/mL)	8600	± 774
k (mL/U)	$4,6 \times 10^{-4}$	$\pm 1,9 \times 10^{-5}$
χ^2	0,0026	-
R^2	0,9919	-

Mais uma vez, a comparação dos resultados obtidos é comprometida pela escassez de dados na literatura sobre o adsorvente em questão. Nfor (2011) encontrou valores de q_{max} de 10,2 mg/mL para adsorção de IgE e Wenger (2010), valores de 42,1 mg/mL para adsorção de IgG. Porém, visto se tratar de proteínas de naturezas bem diferentes da β -galactosidase, tais valores não são passivos de comparação direta.

Sendo assim, com o valor de q_{max} da resina Capto MMC estabelecido, podemos calcular as condições a serem empregadas na injeção da amostra advinda da fermentação no leito fixo, descrita nas seções posteriores.

3.2.4 Testes de Eluição por Planejamento Experimental

Um segundo estudo de Planejamento Experimental foi realizado, desta vez para a etapa de dessorção. Como já mencionado na seção 2.2.6, foram três os parâmetros estudados para a eluição: pH, concentração de sal no meio enzimático e força iônica do tampão fosfato. Na Tabela 3.8 segue o delineamento completo fornecido pelo programa STATITISCA v.10, relacionando os três parâmetros supracitados, cada um em três condições diferentes, o que resultou em 17 condições experimentais, com um ponto central em triplicata. A variável dependente (ou resposta) foi a recuperação da enzima (proteínas totais). A recuperação é a porcentagem de concentração recuperada na etapa de eluição em relação à injetada na etapa de carga (Equação 3.5).

$$REC = \frac{(q_{elu})}{(q_{inj})} * 100 \quad (3.5)$$

Ainda na Tabela 3.8, observou-se uma variação considerável nos valores de recuperação entre as condições estudadas, o que já nos dá uma ideia da importância real deste estudo. Os valores de recuperação variaram desde 17% (no ponto 13) até 88% (na condição 4). Na realidade, o menor rendimento pode ser observado no ponto 11 (pH 6,1), onde não houve nenhuma recuperação da enzima submetida à adsorção, porém isso pode ser facilmente explicado pelo fato de que o tampão empregado no estudo (fosfato de potássio) tem faixa de tamponamento em pH entre 6,5 e 7,5 e que, em uma zona fora desta, a dessorção é totalmente comprometida devido à perda da atividade tamponante do fosfato. O mesmo ocorreria para a condição seguinte (ponto 12, pH 7,8), porém ainda se observa alguma recuperação possivelmente por causa do pH básico, que já se aproxima mais do pH de regeneração da coluna com KOH.

Tabela 3.8 Resposta ao planejamento experimental de eluição

EXP.	FI	pH	SAL	RECUPERAÇÃO (%)
01	25,0	6,5	0,50	65
02	25,0	6,5	1,00	37
03	25,0	7,5	0,50	70
04	25,0	7,5	1,00	88
05	75,0	6,5	0,50	25
06	75,0	6,5	1,00	31
07	75,0	7,5	0,50	41
08	75,0	7,5	1,00	22
09	7,95	7,0	0,75	76
10	92,0	7,0	0,75	79
11	50,0	6,1	0,75	0
12	50,0	7,8	0,75	31
13	50,0	7,0	0,33	17
14	50,0	7,0	1,17	44
15 (C)	50,0	7,0	0,75	73
16 (C)	50,0	7,0	0,75	70
17(C)	50,0	7,0	0,75	70

A seguir, o Diagrama de Pareto (Figura 3.11), que exhibe as variáveis que apresentam influência significativa na recuperação enzimática. Observa-se que as três variáveis estudadas, a 90% de confiança, apresentam efeitos sobre a recuperação enzimática na eluição. Em ordem decrescente de influência, temos o pH quadrático, a concentração de sal quadrática e a força iônica linear. Nota-se também que nenhum efeito de interação afetou significativamente a variável-resposta, ou seja, os parâmetros estudados têm influência sobre a recuperação separadamente, mas não conjuntamente.

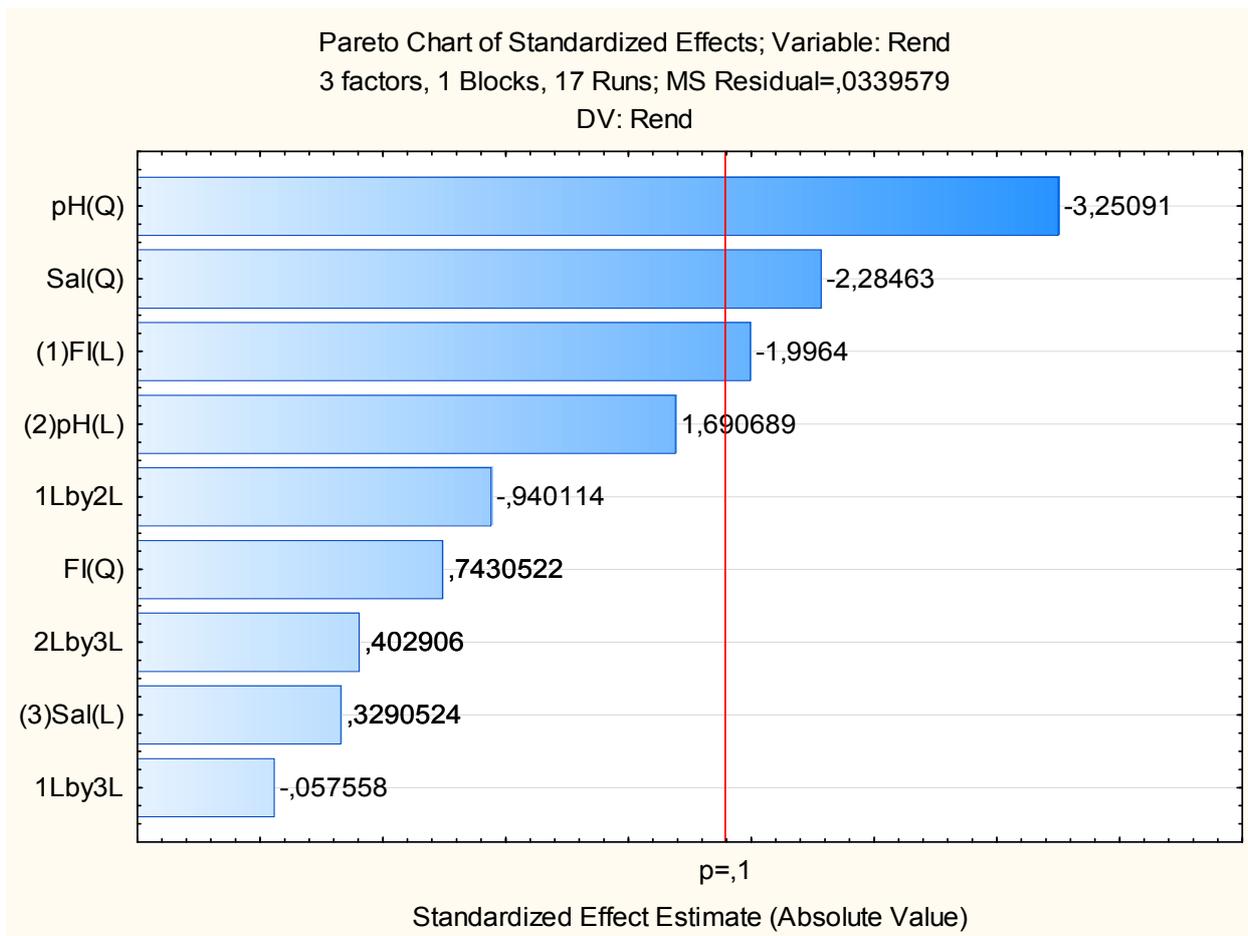


Figura 3.11 Diagrama de Pareto para experimentos de eluição

Devido à escassez de trabalhos na literatura que reportam o emprego da técnica de Cromatografia de Modo Misto na recuperação de proteínas e enzimas, realizar uma comparação de resultados se torna, de certa forma, uma tarefa difícil. Porém, em um relatório feito pela própria GE sobre otimização das condições de eluição da proteína BSA em resina Cpto MMC mostra que esses três fatores também influenciaram na recuperação (GE HEALTHCARE, 2008).

A Tabela A2, disponível no anexo ao final desta dissertação, descreve os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, apresentando os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a resposta de recuperação enzimática. Para a resposta analisada, as variáveis que apresentaram significância a nível de 10% encontram-se destacadas em negrito.

Os modelos de regressão obtidos para a recuperação enzimática (REC), a exemplo do que foi feito na etapa de adsorção, podem ser definidos pelas equações encontradas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 Modelos de regressão para recuperação

pH	Modelo
6,5	$z = 0,0201x + 0,0001x^2 + 0,61y - 1,71y^2 - 0,0006xy - 40,6$ (3.6)
7,0	$z = 0,0242x + 0,0001x^2 + 1,63y - 2,01y^2 - 0,0006xy - 36,9$ (3.7)
7,5	$z = 0,0248x + 0,0001x^2 + 1,13y - 2,04y^2 - 0,0006xy - 38,1$ (3.8)

em que x é Força iônica do tampão, y = Concentração de sal e z = REC.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.7), o valor de F calculado para o modelo de recuperação enzimática na etapa de eluição foi de 2,79, ou seja, maior do que os valores de $F_{9,7,10\%}$ tabelado, que é de 2,72. Assim sendo, o modelo obtido pode ser considerado estatisticamente significativo e, conseqüentemente, também válido para a descrição do estudo de dessorção.

Tabela 3.10 Análise de variância das variáveis estudadas na eluição

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	P-valor
Regressão	0,85368	9	0,09485	2,79	10%
Residual	0,237705	7	0,03396		
Total	1,091388	16			
F_{tab} (90%)				2,72	

Por fim, de semelhante modo ao que foi feito nos estudos de adsorção, pode-se plotar a superfície de resposta (Figuras 3.12, 3.13 e 3.14) para recuperação nos três pH estudados (6,0; 7,0; 7,5) correlacionando a força iônica do tampão e a concentração de sal no meio de eluição.

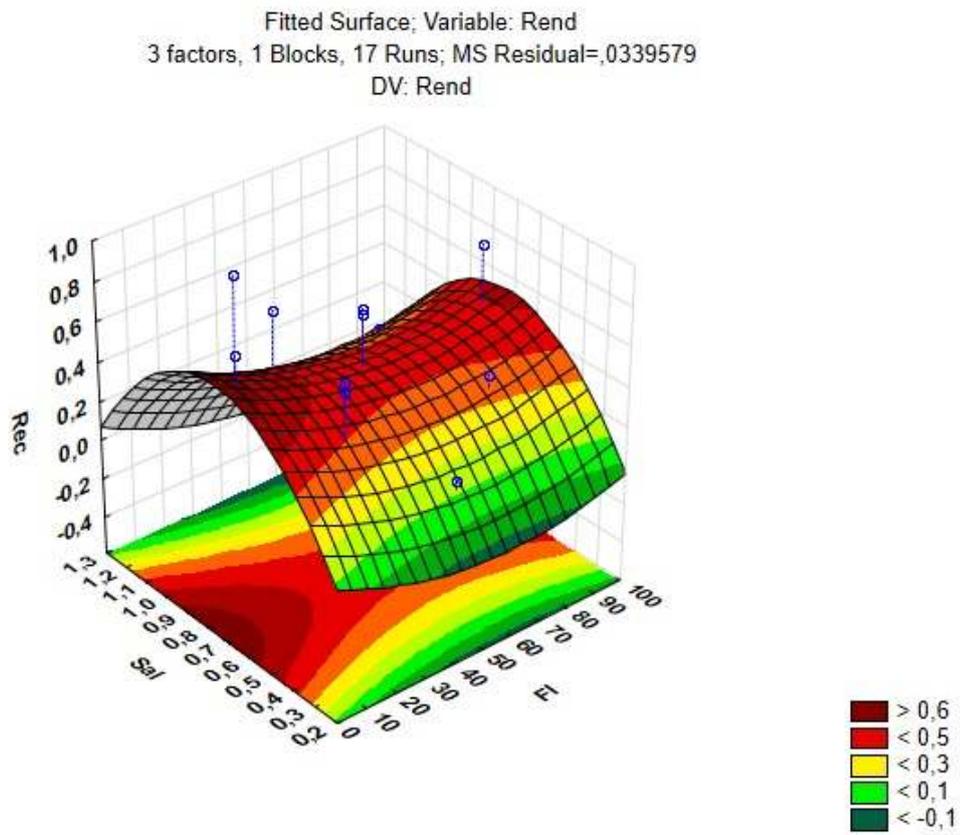


Figura 3.12 Superfície de resposta para adsorção em pH 6,5

Fitted Surface; Variable: Rec
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,0339579
DV: Rec

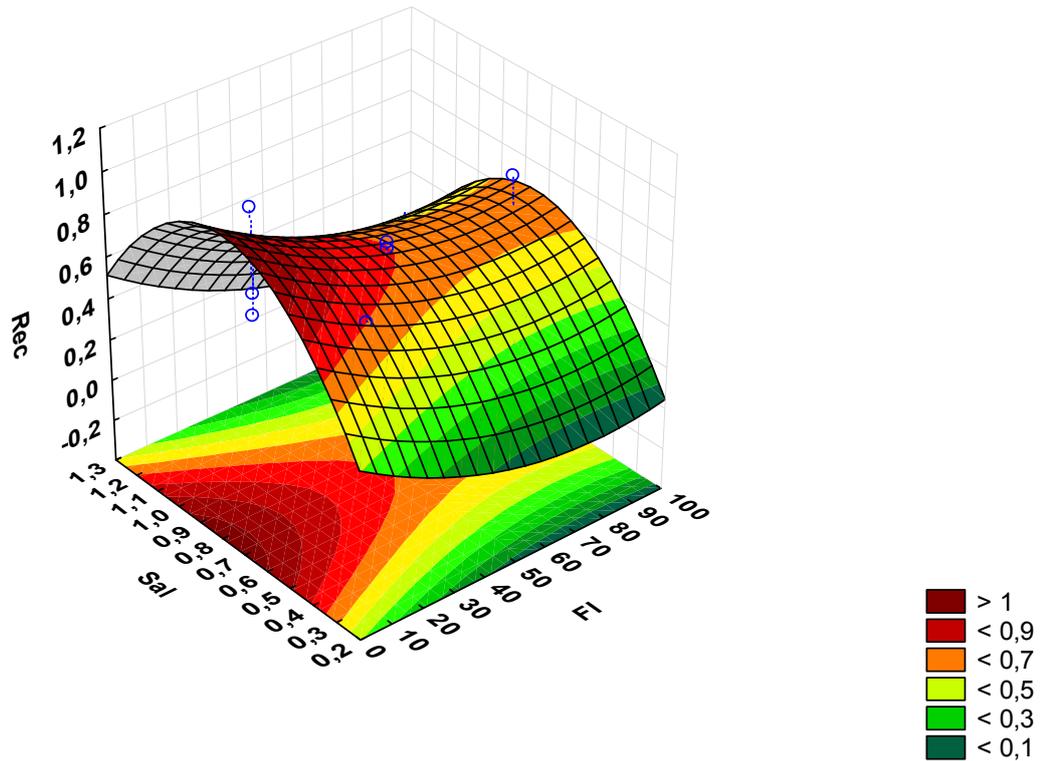


Figura 3.13 Superfície de resposta para eluição em pH 7,0

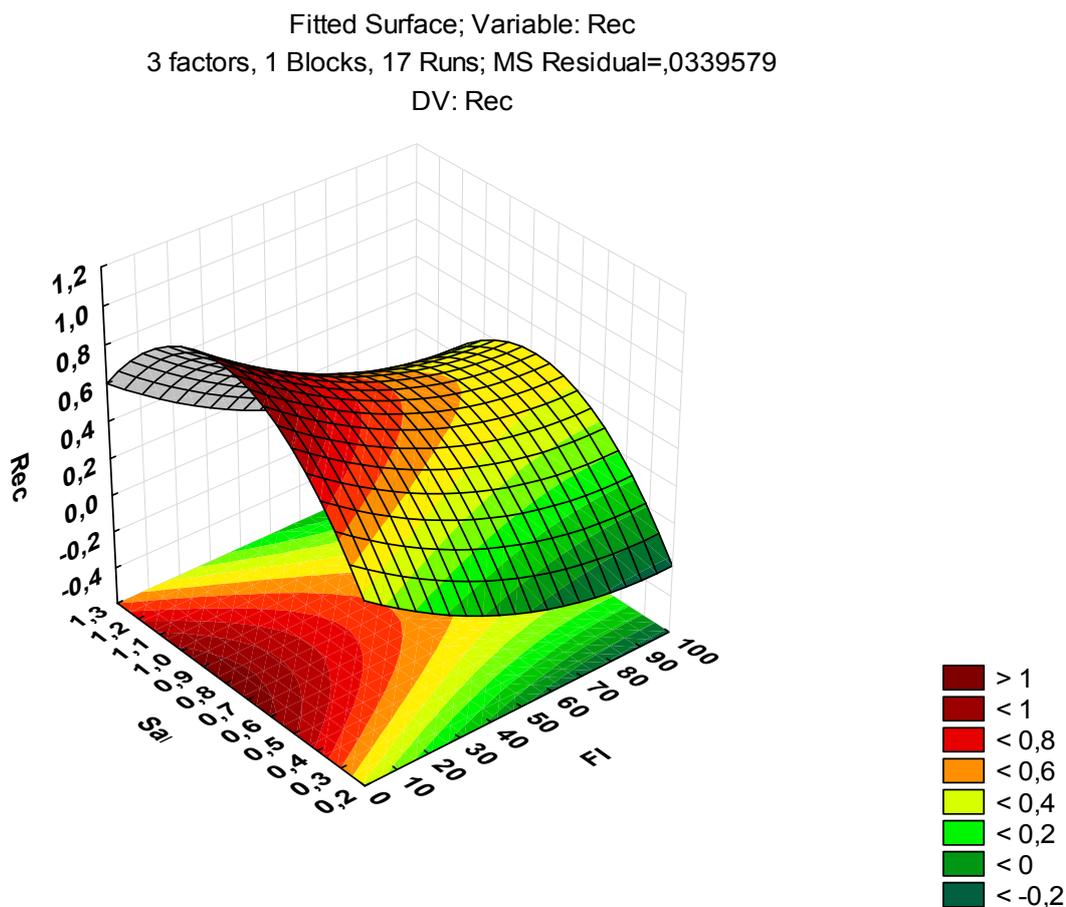


Figura 3.14 Superfície de resposta para eluição em pH 7,5

Assim como na adsorção, as superfícies de resposta apresentam uma região bem definida para a máxima recuperação, por isso, as condições ótimas para a eluição foram encontradas através da determinação do ponto crítico (onde a derivada da equação é igual a zero). Observa-se que as melhores condições estão sob os pH 7,0 e 7,5, visto que em pH 6,5 não se encontram valores de recuperação superiores a 0,5. Os resultados encontrados estão similares ao relatório feito pela GE (2008), que encontrou as melhores valores de rendimento nos maiores pH estudados, para adsorção da proteína BSA.

Observa-se também, por meios dos gráficos de superfície de resposta, que menores valores de Força Iônica do tampão são mais eficazes na dessorção das enzimas. Tal fato se deve, de acordo com GE Life Sciences (2008), a uma mudança de pH mais rápida na etapa de eluição, o que faria a biomolécula de interesse se dissociar do adsorvente de forma mais efetiva.

Quanto ao parâmetro concentração de sal, maiores valores nos rendem melhores resultados, fato semelhante ao que ocorre na etapa de adsorção. Nesse caso, porém, diferentemente da etapa de adsorção, o aumento da concentração de sal para dessorção é uma característica da cromatografia de troca iônica.

As melhores condições para dessorção deverão ser, de acordo com os resultados aqui apresentados, para o pH 7,0, força iônica 15 mM e a concentração de sal no meio, 0,75 M. Por sua vez, para o pH 7,5, a força iônica deverá ser de 15 mM e a concentração de sal, 0,8 M.

3.3 PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ORIUNDA DE FERMENTAÇÃO POR CROMATOGRÁFIA DE MODO MISTO

3.3.1 Precipitação proteica e diálise

O fracionamento proteico, realizado com o intuito de precipitar as proteínas de interesse em solução para a exclusão de impurezas interferentes, e a diálise da amostra fermentada, com vistas à retirada do sulfato de amônio empregado na precipitação, ocorreram de forma satisfatória, como exhibe a Tabela 3.11.

Tabela 3.11 Proteína total, atividade enzimática, atividade específica e Fator de Purificação (FP) das frações coletadas ao final de cada operação unitária.

Amostra	Proteína Total	Atividade Enzimática	Atividade Específica	FP
Extrato Bruto	0,31 mg/mL	49,2 U/mL	158,7 U/mg	1
Precipitado	0,36 mg/mL	57,1 U/mL	160,3 U/mg	1,01
Dialisado	0,20 mg/mL	72,2 U/mL	361 U/mg	2,27
Fração Eluída (seção 3.3.2)	0,17 mg/mL	91,8 U/mL	540 U/mg	3,40

O extrato bruto, lisado proveniente diretamente da fermentação (momento onde a única operação unitária que havia sido empregada havia sido a centrifugação para a retirada de massa de células), após ser submetido à precipitação proteica, apresentou um aumento tanto de concentração quanto de atividade. Isso se deve à diminuição no volume da amostra final, que concentrou a proteína de interesse. Mediu-se também a concentração e atividade do sobrenadante para que se assegurasse que a maior quantidade possível de proteínas houvesse sido precipitada. Com os baixos valores obtidos para esses parâmetros (proteína total 0,03 mg/mL e atividade 0,31 U/mL), pode-se concluir que a precipitação ocorreu de forma eficiente.

A amostra após a diálise mostra uma diminuição no valor de concentração e um aumento no valor de atividade enzimática. Deve-se ressaltar que a medida de concentração é dado em função de proteínas totais presentes no meio. Com a diálise, muitas proteínas de menor peso molecular e outros interferentes que haviam passado pelo processo de precipitação foram excluídos, o que fez este valor cair consideravelmente. Contudo, a análise de atividade enzimática é específica para a β -galactosidase (visto o substrato empregado nos ensaios ser a própria lactose). Com a concentração dessas enzimas de interesse (que é comprovado com a eletroforese SDS-PAGE, descrita mais adiante na seção 3.3.3), era de se esperar que a atividade fosse realmente maior ao final do ensaio de diálise e, conseqüentemente, após o leito fixo. Resultado bem semelhante foi encontrado por Boeris *et al* (2012). Esses autores, ao empregarem a técnica de cromatografia de troca iônica em leito expandido também observaram um decréscimo nos valores de concentração e um aumento nos valores de atividade após a corrida cromatográfica.

Quando se observa os cálculos de atividade específica, confirma-se a eficiência da técnica na purificação da enzima de interesse. Observa-se que, com o avanço das etapas de *downstream*, há um aumento na pureza da amostra. Ao final das operações unitárias, obtêm-se um fator de purificação de 3,4, o que atesta o potencial da cromatografia de modo misto para a obtenção de frações concentradas da enzima β -galactosidase.

3.3.2 Ensaios em coluna cromatográfica

Assim sendo, as amostras das frações imediatamente após a lise celular (amostra 1) e após a diálise (amostra 2) foram submetidas a corridas em colunas cromatográficas em leito fixo, com vistas a recuperação da enzima produzida.

As condições empregadas nos ensaios em coluna já foram descritas na seção 3.2.3 para adsorção (pH 7,0, FI 50 mM e a concentração de sal no meio de 1,0 M) e na seção 3.2.4, para dessorção (pH 7,5, FI 15 mM e a concentração de sal, 0,75 M). A seguir, as Figuras 3.15 e 3.16 apresentam os cromatogramas referentes às amostras fermentativas após a lise celular e após a diálise, respectivamente. Logo após os cromatogramas, as Tabelas 3.12 e 3.13 apresentam o balanço de massa, recuperação e atividade enzimática ao fim da corrida cromatográfica, em termos de proteína total e atividade. Ressalta-se mais uma vez que, por definição, a recuperação neste trabalho é sempre entendida como a razão (em porcentagem) de concentração proteica e/ou atividade enzimática recuperada na etapa de eluição em relação à etapa de injeção. Outro fato digno de nota é que, por se tratar de um balanço de massa total, as unidades para proteína total e atividade são, respectivamente, mg e U.

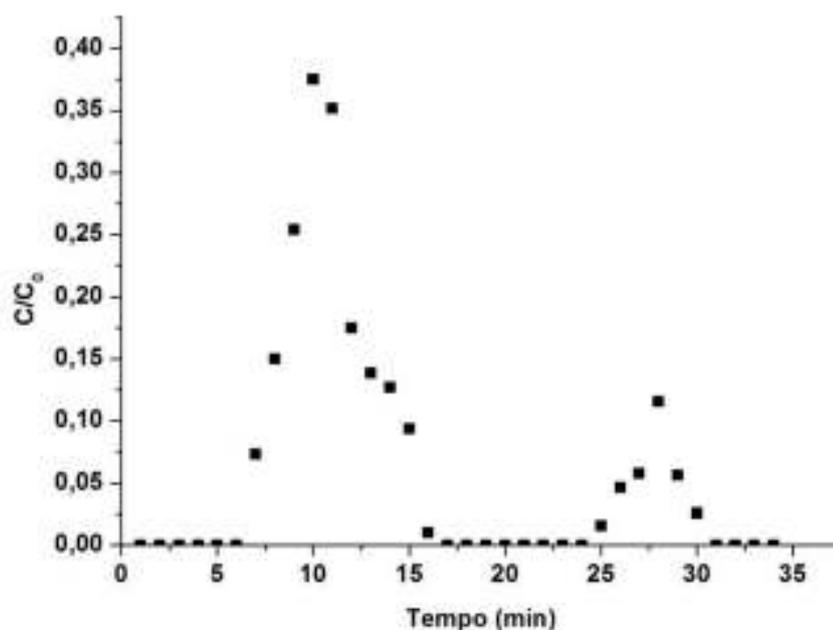


Figura 3.15 Cromatograma obtido para amostra fermentativa após a lise celular.

Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl.

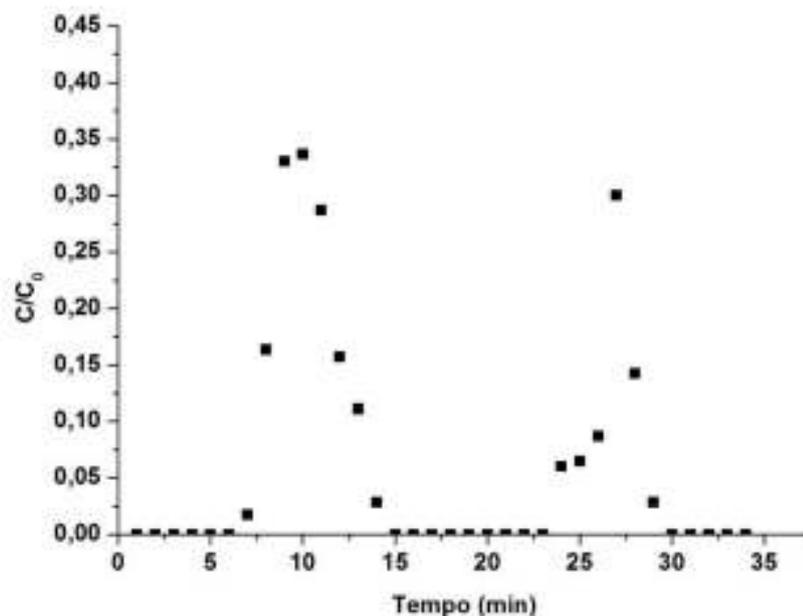


Figura 3.16 Cromatograma obtido para amostra fermentativa após a diálise. Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl.

Tabela 3.12 Balanço de massa (BM) em cada uma das etapas da corrida cromatográfica em função da concentração de proteínas totais e atividade para a amostra 1 (extrato bruto). Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl.

Amostra 1	Proteína Total (mg)	BM (%)	Atividade (U)	BM (%)	AE (U/mg)
Aliment.	2,43	100	343,9	100	141,5
Adsorção	0,78	32,3	131,0	38,1	168,0
Lavagem	1,24	51,1	160,5	46,8	129,4
Eluição	0,43	18,0	55,6	16,1	129,3
TOTAL	-	101,4	-	101,4	-

Tabela 3.13 Balanço de massa (BM) e atividade específica (AE) em cada uma das etapas da corrida cromatográfica em função da medida de proteína total, atividade total e atividade específica (AE) para a amostra 2 (extrato pós-díalise). Tampão de adsorção: pH 7,0, FI 50 mM + 1,0 M NaCl. Tampão de eluição: pH 7,5, FI 15 mM + 0,75 M NaCl.

Amostra 2	Proteína Total (mg)	BM (%)	Atividade (U)	BM (%)	AE (U/mg)
Aliment.	1,86	100	420,1	100	225,9
Adsorção	0,63	33,9	113,6	27,0	180,3
Lavagem	0,43	23,4	108,4	25,8	252,1
Eluição	0,76	41,0	202,4	48,2	266,3
TOTAL	-	98,3	-	101,0	-

Ressalta-se a manutenção relativa (ou até mesmo o aumento, em alguns estágios) dos valores de atividade específica nas amostras, o que nos permite concluir que as amostras não sofrem grandes perdas no processo adsorativo.

Para comparar ainda mais as amostras, calculou-se o rendimento da amostra comercial por meio do modelo fornecido para dessorção, descrito na equação 3.10. Após plotar as mesmas condições de eluição aqui utilizadas no modelo validado, obteve-se o valor de 72,4%. A Tabela 3.14, assim, apresenta os valores de recuperação em porcentagem, para cada uma das amostras, após as respectivas operações unitárias. A tabela também mostra o Fator de Purificação (FP). Observa-se que a recuperação de enzimas diretamente do material fermentado após a lise celular, tanto em termos de concentração de proteína total quanto de atividade, é consideravelmente baixa, o que já era esperado, devido aos detritos celulares ainda presentes no meio, que competem pela adsorção nos poros do material adsorvente. Após a precipitação e díalise, os valores já são perceptivelmente melhores, devido à maior pureza das amostras. O Fator de Purificação também apresenta-se maior na amostra pós-díalise, apontando o melhor desempenho para essa amostra, em relação ao extrato completamente bruto.

Tabela 3.14 Comparação de recuperação entre amostras após cada uma das etapas de *downstream*.

Amostra	Recuperação Concentração (%)	Recuperação Atividade (%)	Fator de Purificação
Ext. bruto	18,0	16,1	0,91
Ext. pós-diálise	41,0	48,2	1,17
Comercial (modelo)	72,4	71,8	-

São poucos os trabalhos na literatura que abordam a purificação de β -galactosidase por técnicas cromatográficas. Boeris et al. (2012) obtiveram um valor de recuperação em termos de atividade de 65%, quando submeteu a β -galactosidase à cromatografia de troca iônica em leito expandido em resina Streamline DEAE. Já Medeiros et al. (2012), utilizando-se da resina Sepharose Q, obtiveram valores de recuperação próximos a 88%. Embora os valores encontrados por estes autores sejam superiores aos encontrados neste trabalho, vale ressaltar que foram utilizadas apenas soluções comerciais da enzima, o que já fomenta esses valores maiores, dada a maior pureza das amostras.

Outro aspecto digno de nota é que, por mais que se tenha, sempre que fora possível, tomado o cuidado de realizar todas as análises por sob as mesmas condições, com o objetivo de se obter resultados mais precisos, isso nem sempre é possível devido à própria natureza da amostra. Na amostra comercial e na lisada, por exemplo, existem várias outras proteínas e/ou interferentes que alteram o valor real da recuperação. No caso destas amostras, ao se trabalhar com ensaios de proteínas totais, não se tem especificidade nenhuma em relação à enzima β -galactosidase. Já na amostra precipitada, baseando-se na eletroforese (Figura 3.17), percebemos que este valor de 41,0% se refere quase em sua totalidade à enzima de interesse, dado a pureza da amostra ser visivelmente maior. Embora este resultado seja inferior ao da amostra comercial, se levarmos o fato acima descrito em consideração, chegaremos à conclusão que este valor pode ser relativamente alto, assumindo-se como perspectiva

principal o objetivo geral deste trabalho, que é o de se obter a enzima na forma mais pura possível.

3.3.3 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético das bandas é mostrado na Figura 3.17, onde pode-se observar 5 trilhas, cada uma representando uma amostra. Da esquerda pra direita, temos: (1) Marcador de ampla faixa molecular; (2) Amostra comercial de β -galactosidase; (3) Amostra de fermentado, logo após a lise celular; (4) Amostra fermentada logo após precipitação proteica; (5) Amostra após cromatografia de modo misto.

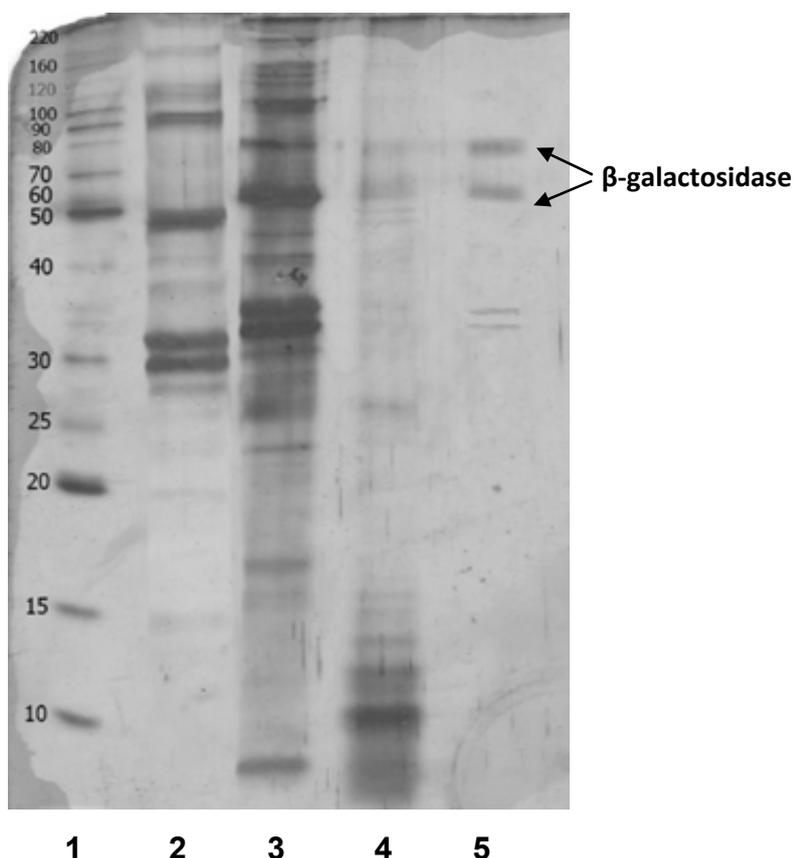


Figura 3.17 Perfil eletroforético das amostras. (1) Marcador molecular; (2) Amostra comercial; (3) Extrato bruto, logo após a lise celular; (4) Extrato após precipitação proteica; (5) Amostra após cromatografia de modo misto.

O marcador de ampla faixa utilizado (Amostra 1) continha proteínas com massas moleculares variando de 10 a 220 kDa e serviu de padrão para que se

soubesse a massa molecular aproximado das amostras estudadas nesse trabalho com o objetivo de ajudar na identificação e caracterização da enzima.

A amostra 2, o padrão comercial de β -galactosidase, apresenta 4 bandas muito bem definidas, duas superiores e duas inferiores. Na literatura, valores diferentes de massas moleculares para essa enzima, obtida a partir de diferentes fontes microbianas, têm sido relatados. Muitas β -galactosidases, contendo subunidades numerosas com várias massas moleculares, têm sido descritas (BERGER *et al.*, 1997). A literatura reporta que moléculas de lactase oriundas especificamente de *Kluyveromyces lactis* têm peso molecular variando entre 120 e 140 kDa, valores estes calculados por Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Partícula (GEKAS E LÓPEZ-LEIVA, 1985; FRANCO E SILVA, 1999; CARMINATTI, 2001; RODRÍGUEZ, 2012). Por se tratar de uma enzima composta de duas cadeias proteicas, os trabalhos também reportam o aparecimento de duas bandas para a enzima em questão, quando a submeteram à eletroforese. Observa-se na Figura 3.17 que as duas bandas superiores da trilha 2 apresentam pesos moleculares de aproximadamente 95 e 45 kDa, que, juntas, nos dão um dímero de 140 kDa, a enzima de interesse.

A amostra 3, em seguida, corresponde ao lisado oriundo da fermentação. Como era de se supor, a amostra apresenta muitas bandas devido à presença de enzimas que não são de interesse ao trabalho, visto que, nesse momento, quase nenhuma etapa de processo *downstream* havia sido empregada. 4 bandas bem destacadas podem ser observadas nessa amostras, com as duas superiores (95 e 50 kDa), muito provavelmente representando a β -galactosidase.

A amostra 4 apresenta o perfil para o fermentado após as etapas de precipitação proteica com sais de amônio e diálise. A diferença de pureza da amostra já é notável nessa altura do processo. Contudo, muitas bandas ainda estão presentes.

E, por fim, a amostra 5, correspondente a coleta de volumes na saída do leite fixo que apresentaram alguma concentração/atividade na etapa de eluição, apresenta dois monômeros destacados com pesos aproximados de 60 e 75 kDa, totalizando 135 kDa, o que, a exemplo da amostra comercial, pode indicar a presença de β -galactosidase na amostra final. Outro fato que corrobora a

possível presença da β -galactosidase é a alta atividade do material eluído, como mostrado na Tabela 3.11. Outras duas bandas podem ser observadas logo mais abaixo, porém estas são quase que imperceptíveis, o que indica concentrações baixas para essas proteínas.

De posse desses resultados, a eletroforese finaliza este trabalho confirmando a purificação progressiva da enzima de interesse no decorrer das etapas de *downstream*, o que nos indica a eficiência da utilização e emprego da técnica de cromatografia de modo misto na purificação de biomoléculas, especificamente na área de enzimas.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO

A partir desta dissertação, buscou-se avaliar a purificação e recuperação da enzima β -galactosidase, produzida via fermentação pela levedura *Kluyveromyces lactis*, por meio de técnica cromatográfica utilizando-se uma resina operando em modo misto (com interações iônicas e hidrofóbicas).

Desde o princípio, por se tratar de uma técnica nova e não haver nenhum registro na literatura do emprego desta técnica para a enzima em questão, ensaios de adsorção e dessorção tiveram que ser realizados com o objetivo de se conhecer as condições de operação que levariam aos melhores rendimentos possíveis. Esses experimentos foram realizados e validados com sucesso, dado os valores de R^2 bem próximos a 1 e baixos erros apresentados.

As isotermas, tanto de adsorção de proteína total quanto de atividade enzimática, foram obtidas através das curvas de ruptura destes parâmetros e o modelo de Langmuir com base nos resultados apresentados foi bem ajustado para a faixa de concentração empregada nos experimentos.

As operações unitárias de precipitação enzimática e diálise do precipitado ocorreram de forma satisfatória, visto os valores de atividade serem sempre maiores no decorrer das etapas de *downstream*, confirmando a concentração da enzima de interesse no decorrer dos processos.

Por fim, o emprego da cromatografia de modo misto em leito fixo comprovou a viabilidade do emprego desta técnica na purificação bem sucedida da enzima, quando valores de recuperação de 41% e 48% foram obtidos para concentração de proteína total e de atividade enzimática, respectivamente. Tal fato foi corroborado pela realização de eletroforese SDS-PAGE, que exibiu, para as frações coletadas na saída do aparato cromatográfico, bandas visivelmente mais puras que o próprio extrato comercial.

Desta feita, de posse dos resultados obtidos, pode-se concluir que a técnica de cromatografia de modo misto é viável e eficaz na purificação e recuperação da β -galactosidase de *Kluyvermoyces lactis*, quando se segue um protocolo de

operações unitárias bem definido com esse intuito. Obviamente, um estudo mais profundo ainda é necessário para o aprimoramento desta técnica na purificação de β -galactosidase, mas os resultados aqui apresentados, sem dúvidas, já se apresentam bastante promissores e confirmam a possibilidade do isolamento da enzima para posterior imobilização e/ou quaisquer outros fins que exijam que a biomolécula de interesse apresente um considerável grau de pureza.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Com vistas ao melhoramento e estudo mais aprofundado do trabalho aqui desenvolvido, sugerem-se a realização dos seguintes passos:

- Análise Zimográfica das frações enzimáticas, para que se certifique que a enzima concentrada no final deste trabalho é realmente a β -galactosidase;
- Modelagem matemática dos dados para a descrição do fenômeno aqui estudado;
- Estudo de *scale-up* para que se confirme a viabilidade do emprego desta técnica em aplicações industriais de larga escala;
- Emprego da técnica de adsorção em leito expandido, com vistas à exclusão de operações unitárias que encarecem o processo como um todo.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. Centro de Engenharia Biológica E Química Instituto Superior Técnico, *Biocatálise*. Lisboa, 2002.

AMERSHAM BIOSCIENCES AB. Protein Purification Handbook. 98p. Uppsala, Sweden, 2001.

ANONYMOUS, T.F. Thermo Scientific Pierce High-Performance Dialysis, Desalting and Detergent Removal Technical Handbook, 2009.

BERGER, J. L.; LEE, B. H.; & LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biothecnology and Appied Biochemistry**, v.25, p.19-41, 1997.

BEZERRA, C.S. Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação. Dissertação de mestrado. 115p. Departamento de Engenharia Química UFC. Fortaleza, Ceará, 2012.

BOERIS, V; BALCE, B.; VENNAPUSAB, R. R.; RODRÍGUEZ, M. A.; PICÓ, G.; LAHORE, M. F. Production, recovery and purification of a recombinant b-galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B**, v. 900, p.32-37, 2012.

BON, E.P.S. Mercado brasileiro interno e externo de enzimas industriais e especiais. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, (ENZITEC), 2006.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*. 1ª reimpressão. v. 1: Fundamentos. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2005.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T. YUGOVA, V.L., MIEZELIENE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and Immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2005.

CAMPOS, E. S. Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de *Ananas comosus* por Adsorção em Leito Expandido. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2007.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis, 2001.

CAVAILLES, D.; COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Appl. Biochemistry**, v. 22, p.55-64, 1995.

DE CASTRO, M.D.L; CAPOTE, F.P.; ÁVILA, N.S., *Is dialysis a membrane-based separation technique?* **Trends in Analytical Chemistry**, 27(4): 315- 326, 2008.

DENIZLI, A.; KOKTURK, G.; YAVUZ, H.; PISKIN, E. Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed bed column with Cibacron Blue F36A – Zn (II) attached poly (EGDMA – HEMA) microbeads. **Reactive Function Polymer**, v.40, n.3, p.195 -203, 1999.

FREITAS, M. F. M. **Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRLL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana.**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

GANZLE, M., HAASE, G. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **Int. Dairy J**, 2008.

GE HEALTHCARE Life Sciences. CAPTO MMC Multimodal Media. Uppsala, Sweden. 2011.

GE HEALTHCARE. Optimizing elution conditions on Capto MMC using Design of Experiments. Application Note. Uppsala, Sweden, 2008.

GE LIFE SCIENCES. Ion Exchange Chromatography. Uppsala, Suécia, 2005.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Hydrolysis of Lactose – a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 1985.

GUIMARÃES, P.M.R., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotech. Adv.** 28, 375–384, 2010.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, Boston, 1994.

HAGIYA, K.; ITO, M.; SETSU, I.; DEGUCHI, K. High pressure ultrafilter in carbohydrate synthesizing apparatus, 2005.

HUSAIN, Q., 2010. Beta-galactosidases and their potential applications: a review. **Crit. Rev. Biotechnol.** 30, 41–62.

JUAJUN, O., NGUYEN, T.H., MAISCHBERGER, T., IQBAL, S., HALTRICH, D. Cloning, purification and characterization of β -galactosidase from

Bacillus licheniformis DSM 13. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.89, p. 645–654, 2011

KRAJEWSKA, B. Applications of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilization: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.126-139. 2004.

LAEDRO, M.; RUIZ, G.; PESSELA, C. C. B.; VIAN, A.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus s.p.* strain T2: comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal**. V. 31, p.14-24, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**. 5a. ed. Macmillan, 2008.

LIMA, A. F.; RODRIGUES, T. H.S.; ROCHA, M. V. P.; CAVALCANTE, K. F.; GONÇALVES, L. R. B. Seleção de espécies de *Kluyveromyces* para a produção de β -galactosidase em soro de leite. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos 18., 2011. Caxias do Sul. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011.

LUO, J.,WU, C.,XU, T., AND WU, Y. Diffusion dialysis-concept, principle and applications, **Journal of Membrane Science**, 366(1-2): 1-16, 2011

MAHONEY, R. R.; WHITAKER, R. J. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, p. 327-350, 1977.

MANERA, A.P. Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial

da enzima. Dissertação de mestrado. 90p Departamento de Química – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2006.

MARSHAK, D. **Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual**: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MARSHAK, D. Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v. 107, p. 258-264, 2008.

MEDEIROS, F. O. R.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of b-Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering and Technology**. V. 35(5), p. 911-918, 2012.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. Influences of properties of protein and adsorption surface on removal kinetics of protein adsorbed on metal surface by H₂O₂-electrolysis treatment. **J Biosci Bioeng**, v. 91, p.233. 2001

NFOR, B. K. **Model-based Rational and Systematic Protein Purification Process Development**. PhD Thesis. Delft, Netherlands, 2011.

OLIVEIRA, C., GUIMARÃES, P.M.R., DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved b-galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnol. Adv.** 2011.

PARK, A.R., OH, D.K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85, 1279–1286, 2010.

PEREIRA, J. A. M. Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2009.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology* 177 (2012) 392–401, 2012.

PESSOA J.R.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Manole, Barueri, SP, 2005.

RAMOS, J. E. T. **Estudo de equilíbrio e cinética de adsorção em resinas de troca iônica aplicado à separação cromatográfica contínua de frutose e glicose do xarope de caju.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química-Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos.** Editora e Gráfica Universitária v.3: produção de enzimas e engenharia dos processos fermentativos. Pelotas, 2000.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2. ed. Campinas, 2009.

RODRÍGUEZ, A. P. **Structural characterization of the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and expression and directed evolution of β -galactosidases with high biotechnological interest.** Tese de Doutorado. A Coruña, Espanha, 2012.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnol. Adv.** 24, 212–225, 2006.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n.4,v.24,2004.

SANTOS, E. S.; GUIRARDELLO, R.; FRANCO, T. T. Preparative Chromatography of Xylanase Using Expanded Bed Adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 944, p. 217-224, 2002.

SCOPES, R. Protein purification: principles and practice, 3 ed: Springer-Verlag, 375p., 1994

SILVA, M. E; FRANCO, T. T. Purification of Microbial B-Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by Bioaffinity Partitioning. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 324-331. Campinas, 1999.

SIMON, F.; KOTLER, P. Building Global Biobrand: Taking biotechnology to market. Free Press, New York, 336 p, 2003.

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima B-Galactosidase de *kluyveromycis fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. 2009. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J.; J. MOL. Customizing lipase for biocatalysis : a survey of chemical, physical and molecular approaches. **Catal. B: Enzymatic**, v.9, p.113, 2000.

WALLFELS, K. MALHOTRA, P. The enzymes, v. 2, p. 409-413, 1960.

WENGER, M. D. Micro-tip chromatography: a route to an integrated strategy for high throughput bioprocess development. PhD thesis. London, UK, 2010.

WENGER, M. D.; WOODLING, D. Use of Mixed Mode Chromatography for the capture and purification of basic anti-body products. US Patent Number: WO 2011/049798 A1, 2011.

WIDMER, F. LEUBA, J. L. **European Journal of Biochemistry**, v. 100, p. 559-563, 1979.

ZHOU, Q.Z.K.; CHEN, X.D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.9, n. 1, p. 33-40, 2001.

ANEXO ÚNICO

Tabela A1 Coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, com os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a reposta de valor q

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T(7)	P-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Lim. Inf.	Lim. Sup.
Média	0,704832	0,106184	6,63784	0,000294	0,503658	0,906006
(1)FI (L)	-0,199101	0,099730	-1,99640	0,086075	-0,388047	-0,010155
FI (Q)	0,081563	0,109767	0,74305	0,481638	-0,126400	0,289525
(2)PH (L)	0,168612	0,099730	1,69069	0,134740	-0,020334	0,357558
PH (Q)	-0,356843	0,109767	-3,25091	0,014040	-0,564806	-0,148881
(3)SAL (L)	0,032816	0,099730	0,32905	0,751742	-0,156130	0,221762
SAL (Q)	-0,250777	0,109767	-2,28463	0,056251	-0,458740	-0,042815
1L BY 2L	-0,122500	0,130303	-0,94011	0,378459	-0,369370	0,124370
1L BY 3L	-0,007500	0,130303	-0,05756	0,955709	-0,254370	0,239370
2L BY 3L	0,052500	0,130303	0,40291	0,699039	-0,194370	0,299370

Tabela A2 Coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada, com os principais efeitos e a interação das variáveis estudadas, para a reposta de recuperação enzimática

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T(7)	P-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Lim. Inf.	Lim. Sup.
Média	2,31089	0,169633	13,62289	0,000003	1,98951	2,632273
(1)FI (L)	-1,31891	0,169238	-7,79319	0,000108	-1,63954	-0,998272
FI (Q)	-0,29672	0,179894	-1,64940	0,143054	-0,63754	0,044106
(2)PH (L)	0,34268	0,172675	1,98455	0,087592	0,01554	0,669829
PH (Q)	-0,50729	0,195347	-2,59687	0,035587	-0,87739	-0,137191
(3)SAL (L)	1,36292	0,192359	7,08530	0,000196	0,99848	1,727359
SAL (Q)	-0,27277	0,227615	-1,19838	0,269764	-0,70400	0,158466
1L BY 2L	-0,11800	0,221132	-0,53362	0,610123	-0,53695	0,300952
1L BY 3L	0,41700	0,221132	1,88575	0,101306	-0,00195	0,835952
2L BY 3L	0,61800	0,221132	2,79471	0,026727	0,19905	1,036952