

PURIFICAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO EM PEG 8000

Marcela Lazzare Brites, Juliana Ribeiro Machado, Ana Paula Rosa da Silva, Susana Juliano Kalil*.

Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Escola de Química e Alimentos, CP 474 CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil – Telefone: (53) 3233-8754

*E-mail:dqmsjk@furg.br

Introdução

A beta-galactosidase é uma enzima que hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (Rajoka *et al.*, 2003). As leveduras que fermentam este carboidrato como a *Kluyveromyces marxianus* oferecem grandes vantagens: bom rendimento de crescimento; aceitabilidade como um microrganismo seguro; e mais alta atividade de beta-galactosidase do que outras leveduras (Manera *et al.*, 2008).

Para produção em larga escala é necessário a purificação da enzima, que pode representar até 50-90% do custo de produção. Um processo eficiente deve atingir elevada pureza sem maiores prejuízos no rendimento e mantendo a atividade biológica da molécula (Cunha *et al.*, 2003). O sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser uma alternativa para o primeiro passo de purificação, por remover vários contaminantes em um processo simples e econômico e apropriado para larga escala (Mayerhoff *et al.*, 2004).

Com base no exposto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, através do sistema aquoso bifásico (SAB), verificando a influência de diferentes concentrações de Polietilenoglicol (PEG) 8000 e fosfato de potássio, nos sistemas de pH 6,0, 7,0 e 8,0 no fator de purificação e na recuperação da enzima.

Metodologia

Para a realização dos ensaios de purificação na massa molar de PEG 8000 foram determinados pontos nas curvas binodais em diferentes concentrações de PEG e fosfato de potássio, em pH 6,0, 7,0 e 8,0 de modo a se trabalhar na região bifásica, conforme Tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata e como respostas foram obtidos o fator de purificação, a recuperação da beta-galactosidase, o coeficiente de partição (K_{part}) e a razão de volumes do sistema.

Tabela 1: Composição dos sistemas PEG/sal investigadas na purificação da enzima beta-galactosidase.

Ensaio	PEG 8000					
	pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0	
	%PEG	%Sal	%PEG	%Sal	%PEG	%Sal
1	22	8	18,8	7,5	25	5
2	16	12	13	16	35	5
3	14	16	20	16	17	10
4	8	20	14	25	27	10
5	-	-	-	-	13	15
6	-	-	-	-	20	15
7	-	-	-	-	10	20

Resultados e Discussão

Nos ensaios utilizando PEG 8000 e pH 6,0 a enzima não foi purificada, obteve-se a melhor condição com 16% PEG e 12% sal, em que a recuperação da enzima foi de 45,8% na fase de fundo e fator de purificação de apenas 0,6 vezes (ensaio 2). Já no pH 7,0 obteve-se a melhor condição com 18,8% PEG e 7,5% sal, em que a recuperação da enzima foi de 89,9% na fase de fundo e fator de purificação de 1,8 vezes (ensaio 1). O incremento do pH para 8,0 conduziu a uma maior purificação, sendo que em todos os ensaios a enzima foi purificada independente da concentração de polímero ou sal utilizada. A melhor condição ocorreu utilizando-se 27% PEG e 10% sal, em que a recuperação da enzima foi de 175,2% na fase de fundo e fator de purificação de 10,1 vezes (ensaio 4). Recuperações acima de 100% podem ser obtidas em sistema de extração líquido-líquido, pois com o processo de purificação, a ação dos inibidores diminui, provavelmente pela sua localização na fase oposta à da enzima, aumentando assim sua atividade enzimática.

Conclusão

A enzima beta-galactosidase apresentou comportamento distinto ao longo das variações de cada sistema obtendo-se o melhor resultado utilizando as concentrações 27% PEG 8000 e 10% sal no pH 8,0 atingindo fator de purificação de 10,1 vezes e recuperação de 175,2% na fase de fundo.

Agradecimentos

À Fapergs, ao PROCAD/CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

CUNHA, M. T.; COSTA, M. J. L.; CALADO, C. R. C.; FONSECA, L. P.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani pisi* cutinase fusion proteins. *Journal of Biotechnology*, v. 100, p.55-64, 2003.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology Biotechnology*, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of Xylose Reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase Systems. *Biochemical Engineering Journal*, p. 217-223, 2004.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and Regulation Studies of the Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Different Substrates. *Food Technology Biotechnology*, p. 315-320, 2003.