



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA
DE ALIMENTOS

Purificação de β -galactosidase: *design* do processo

AILTON CESAR LEMES

Tecnólogo em Alimentos

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Purificação de β -galactosidase: *design* do processo

AILTON CESAR LEMES

Tecnólogo em Alimentos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
ORIENTADORA

Prof. Dr. Marco Di Luccio
CO-ORIENTADOR

RIO GRANDE, RS

2011

Aos meus exemplos de vida, Neide e Adelino. Obrigado por serem meus pais,
fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Susana. Um grande exemplo de profissional e de ser humano, com um caráter e honestidade raros. Obrigado pela formação profissional e pessoal, pela oportunidade concedida e por abrir as portas do laboratório de microbiologia e biosseparações, e principalmente, pela paciência, dedicação e apoio. Obrigado sempre!

À minha família e aos amigos, principalmente aos meus pais, por entenderem minha ausência e me apoiarem.

Aos meus “desorientados”, Juliana (e seus amigos imaginários), Marcela, Fabrício e Alexandre, pela ajuda valiosa. Vocês foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Dizem que os amigos são pra sempre quando vivem como irmãos. Carol e Luísa, como é bom poder contar com vocês. Obrigado por compartilharem bons momentos juntos, dar forças, estarem sempre ao meu lado nas horas boas e nas difíceis, e principalmente, por toda diversão que só vocês me proporcionam.

Aos “tios” Neri e Maritza, e também ao Vinícius, por me “adotarem”, e emprestarem a família de vocês. Obrigado!

À Ana Sanzo, pelos conselhos de mãe e por toda ajuda, afinal, fora da caridade não há salvação.

À Elida. Quis o destino que nos encontrássemos de novo por aqui. Obrigado pela amizade e ajuda constante, pelos momentos de descontração e pelo convívio diário.

À Jô e a Rafa, pelas risadas, pelo bate papo, pela ajuda de sempre em tudo que preciso, e principalmente, por aturarem meu mau humor.

Ao Felipe e Guido, pela ajuda e bate papo.

À Deborah pelas conversas e amizade ao longo dessa jornada.

À Prof^a Leonor, por me receber maravilhosamente bem na chegada a Rio Grande. Pequenos gestos como este nos faz saber que nossa jornada não é em vão.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações.

Ao Prof^o Dr. Marco Di Luccio pela co-orientação, e aos demais membros da banca: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Manera e Prof^o Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto, pelas contribuições ao trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
RESUMO GERAL	2
GENERAL ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	4
CAPÍTULO II	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. Enzimas	8
2.2. A enzima β -galactosidase e sua importância tecnológica	10
2.3. Leveduras <i>Kluyveromyces marxianus</i>	11
2.4. Recuperação e purificação de enzimas	13
2.5. Técnicas de purificação	14
2.5.1. Sistema aquoso bifásico (SAB)	15
2.5.2. Ultrafiltração	18
2.5.3. Precipitação com sulfato de amônio	19
2.5.4. Cromatografia de troca iônica	20
2.6. Recuperação e purificação de β -galactosidase	21
CAPÍTULO III	23
OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082 POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)	24
RESUMO	25
ABSTRACT	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Micro-organismo	27
2.2. Preparo do inóculo	27
2.3. Cultivo submerso	28
2.4. Extração da enzima	28
2.5. Purificação da enzima β -galactosidase por sistema aquoso bifásico (SAB)	28
2.5.1. Estudo de partição	28
2.5.2. Efeito da massa molar do PEG e do pH no processo de purificação	29
2.5.3. Otimização da purificação de β -galactosidase por SAB	29
2.5.4. Fator de purificação	29
2.5.5. Recuperação de β -galactosidase	30
2.5.6. Coeficiente de partição	30
2.5.7. Razão de volume do sistema	30
2.6. Métodos analíticos	31
2.6.1. Determinação de biomassa	31
2.6.2. Determinação da atividade enzimática	31
2.6.3. Determinação da proteína	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Avaliação da influência da massa molar de PEG e pH no SAB	31
3.2. Planejamento experimental completo	34
3.3. Otimização da purificação de β -galactosidase por SAB	38
4. CONCLUSÃO	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082 UTILIZANDO TÉCNICA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS.....		47
RESUMO		48
ABSTRACT		48
1. INTRODUÇÃO		49
2. MATERIAL E MÉTODOS		50
2.1. Micro-organismo		50
2.2. Preparo do inóculo.....		50
2.3. Cultivo submerso		50
2.4. Extração da enzima		51
2.5. Adsorção da enzima na membrana de ultrafiltração		51
2.6. Concentração e purificação da enzima β -galactosidase através da separação por membranas		51
2.6.1. Estudo do pH, massa molar de corte da membrana e pressão de operação		51
2.6.2. Estudo da força iônica		52
2.7. Determinação da eficiência do processo de concentração e purificação da enzima.....		53
2.7.1. Recuperação enzimática		53
2.7.2. Fator de purificação.....		53
2.7.3. Retenção de proteínas		53
2.7.4. Retenção de atividade.....		53
2.7.5. Fator de concentração de volume		54
2.7.6. Fator de concentração de proteínas		54
2.7.7. Fator de concentração de atividade.....		54
2.8. Métodos analíticos		54
2.8.1. Determinação da concentração de células		54
2.8.2. Determinação da atividade enzimática		54
2.8.3. Determinação da proteína		55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO		55
3.1. Adsorção da enzima na membrana de ultrafiltração		55
3.2. Concentração e purificação da enzima β -galactosidase através da separação por membranas		57
3.2.1. Estudo do pH e massa molar de corte da membrana.....		57
3.2.2. Estudo da pressão de operação na ultrafiltração.....		62
3.2.3. Estudo da influência da força iônica na concentração e purificação da enzima		66
4. CONCLUSÃO		69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		69
PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE: <i>DESIGN</i> DO PROCESSO		73
RESUMO		74
ABSTRACT		74
1. INTRODUÇÃO		75
2. MATERIAL E MÉTODOS		76
2.1. Micro-organismo		76

2.2. Preparo do inóculo.....	76
2.3. Cultivo submerso.....	76
2.4. Extração da enzima.....	76
2.5. Estudo do <i>design</i> de purificação da enzima β -galactosidase.....	77
2.5.1. Precipitação com sulfato de amônio.....	77
2.5.2. Cromatografia de troca iônica.....	77
2.5.3. Ultrafiltração.....	78
2.5.4. Diafiltração.....	78
2.5.5. Sistema aquoso bifásico.....	78
2.6. Fator de purificação.....	79
2.7. Recuperação de β -galactosidase.....	79
2.8. Métodos analíticos.....	81
2.8.1. Determinação de biomassa.....	81
2.8.2. Determinação da atividade enzimática.....	81
2.8.3. Determinação da proteína.....	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4. CONCLUSÃO.....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CAPÍTULO IV.....	87
4. CONCLUSÃO GERAL.....	88
CAPÍTULO V.....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, GENERAL ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 – Enzimas derivadas de micro-organismos utilizadas em aplicações industriais..... 9

Tabela 2 – Sítios ativos e outras propriedades físicas da β -galactosidase de vários micro-organismos.....11

Tabela 3 – Sistemas bifásicos utilizados na partição de biomoléculas.....17

ARTIGO I

OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

Tabela 1 – Fator de purificação (FP), recuperação (RP), coeficiente de partição ($K_{partição}$) da enzima β -galactosidase e razão de volume ($R_{razão\ volume}$) dos sistemas utilizando PEG 4000, 6000, 8000 em pH 6,0, 7,0 e 8,0.....33

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de fosfato de potássio e as respostas fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição (K) e razão de volume do sistema ($R_{razão\ volume}$).35

Tabela 3 – Análise de variância para o fator de purificação do planejamento experimental completo 2^236

Tabela 4 – Análise de variância para a recuperação da enzima β -galactosidase do planejamento experimental completo 2^237

Tabela 5 – Matriz do planejamento composto central rotacional 2^2 com três pontos centrais, valores codificados e reais para concentrações de PEG e fosfato de potássio, tendo como resposta fator de purificação, recuperação de β -galactosidase, coeficiente de partição, razão de volume do sistema.39

Tabela 6 – Análise de variância para o fator de purificação do planejamento experimental.....40

Tabela 7 – Análise de variância para recuperação de β -galactosidase no planejamento experimental.....41

ARTIGO II

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 UTILIZANDO TÉCNICA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS

Tabela 1 – Concentração e purificação de β -galactosidase utilizando membranas de 30, 50 e 60 kDa em pH 6,5, 7,0 e 7,5.....58

Tabela 2 – Efeito da pressão na concentração e purificação da enzima β -galactosidase utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5.65

Tabela 3 – Influência da força iônica na concentração e purificação da enzima β -galactosidase utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5 e pressão de 1,5 kgf/cm².68

ARTIGO III

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE: DESIGN DO PROCESSO

Tabela 1 – Avaliação do fator de purificação e recuperação em cada *design* estudado para a enzima β -galactosidase.....82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.12

Figura 2 – Diagrama de fase esquemático de um sistema aquoso bifásico.16

ARTIGO I

OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

Figura 1 – Superfície de resposta e curva de contorno para fator de purificação da enzima β -galactosidase.36

Figura 2 – Superfície de resposta e curva de contorno para recuperação de37

Figura 3 – Superfície de resposta e curva de contorno para o fator de purificação de β -galactosidase como uma função da concentração de PEG e fosfato de potássio.40

Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para recuperação de β -galactosidase como uma função da concentração de PEG e fosfato de potássio.42

ARTIGO II

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 UTILIZANDO TÉCNICA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS

Figura 1 – Célula de ultrafiltração utilizada na concentração e purificação da enzima β -galactosidase.52

Figura 2 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 6,5.55

Figura 3 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 7,0.56

Figura 4 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 7,5.56

Figura 5 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 6,5.60

Figura 6 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 7,0.60

Figura 7 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 7,5.61

Figura 8 – Fluxo de permeado na UF utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5 em pressões de 1,5, 2,0 e 2,5 kgf/cm².63

Figura 9 – Formação do *fouling* na membrana: fenômeno que ocasiona redução do fluxo de permeado.64

ARTIGO III

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE: DESIGN DO PROCESSO

Figura 1 – Diagrama esquemático dos *designs* estudados (1, 2, 3, 4 e 5) para purificação da enzima β -galactosidase utilizando diferentes passos (A, B, C e D).80

CAPÍTULO I
RESUMO GERAL, GENERAL ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

A β -galactosidase é uma enzima largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais, vegetais e micro-organismos. É utilizada industrialmente na hidrólise da lactose de leite e derivados, principalmente em produtos destinados a pessoas que apresentam intolerância à lactose, ou seja, incapacidade de digerir a lactose pela deficiência ou ausência desta enzima. O aumento da demanda industrial de β -galactosidase implica na necessidade de métodos de produção que assegurem a viabilidade econômica da hidrólise de lactose em escala comercial. Portanto, tornam-se fundamentais estudos que contemplem as etapas e a melhor sequência de purificação da enzima de modo a maximizar a pureza do processo sem prejuízos ao rendimento. Dessa forma é importante estabelecer os processos e *designs* de purificação e recuperação desta enzima. Este trabalho teve como objetivo avaliar a purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através do estudo dos parâmetros de operação do sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração, e estabelecer o melhor *design* para a purificação da enzima utilizando as técnicas de precipitação com sulfato de amônio, diafiltração, cromatografia de troca iônica, SAB e ultrafiltração. A presente dissertação foi dividida em três artigos. No primeiro artigo, o sistema aquoso bifásico foi estudado realizando uma varredura para seleção da massa molar de polietilenoglicol (PEG) (4000, 6000 e 8000) e o pH do sistema (6,0; 7,0 e 8,0) e posterior utilização da metodologia de superfície de resposta como uma ferramenta para identificar a composição do sistema capaz de maximizar o particionamento e purificação da enzima, avaliando-se a concentração do polímero e fosfato de potássio. Este processo de purificação mostrou-se eficiente, alcançando valores de fator de purificação e recuperação de 3,8 e 101,7%, respectivamente, quando o sistema foi composto por uma concentração de 14% de PEG 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio no pH 7,0. O segundo artigo apresenta a concentração e purificação da enzima β -galactosidase por ultrafiltração, onde avaliou-se a influência do pH (6,5; 7,0 e 7,5), massa molar de corte das membranas (30; 50 e 60 kDa), pressão de operação (1,5; 2,0 e 2,5 kgf/cm²) e influência da força iônica (0,01; 0,05 e 0,1 M) na. A utilização da ultrafiltração para concentração e recuperação da enzima mostrou-se satisfatória alcançando valores de até 8,1 vezes e 112,7%, respectivamente. Para a β -galactosidase a ultrafiltração não foi tão eficiente para a purificação, pois alcançou baixos valores de fator de purificação. O aumento da pressão de operação e a adição de cloreto de sódio e potássio ocasionaram prejuízos ao rendimento e a purificação da enzima. O último artigo apresenta o estabelecimento do melhor *design* para purificação e recuperação da enzima através do uso das técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, diafiltração e sistema aquoso bifásico em diferentes sequências. O *design* que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração, fornecendo um fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,3%. Dessa forma, foi possível estabelecer um *design* para purificação da enzima β -galactosidase passível de ampliação de escala (*scale up*).

Palavras-chave: sistema aquoso bifásico, troca iônica, ultrafiltração, precipitação.

GENERAL ABSTRACT

The β -galactosidase is an enzyme widely found in the nature, distributed among animals, plants and micro-organisms. It is used industrially for the lactose hydrolysis in milk and dairy products, especially in the preparation of products directed to people with lactose intolerance by enzyme deficiency or absence. Increased demand for industrial β -galactosidase leads to the necessity for production methods that ensure the economic viability of the lactose hydrolysis in commercial scale. Therefore, it is fundamental to find studies that lead to the best sequence of steps and the enzyme purification in order to maximize the process purity without compromising its performance. Thus it is important to establish the design processes considering the purification recovery of this enzyme. This study aimed to evaluate the purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 through the operation parameters study of the aqueous two-phase system (ATPS) and ultrafiltration, and establish the best purification enzyme sequence using the techniques of precipitation with ammonium sulfate, diafiltration, ion exchange chromatography, ultrafiltration and ATPS. This dissertation is divided into three articles. The first article was performed a screening to verify the polymer molecular weight (4000, 6000 and 8000), the system pH (6.0, 7.0 and 8.0) and subsequent use of response surface methodology as a tool to identify the system composition that was able to maximize the enzyme partitioning and purification, by assessing the concentration of polymer and potassium phosphate. This purification process was efficient, reaching recovery and purification factor values of 3.8 and 101.7%, respectively, when the system was composed by a 14% PEG 4000 and 15% potassium phosphate buffer concentration at pH 7.0. The second paper presents the concentration and purification of β -galactosidase enzyme by ultrafiltration where studied the influence of pH (6.5, 7.0 and 7.5), molar mass cutting the membranes (30, 50 and 60 kDa), operating pressure (1.5, 2.0 and 2.5 Kgf/cm²) and the influence of ionic strength (0.01, 0.05 and 0.1 M). The use of ultrafiltration for enzyme concentration and recovery was satisfactory reaching values up to 8.1 fold and 112.7%, respectively. The ultrafiltration was not as effective for purification, since it reached low purification factor values. The operating pressure increase and the sodium chloride and potassium addition caused injury to the enzyme yield and purification. The last paper presents the establishment of the best design for the purification and enzyme recovery through the use of precipitation techniques with ammonium sulfate, ion exchange chromatography, ultrafiltration, diafiltration and aqueous two-phase system in different sequences. The design which showed the best overall purification factor was the sequence formed by aqueous two-phase system, diafiltration, ion exchange chromatography and ultrafiltration, providing an overall purification factor of 10.8 folds and an overall recovery of 41.3%. It was possible to establish designed for β -galactosidase purification with the possibility of the process scale up.

Keywords: aqueous two-phase system, ion exchange, ultrafiltration and precipitation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A β -galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) ou lactase é uma importante enzima produzida por animais, vegetais e micro-organismos. É utilizada industrialmente na hidrólise da lactose (de leite e soro de leite) em seus monossacarídeos glicose e galactose, principalmente na elaboração de produtos destinados a pessoas com intolerância à lactose (Bansal et al., 2008; Cortez et al., 2005; Gékas & López-Leiva, 1985). A incapacidade de digestão deste carboidrato ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo, consequência congênita, ou de uma diminuição gradativa da sua atividade com o avanço da idade (Santiago, 2004).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* pode ser empregada na produção da enzima β -galactosidase, com a vantagem de ser reconhecida como segura (Generally Recognized as Safe) para a produção de alimentos e fármacos (Caballero et al., 1995). Além disso, apresenta algumas características importantes do ponto de vista industrial, como crescimento em uma ampla faixa de temperatura, necessidade reduzida de controles de contaminação no cultivo comercial, atividade enzimática superior quando comparada a outras leveduras, crescimento rápido em uma ampla variedade de fontes de carbono de baixo custo e baixa necessidade de nutrientes adicionais, tornando-a economicamente atraente para os processos comerciais (Pecota et al., 2007; Manera, 2006).

Para viabilizar a produção e a utilização da enzima β -galactosidase, são necessários processos de purificação simples e que sejam viáveis para aplicação em larga escala (Hustedt et al., 1988).

Os processos de recuperação e purificação de bioprodutos em geral são complexos e podem representar cerca de 80% do custo final do produto. Desta forma, tornam-se fundamentais estudos que contemplem as etapas de purificação da enzima e o estabelecimento de *designs*, incluindo diferentes sequências, de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento. Para redução de custos e aumento do rendimento dos processos de purificação, torna-se necessário a análise e entendimento das particularidades envolvidas no processo (Wheelwright, 1987; Naganagouda & Mulinami, 2008).

Dentre as técnicas que podem ser aplicadas na purificação de enzimas, destacam-se o sistema aquoso bifásico (SAB), precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração (UF) e cromatografia de troca iônica.

O sistema aquoso bifásico tem sido amplamente explorado para purificação de proteínas devido à alta concentração de água em ambas as fases, simulando o ambiente natural dos materiais biológicos. Isso impede que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases, garantindo a manutenção das características biológicas das moléculas, evitando desnaturações (Cardoso, 2007; Del-Val & Otero, 2003; Silva & Loh, 2006; Pessoa-Jr & Kilikian, 2005). Para a purificação, o produto alvo deve estar localizado em uma fase distinta dos contaminantes. A partição do material biológico ocorre quando dois polímeros ou um polímero e um sal, são misturados em água acima de certas concentrações, ocorrendo a formação de duas fases imiscíveis, uma rica em polímero e a outra enriquecida no outro polímero ou sal (Shang et al., 2004).

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio também é conhecida por ser útil na concentração e no fracionamento de mistura de proteínas (Lima et al., 2008). O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema.

Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre redução da interação proteínas-proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, as moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação proteínas-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso, com conseqüente precipitação (Cesar, 2005; Lima et al., 2008; Silva, 2008).

A ultrafiltração é uma técnica baseada na diferença de tamanho das macromoléculas, que pode ser aplicada tanto para a concentração, quanto para o polimento de produtos biológicos, tais como enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos. É um processo adequado para a concentração e separação de moléculas, por não requerer aditivos ou mudanças de fases, além disso, pode ser realizado isotermicamente em baixas temperaturas e pressões, com baixo consumo de energia. Este processo assegura o mínimo de desnaturação, desativação e/ou degradação dos bioprodutos que são altamente instáveis. É menos dispendioso do que outros métodos de concentração, separação e purificação (Cui, 2005; Saxena et al., 2009).

A cromatografia de troca iônica é a tecnologia mais empregada em processos de purificação de alta resolução. É utilizada para purificar moléculas de diferentes fontes, tamanhos, formas, atividades biológicas e localizações (intra ou extracelulares)

(Pessoa-Jr. & Kilikian, 2005). A separação ocorre pela troca de íons entre os solutos da amostra e os componentes iônicos da fase móvel e estacionária. A atividade biológica e a recuperação do composto de interesse são excelentes, pois as condições de eluição são brandas, geralmente gradiente salino e pH neutro (Knight, 1989; Freitag & Horváth, 1995).

De acordo com o exposto, e considerando a carência de estudos relacionados ao estabelecimento de *designs* de purificação para a enzima β -galactosidase, este trabalho propõe avaliar os parâmetros do processo de purificação e estabelecer a melhor sequência a ser utilizada na purificação e recuperação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, de modo a maximizar o rendimento e o fator de purificação.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Estabelecer o *design* do processo de purificação da enzima β -galactosidase e incrementar a pureza e a recuperação na sequência estabelecida.

1.1.2. Objetivos específicos

- Otimizar a purificação da enzima por sistema aquoso bifásico através da técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta;
- Avaliar os parâmetros de operação da técnica de ultrafiltração na purificação e recuperação da enzima;
- Associar as técnicas de purificação: precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, diafiltração, cromatografia de troca iônica e sistema aquoso bifásico, utilizando diferentes sequências de modo a estabelecer o *design* do processo;

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

As enzimas constituem um grupo de macromoléculas necessário para inúmeros eventos biológicos. Além disso, são úteis em muitos processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos (Pastore, 2010).

São catalisadores muito potentes e eficazes compostas por aminoácidos, unidos por ligação peptídica, que aceleram uma reação química, até torná-la instantânea ou quase instantânea, ao diminuir a energia de ativação. Como catalisadores as enzimas atuam em pequena quantidade e se recuperam indefinidamente. Não levam a cabo reações que sejam energeticamente desfavoráveis, não modificam o sentido dos equilíbrios químicos, mas aceleram sua realização (Kieling, 2002).

A determinação da atividade enzimática da enzima, ou seja, a capacidade de reagir com determinados constituintes das células envolve a medida da velocidade de reação (Kieling, 2002). Segundo Moura et al. (2007), “uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto”, nas condições estabelecidas de ensaio (pH, temperatura, substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

As enzimas podem ser obtidas de animais (amilase pancreática, lipase pancreática, pancreatina, pepsina, quimosina), vegetais (α -amilase, β -amilase, bromelina, ficina, papaína) e diversos micro-organismos (leveduras, bactérias, fungos) (Vitolo, 2001).

As enzimas microbiológicas possuem vantagens sobre as de origem animal ou vegetal, pois possui menor custo em sua produção e a possibilidade de produção em larga escala, oferece um amplo espectro de características físico-químicas (Gasparin & Santana, 2007).

A Tabela 1 apresenta as enzimas derivadas de micro-organismos utilizadas em aplicações industriais.

Tabela 1 – Enzimas derivadas de micro-organismos utilizadas em aplicações industriais.

Enzimas	Origem	Ação nos alimentos	Aplicação em alimentos
α-amilase	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólise de goma de trigo	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, auxilia produção de açúcares na fermentação
	<i>Bacillus spp.</i>		
	<i>Microbacterium imperiale</i>		
Catalase	<i>Aspergillus niger</i>	Quebra do peróxido de hidrogênio e oxigênio em água	Tecnologia de remoção de oxigênio combinado com oxidase de glicose
	<i>Micrococcus luteus</i>		
Celulase	<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólise de celulose	Liquefação de frutas para produção de sucos
	<i>Trichoderma spp.</i>		
Quimosina	<i>Aspergillus awamari</i>	Hidrólise de kappa-caseína	Coagulação do leite para fabricação de queijo
	<i>Kluyveromyces lactis</i>		
Ciclodextrina glucano-transferase	<i>Bacillus spp.</i>	Síntese da goma ciclodextrina	Ciclodextrinas são alimentos encapsulados e vitaminas
β-galactosidase	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose	Leite adoçado e soro; produtos para pessoas com intolerância a lactose; redução da cristalização em sorvetes que contem soro; melhora da funcionalidade da proteína concentrada de soro; fabricação de lactulose
	<i>Kluyveromyces spp.</i>		
Glicose	<i>Actinplanes missouriensis</i>	Conversão de glicose em frutose isomerase	Produção de frutose em xarope de milho (bebidas doces)
	<i>Bacillus coagulans</i>		
Lipase	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e esterase de éster	Tempero em produtos de queijo; modificação da função de gordura por interesterificação; hidrólise de sínteses éster alquil em ácidos graxos e álcool
	<i>Cândida spp.</i>		
	<i>Rhizopus spp.</i>		
Pectinase	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólise de pectina	Clarificação de sucos de frutas
	<i>Penicillium funiculosum</i>		
Protease	<i>Aspergillus spp.</i>	Hidrólise de kappa-caseína; hidrólise de proteínas animais e vegetais	Coagulação do leite para fabricação de queijo; produção de hidrolisados para sopas e melhoria da qualidade de massa do pão
	<i>Rhizomucor miehei</i>		
	<i>Bacillus spp.</i>		
	<i>Penicillium citrinum</i>		

Fonte: Eisenmenger & Reyes-de-Corcuera, 2009.

A pesquisa de enzimas e sua atuação, assim como os processos de purificação é de interesse estratégico, pois garantem o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais tornando possível o desenvolvimento de sistemas enzimáticos viáveis (Gasparin & Santana, 2007).

2.2. A enzima β -galactosidase e sua importância tecnológica

A β -galactosidase ou lactase (EC 3.2.1.23) é uma enzima produzida por animais, vegetais e micro-organismos. É classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar seus monossacarídeos glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galacto-oligossacarídeos (Santiago, 2004).

É utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia principalmente na elaboração de produtos destinados a pessoas com intolerância à lactose e para aumentar o valor e as possibilidades de uso destes produtos (Bansal et al., 2008; Cortés et al., 2005).

A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como “deficiência de lactase do adulto” e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade, causando sintomas como diarreia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços (Santiago et al., 2004).

Embora exista uma grande variação no número de pessoas intolerantes à lactose em diferentes países do mundo, uma média de 70% da população sofre com esse problema, o que torna a importância da β -galactosidase ainda maior. A necessidade de baixa lactose no leite é importante, pois evita a desidratação tecidual grave, diarreia e até mesmo a morte em crianças e adultos intolerantes (Bansal et al., 2008).

A lactose tem uma baixa solubilidade resultante da formação de cristais em concentrações acima de 11%, o que impede a utilização de xaropes concentrados de soro de leite em muitos processos de alimentos. Além de seu uso justificado pela sua atividade hidrolítica, a atividade de transgalactolisação pode ser útil na síntese de glicoconjugados e galacto-oligossacarídeos para aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos (Eisenmenger & Reyes-de-Corcuera, 2009).

Vários micro-organismos são capazes de produzir a β -galactosidase, dentre eles as leveduras, como *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*; fungos filamentosos, como *Talaromyces thermophilus*, *Penicillium multicolor* e bactérias, como *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pentosus* (Rodriguez, 2006).

As principais β -galactosidasas comerciais são produzidas a partir de leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, sendo o restante da bactéria *E. coli*, porém enzimas produzidas por leveduras são as mais utilizadas para o tratamento do leite e produtos lácteos (Dagbagli & Goksungur, 2008). Embora as enzimas derivadas de diferentes origens microbianas tenham propriedades diferentes, como o peso da molécula, o comprimento da cadeia de proteína, bem como a posição do sítio ativo, a β -galactosidase apresenta o mesmo aminoácido terminal, ácido glutâmico, como seu sítio ativo, conforme Tabela 2 (Zhou & Chen, 2001).

A enzima é sintetizada na presença do indutor lactose e a sua produção aumenta durante a fase de crescimento da levedura e alcança produção máxima no início da fase estacionária de crescimento, após a qual, a quantidade de enzima diminui (Inchaurreondo et al., 1998).

Tabela 2 – Sítios ativos e outras propriedades físicas da β -galactosidase de vários micro-organismos.

Origem da enzima	<i>K. lactis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli (sub unidade)</i>	<i>A. niger</i>
Massa molar (Da)	117618	116351	118016	119160
Comprimento (AA*)	1025	1023	1031	1006
Doador de prótons	Glu	Glu	Glu	Glu
Nucleófilo / base	Glu	Glu	Glu	Glu

*aminoácidos

Fonte: Zhou & Chen, 2001.

2.3. Leveduras *Kluyveromyces marxianus*

A *Kluyveromyces marxianus* (Figura 1) é uma levedura anteriormente designada por *K. fragilis* ou *S. fragilis*, utilizada na produção da enzima β -galactosidase. É reconhecida e considerada como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos, no entanto, a utilização de *K. marxianus* para a produção de proteínas a nível industrial não foi

extensa nas últimas décadas, principalmente devido a fatores econômicos, o que sugere estudos para sua viabilidade (Caballero et al., 1995).

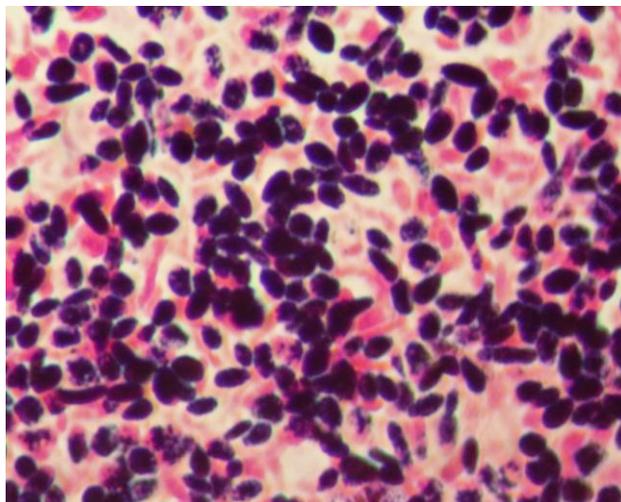


Figura 1 – Levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

A utilização de *Kluyveromyces marxianus* tem diversas características que a tornam uma excelente opção para a produção industrial, como seu bom rendimento de crescimento em uma ampla faixa de temperatura. Esta espécie pode ser cultivada em altas temperaturas de até 52°C, reduzindo a necessidade de controles de contaminação no cultivo comercial, pois a maioria dos organismos encontrados em um ambiente industrial não pode crescer nesta temperatura (Pecota et al., 2007).

A atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* é mais alta quando comparadas a outras leveduras (Manera, 2006).

Ela também cresce rapidamente em uma ampla variedade de fontes de carbono de baixo custo e tem baixa necessidade de nutrientes adicionais, tornando-as economicamente atraentes para os processos comerciais (Pecota et al., 2007).

Diversos trabalhos têm sido publicados sobre a produção e os efeitos de uma variedade de condições de cultivo sobre a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* (Caballero et al., 1995; Cortés et al., 2005).

Alguns trabalhos reportam o estudo dos meios de cultivo para incrementar a produção de β -galactosidase (Hsu et al., 2005; Inchaurredo et al., 1998; Manera et al., 2008; Marquez et al., 2003) e a utilização de diferentes substratos (Rajoka et al., 2003). Já Sousa (2005), estudou a influência da aeração na síntese desta enzima, e Cortés et al. (2005), estudaram a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* durante a variação da taxa de oxigênio dissolvido, encontrando maiores

atividades desta enzima quando comparado a ensaios com taxa de oxigênio constante, porém, ainda não existem trabalhos que contemplem completamente os mecanismos de recuperação e purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*.

2.4. Recuperação e purificação de enzimas

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação (Zuñiga et al., 2003).

Produtos farmacêuticos são os que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Uma medida dessa complexidade é o custo do processo de purificação, o qual pode ficar em torno de 70-80% do custo final do produto e a dificuldade do processo, pois as moléculas de proteínas, além de serem diluídas em uma mistura complexa, são instáveis e sujeitas a desnaturação por aquecimento, solventes e até mesmo na ruptura (Cui, 2005; Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

Uma das características da biotecnologia é a variedade de produtos que pode gerar. Essa diversidade possibilita um grande espectro de métodos de separação de bioprodutos que podem ser empregados para que se atinja um produto de acordo com os requeridos graus de concentração e de pureza. A escolha e sequência das técnicas de separação a serem utilizadas são muito importantes a fim de minimizar as perdas e aumentar o rendimento nas múltiplas operações de separações (Belter et al., 1988).

Vários métodos de separação de proteínas baseiam-se nas diferenças das propriedades físicas, químicas e funcionais. As principais propriedades exploradas são cargas, tamanho, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, forma e função (Belter et al., 1988).

O maior objetivo das técnicas de recuperação de bioprodutos (*downstream processing*) tem sido o desenvolvimento das operações unitárias que combinem alta eficiência, mas ao mesmo tempo procurando-se reduzir o número de passos necessários para concentrar e/ou purificar até determinado grau a molécula alvo.

As necessidades de isolamento e recuperação em grande escala têm trazido inovações importantes nas operações unitárias necessárias para os esquemas de tratamento e de purificação destas proteínas (Pereira, 1999).

Cada enzima possui uma combinação única de propriedades que são exploradas pelas técnicas de purificação. Estas devem ser avaliadas em relação à sua capacidade, poder de resolução, seletividade, rendimento e custos. A capacidade da técnica está relacionada com a quantidade de amostra, em volume ou em concentração de proteína que pode ser manuseada. Um requisito chave no início do processo de purificação é o da redução de volume onde se encontra a proteína que se deseja purificar.

No esquema proposto por Belter (1988), a purificação de biomoléculas exige o emprego de muitas técnicas devendo-se buscar a mais apropriada para cada estágio de separação. Assim, são empregadas técnicas diferentes na remoção de compostos insolúveis ou clarificação, no isolamento do produto ou captura, na purificação intermediária e no polimento.

O esquema ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto.

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho de desenvolvimento para adequar a melhor técnica ao processo, a transferência da metodologia para a escala de produção, garantindo que o produto final tenha todas as características estabelecidas anteriormente para seu uso em humanos, para diagnóstico ou uso veterinário (Ho et al., 2000).

2.5. Técnicas de purificação

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação. Técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, com alto grau de seletividade (Cesar, 2000).

Dado as variadas características das biomoléculas, não existe um processo de purificação de aplicação geral. Estes devem ser selecionados de modo a promoverem melhor fator de purificação do bioproduto de interesse.

Técnicas de alta capacidade, tal como a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração e sistema aquoso bifásico podem ser empregadas nos processos de purificação de proteínas.

2.5.1. Sistema aquoso bifásico

Desde o final da década de 50, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) têm sido usados com sucesso na extração de biopartículas (como vírus, ácidos nucleicos e proteínas), compostos inorgânicos e orgânicos e até mesmo para extração de íons (Silva et al., 2006).

O SAB é uma técnica de purificação constituída de duas fases aquosas imiscíveis. As proteínas são purificadas pelo resultado da partição diferenciada da molécula-alvo e das impurezas presentes em cada uma das fases líquidas. É composto majoritariamente por água, 75 a 80%. Esta alta concentração de água em ambas as fases simula o ambiente natural dos materiais biológicos, impedindo assim, que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases, o que garante a manutenção das propriedades biológicas das moléculas evitando desnaturações (Cardoso, 2007; Silva et al., 2006; Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

Seus demais componentes formadores (polímeros e sais inorgânicos) não são tóxicos nem inflamáveis, o que os torna um sistema de extração seguro, comercialmente acessível e de baixo custo (Silva et al., 2006; Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

O SAB têm sido proposto e aplicado no lugar da separação e concentração convencional de células, uma vez que pode integrar estas duas etapas numa só (Chouyyok et al., 2005).

Quando pares de polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis ou um polímero hidrossolúvel e um sal inorgânico são misturados em água acima de concentrações críticas e em determinadas condições termodinâmicas forma-se o SAB, isto, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes.

Cada SAB pode ser caracterizado por um único diagrama de fases, que contem a composição das fases em equilíbrio para o sistema. Os dados fundamentais para qualquer tipo de processo de extração líquido-líquido são as composições de equilíbrio de fases. No caso do SAB, um diagrama de fases é necessário para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos para sua predição (Oliveira, 1999; Silva & Loh, 2006). Ele pode ser influenciado por muitos fatores incluindo massa

molecular e carga do polímero, temperatura, pH, hidrofobicidade, tamanho, adição de sal ou ligantes ao sistema (Campese e Tambourgi, 2003).

O diagrama de fases (Figura 2) demonstra a concentração de sal e a concentração do polímero presente no sistema em composições globais diferentes (P1, P2 e G) em linhas de amarração diferentes. Dessa forma, o diagrama informa em quais composições o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal. A posição da linha binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio (Silva e Loh, 2006), ela é formada por pontos cujas coordenadas são as mínimas concentrações de sal e de polímero nas quais o sistema apresenta-se como duas fases em equilíbrio termodinâmico. Abaixo da linha binodal tem-se a região formada por pontos representando concentrações que formam um sistema monofásico, e acima, a região formada por pontos que formam duas fases.

Estas concentrações podem ser expressas em qualquer unidade, porém, geralmente elas são expressas em % mássico (Cardoso, 2007).

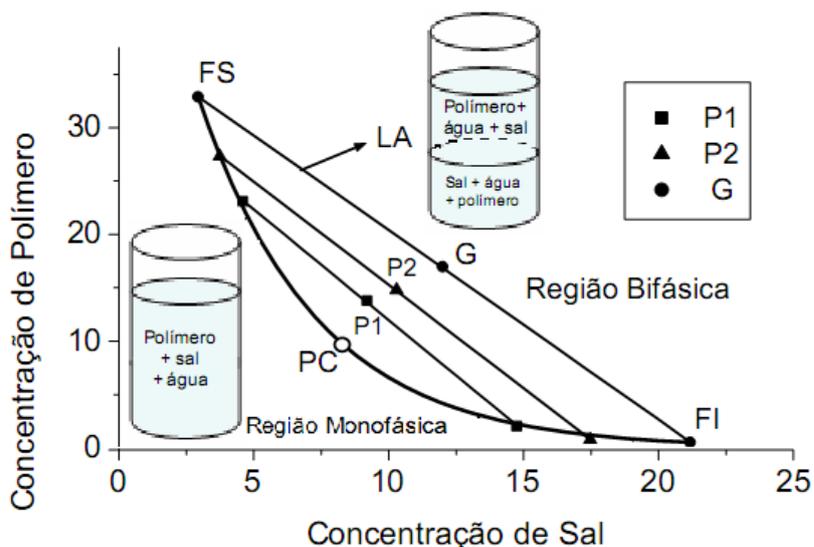


Figura 2 – Diagrama de fase esquemático de um sistema aquoso bifásico.

Fonte: Cardoso, 2007.

Uma das características atrativas da extração por SAB é a facilidade de *scale-up*, ou seja, aumento de escala. Isto deve-se ao fato que o coeficiente de partição para substâncias solúveis em muitos casos é independente do volume total das fases do sistema, da razão de volume e da concentração da substância a ser particionada para uma larga faixa de concentração. O comportamento da partição em larga escala para o SAB pode então ser pré-definido com grande exatidão de experimentos laboratoriais

em pequenos tubos testes. Desta forma, a mistura e o rápido equilíbrio de fases são facilmente alcançados, requerendo relativamente pouca energia (Oliveira, 1999).

A utilização do polietilenoglicol (PEG) neste sistema torna-se vantajosa devido às propriedades físico-químicas favoráveis e seu baixo custo, que parece ter melhorado as possibilidades de emprego do SAB em escala industrial. Esta substância ganha destaque pelo fato de ser atóxica e ter sido aceita para aplicações em alimentos e produtos farmacêuticos (Campese & Tembourgi, 2003; Tanuja et al., 2000).

Os SAB's são continuamente aplicados para a extração e a purificação de inúmeros materiais biológicos. A Tabela 3 relaciona alguns SAB's e os principais bioprodutos particionados neles (Cardoso, 2007).

Tabela 3 – Sistemas bifásicos utilizados na partição de biomoléculas.

Bioproduto	Sistema aquoso bifásico	
	Polímero 1	Polímero 2 (ou sal)
β -lg, antitripsina, caseína	PEO ^a	K ₃ PO ₄ ou MgSO ₄
Amiloglucosidase	PEO	Na ₂ SO ₄
Albumina bovina	Dextrana	Ficoll, tampão fosfato
Albumina humana	Dextrana	Ficoll
Insulina	PEO – PPO – PEO ^b	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄
Cisteína, fenilalanina, metionina e lisina.	PEO	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄
Proteínas anticorpos	PEO	Na ₂ HPO ₄ / K ₂ HPO ₄
Morfina	PEO	K ₂ HPO ₄
Protease de <i>Bacillus subtilis</i>	PEO	K ₂ HPO ₄ / K ₂ HPO ₄
Lisozima	PEO	Na ₂ SO ₄
β -glucosidase	PEO	K ₂ HPO ₄ / K ₂ HPO ₄
α -lg, β -lg e α -1 antitripsina	PEO	Citrato de sódio
Rotavírus	PEO	NH ₄ SO ₄

Fonte: Cardoso, 2007.

^aPEO – polióxido de etileno

^bPEO–PPO–PEO- polióxido de etileno, propileno e etileno.

2.5.2. Ultrafiltração

Dentre os processos de separação com membranas destaca-se a ultrafiltração (UF), que é uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das macromoléculas, com potencial para aplicação em larga escala, tanto para a purificação, como para o polimento de produtos biológicos, tais como enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos (Ghosh & Cui, 1998).

A maior vantagem dos processos de bioseparação por ultrafiltração sobre os processos convencionais é o alto rendimento do produto. No entanto, apesar do uso generalizado da ultrafiltração em processos como a filtração e concentração, o potencial para a sua utilização no fracionamento de proteína não tem sido explorado na indústria biotecnológica. Isto ocorre principalmente à falta de compreensão dos mecanismos de separação envolvidos na ultrafiltração de proteínas. Existem diversos fatores envolvidos no processo de separação e fracionamento de proteínas por ultrafiltração: interação soluto-soluto, interação soluto-membrana, polarização, modo de transporte do soluto, entre outros vários fatores que podem ser responsáveis pelo fracionamento de proteína; e pelo fato da maioria dos trabalhos de ultrafiltração na área de fracionamento de proteínas se basear apenas na simulação da separação de misturas de proteínas. Isso levou a uma melhor compreensão dos mecanismos de transporte e separação das proteínas, porém a falta de aplicação baseada em pesquisa manteve a ultrafiltração distante dos potenciais utilizadores (Zuñiga et al., 2003).

O processo de ultrafiltração pode ser ajustado para atingir alta produtividade e pureza do produto ao mesmo tempo. O produto fica livre de partículas estranhas se a operação for realizada sob condições estéreis (Ghosh & Cui, 2000).

Separações com membranas não requerem aditivos ou mudanças de fases e podem ser realizadas isotermicamente em baixas temperaturas e pressões, com menor consumo de energia. Asseguram o mínimo de desnaturação, desativação e/ou degradação dos bioprodutos que são altamente instáveis. Além disso, é menos dispendioso do que outros métodos de separação e purificação (Cui, 2005; Saxena et al., 2009).

O fracionamento de proteína utilizando ultrafiltração é um processo complexo e as condições deste sistema como a taxa de cisalhamento na superfície da membrana, a pressão, resistência da membrana, porosidade, morfologia e carga de superfície podem afetar no processo de separação destes bioprodutos.

Neste processo, a obtenção de boa resolução e alta produtividade é fortemente dependente das condições de operação (Ghosh et al., 2000, Ghosh e Cui, 2000) e da diferença de tamanho e carga entre as proteínas presentes.

2.5.3. Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas de origem microbiana, animal ou vegetal (Lima et al., 2008; Moraes, 2006).

O sulfato de amônio saturado altera as características estruturais das proteínas fazendo com que as mesmas percam a capacidade de se tornarem solúveis, sendo assim, na presença deste as proteínas precipitam (Oliveira, 2007).

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação inter-proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação das proteínas. Esse processo é também conhecido por *salting-out* (Cesar, 2005; Lima et al., 2008; Silva, 2008).

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. (Lima et al., 2008).

O sulfato de amônio tem sido o sal mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixa toxicidade e densidade de suas soluções, e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução, além de ser de baixo custo mesmo em alta pureza (Lima et al., 2008; Silva, 2008).

Como vantagem adicional, a precipitação reduz o volume do material, o que é normalmente um ponto importante a ser considerado. No entanto, esta técnica possui

um grande inconveniente: o sal deve ser eliminado posteriormente da suspensão por diálise ou ultrafiltração/diafiltração para as etapas de purificação subsequentes (Moraes, 2006).

2.5.4. Cromatografia de troca iônica

Diferentes formatos de processos cromatográficos são disponíveis para purificação de proteínas, incluindo troca iônica, afinidade, interação hidrofóbica e exclusão por tamanho (Medeiros, 2008).

A cromatografia de troca iônica é o método de purificação de proteínas mais comumente empregado, onde a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Além disso, é utilizado com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica para o escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (Zuñiga et al., 2003).

A separação, como o próprio nome diz, acontece por troca de íons entre os solutos da amostra e os componentes iônicos da fase móvel e estacionária. Naturalmente, os processos cromatográficos por troca-iônica apresentam alta capacidade, e são utilizados nos passos iniciais do processo de purificação (Cecchi, 2003).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na distribuição dos componentes a serem separados em uma fase estacionária, ou ligante, e uma fase móvel que conduz esse componente pela fase estacionária. Em sua forma mais simples a fase estacionária consiste em um leito empacotado dentro de uma coluna. A mistura de componentes entra na coluna cromatográfica junto com a fase móvel e cada componente individual é fixado pelo sistema a diferentes taxas dependendo da sua interação com a fase estacionária e vazão da fase móvel (Gosh, 2003).

Uma separação cromatográfica típica consiste em quatro estágios: adsorção, lavagem, eluição e regeneração da coluna. O princípio da adsorção é transferir a substância de interesse da fase móvel para a fase estacionária. Para uma adsorção eficiente a coluna e a amostra devem estar equilibradas com o tampão contendo as condições ótimas para a ligação. A lavagem consiste da passagem de solução tampão para eliminação das impurezas. O estágio de eluição é o estágio onde ocorre a dessorção, resultando no deslocamento da proteína do ligante. O eluente pode então ser removido da matriz por uma limpeza posterior (Moraes, 2006).

Essa técnica cromatográfica é comumente utilizada para purificar proteínas, pois, em comparação com outros métodos de purificação, apresenta as seguintes características: simples, fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versatilidade. Pode ser desenvolvida, aplicada e utilizada em nível laboratorial e ampliada à escala industrial, principalmente em setores como as indústrias alimentícias e farmacêuticas que requerem um alto grau de pureza destes componentes utilizados tanto no processamento como na composição de alimentos, medicamentos e setor de análises clínicas. Quando se visa alto rendimento, menor tempo de processo, maior eficiência e diversas outras vantagens associadas à utilização desta técnica de purificação e das proteínas isoladas.

A cromatografia de troca iônica além da purificação de enzimas pode ser utilizada na deionização de água, despigmentação de licores, análise de elementos, preparação e purificação de macromoléculas, separação de drogas e seus metabólitos (Collins et al., 2005), purificação de corantes (Moraes & Kalil, 2009), processos de tratamento da dureza de água, metais em traços, ácidos orgânicos em frutas, proteínas, aminoácidos e vitaminas (Cecchi, 2003).

2.6. Recuperação e purificação de β -galactosidase

Inúmeros são os trabalhos associados ao isolamento e caracterização de micro-organismos produtores de β -galactosidase (Brady et al., 1995; Ornelas et al., 2008), condições de produção (Alves et al., 2010; Manera, 2006), imobilização e produção de galacto-oligossacarídeos (Ates & Mehmeto, 1997; Chockchaisawasdee, 2005; Giacomini et al., 2001; Serio et al., 2003; Splechtna et al., 2006), porém poucos relatam as etapas de *downstream*, ou seja, as etapas de recuperação e purificação desta enzima.

Pesquisas sobre a purificação de β -galactosidase por ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, precipitação com sulfato de amônia e cromatografia de troca iônica são limitadas, assim como a definição de um *design* de purificação adequado para esta enzima, necessitando de estudos.

Kuhn et al. (2006) verificaram que a melhor porcentagem de saturação para obter uma maior purificação da enzima β -galactosidase a partir de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 é a saturação com sulfato de amônio em 70% e uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,6.

Alcântara et al. (2006) estudaram a purificação de β -galactosidase de cotilédones de *Hymenaea courbaril* utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, centrifugação e permeação em gel, obtendo um aumento de 1,19, 7,6, 2,5 e 13,5 vezes na atividade específica, respectivamente, com uma recuperação final de apenas 0,63%.

Medeiros (2008), estudou a adsorção e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica utilizando resina aniônica Q Sepharose Fast Flow, obtendo fatores de purificação de 12 vezes e rendimento de 85,5% com pH de eluição de 5,5 e volume para gradiente salino igual a vinte vezes o volume do leite.

Silva (2009) purificou a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas. Na purificação por SAB utilizando polietilenoglicol 8000 e tampão fosfato de potássio obteve um fator de purificação de 10,1 vezes e recuperação de 175,2%. Já na ultrafiltração a membrana que apresentou melhores resultados foi a de 50 kDa, permitindo uma recuperação de 63,3% e fator de concentração de 7,6 vezes, constatando que a mudança de pH e força iônica da solução enzimática não melhoraram a separação.

Embora a enzima β -galactosidase tenha uma grande importância industrial, a literatura apresenta poucos dados sobre a recuperação e purificação desta enzima de *Kluyveromyces marxianus*, e não constam publicações e dados sobre o *design* do processo de purificação.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Artigo I

OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

RESUMO

A β -galactosidase é uma enzima utilizada na elaboração de produtos enriquecidos com galacto-oligossacarídeos e destinados a pessoas com intolerância à lactose. Para sua utilização efetiva são necessários processos de purificação que resultem em aumento da pureza sem maiores prejuízos no rendimento. O sistema aquoso bifásico (SAB) tem sido amplamente explorado pelo seu baixo custo e pela manutenção das propriedades biológicas das moléculas, evitando desnaturações. Neste estudo, foi realizada uma varredura para seleção da massa molar do polímero e pH do SAB e posterior utilização da metodologia de superfície de resposta para identificar a composição do sistema capaz de maximizar o particionamento e purificação da enzima, avaliando-se a concentração do polímero e do fosfato de potássio. Este processo de purificação mostrou-se eficiente, alcançando valores de fator de purificação e recuperação de 3,8 e 101,7%, respectivamente, com o sistema composto por uma concentração de 14% de polietilenoglicol de massa molar 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio no pH 7,0.

Palavras-chaves: enzima, polietilenoglicol, fator de purificação, recuperação, coeficiente de partição.

OTIMIZATION OF β -GALACTOSIDASE PURIFICATION BY *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 USING AQUEOUS TWO-PHASES SYSTEM

ABSTRACT

The β -galactosidase is an enzyme used to elaborate products enriched with galactooligosaccharides and directed to people who suffer with lactose intolerance. The increase of the industrial demand for β -galactosidase production implies in the need for production methods that ensure the economic viability of lactose hydrolysis in a commercial scale. For effective use simple purification processes are required, which result in an increased purity without major losses in the yield. The aqueous two-phase system (ATPS) has been widely exploited for its low cost and keeping biological properties of molecules, preventing denaturation. In this study, we performed a screening to verify the polymer molecular weight and pH of the ATPS. Response surface methodology was used to identify the system composition able to maximize the enzyme partitioning and purification, by assessing the polymer concentration and potassium phosphate. This purification process was efficient, reaching recovery and purification factor values of 3.8 and 101.7%, respectively, the system composed a concentration of 14% polyethylene glycol of molecular weight 4000 and 15% buffer potassium phosphate at pH7.0.

Keywords: enzyme, polyethylene glycol, purification factor, recovery, partition coefficient.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase ou lactase (EC 3.2.1.23) é uma enzima produzida por animais, vegetais e micro-organismos. É classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar seus monossacarídeos glicose e galactose (Santiago, 2004). É utilizada na elaboração de produtos hidrolisados enriquecidos com galactooligosacarídeos e produtos destinados a pessoas com intolerância à lactose pela diminuição do teor deste carboidrato (Bansal et al., 2008; Cortes et al., 2005).

As enzimas de origem microbiana, em particular as oriundas de leveduras, possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (Oliveira et al., 2006).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* pode ser utilizada na produção da enzima β -galactosidase com a vantagem de ser reconhecida como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos (Caballero et al., 1995).

A variedade de produtos gerados nos processos biotecnológicos requer técnicas para separação e purificação do produto alvo, que resultem em elevado grau de pureza, baixo custo, minimização de perdas e aumento do rendimento das operações de separação (Belter et al., 1988). Os processos de purificação são complexos e seus custos podem representar cerca de 70-80% do valor final do produto (Naganagouda & Mulinami, 2008). Assim, são necessários processos simples e com materiais de baixo custo, que sejam viáveis para a purificação de proteínas em grande escala (Hustedt, et al., 1998).

A otimização da recuperação e purificação de enzimas é muito importante para o aumento de escala em processos enzimáticos, existindo um interesse crescente no desenvolvimento de operações eficientes e capazes de elevar o rendimento dos processos de purificação (Faria, 2009).

O sistema aquoso bifásico tem sido amplamente explorado para purificação de proteínas pela alta concentração de água em ambas as fases, simulando o ambiente natural dos materiais biológicos, impedindo assim, que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases, o que garante a manutenção das propriedades biológicas das moléculas e evita desnaturações (Cardoso, 2007; Del-Val & Otero, 2003; Silva & Loh, 2006; Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

A purificação pela partição do material biológico através do sistema aquoso bifásico pode ocorrer pela combinação de um polímero e um sal solúvel em água. Este particionamento pode ser manipulado alterando-se as condições dos sistemas, tais como pH, massa molar do polímero e composição das fases (Wongmongkol & Prichanont, 2006), de modo que o produto alvo se localiza em uma fase diferente dos contaminantes.

Neste trabalho, foi estudada a otimização da purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando sistema aquoso bifásico. Os efeitos do pH, da massa molar do polímero, da concentração do polímero e do fosfato de potássio foram investigados, tendo como respostas o fator de purificação e a recuperação enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedido pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP, e selecionado por Manera et al. (2008) como produtor da enzima β -galactosidase. A cepa foi mantida a 4°C em tubos inclinados, contendo ágar YM (ágar extrato de malte e levedura), composto por (g.L⁻¹): extrato de malte (3,0), extrato de levedura (3,0), peptona (5,0), glicose (10,0) e ágar (20,0).

2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (Pinheiro et al., 2003). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, exceto a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração em membrana de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,22 μ m de diâmetro de poros. Após a esterilização, o meio foi resfriado a temperatura ambiente para adição da lactose esterilizada por filtração e em seguida realizou-se a inoculação da levedura. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm por 24 h (Manera et al., 2008).

2.3. Cultivo submerso

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (17,0), (NH₄)₂SO₄ (8,8), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (28,2), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0. A lactose e o meio de cultivo foram esterilizados conforme descrito no item 2.2. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 30°C, 180 rpm por 96 h (Manera et al., 2008).

2.4. Extração da enzima

A enzima foi extraída em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro. Para isso, foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min, com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 4°C, 10 min). Um mililitro de célula em suspensão foi obtido por ressuspensão de células, equivalente a 40 mg de célula seca, em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 para obter um volume final de 1 mL (Medeiros et al., 2008).

2.5. Purificação da enzima β-galactosidase por sistema aquoso bifásico (SAB)

2.5.1. Estudo de partição

O sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio foi preparado em tubos graduados de centrífuga através da adição de quantidades apropriadas de PEG na massa molar estudada e tampão fosfato de potássio (30% e 40% (m/m)) no pH desejado. O tampão fosfato foi adicionado de forma a garantir a concentração de sal. Água foi adicionada até atingir uma quantidade final de 80% (m/m). O conteúdo destes tubos foi homogeneizado mecanicamente em vórtex para completa dissolução do polímero, o sistema foi mantido a 4°C e 20% (m/m) de extrato enzimático de β-galactosidase equilibrado no respectivo pH do sistema, foi adicionado. O sistema foi homogeneizado em agitador tipo vórtex e centrifugado por 10 min, a 4700xg e 4°C. Os volumes das fases foram medidos e as fases de topo e fundo foram separadas e analisadas em termos de atividade enzimática e proteína total. Para verificar a

interferência dos componentes (PEG/fosfato de potássio) nas análises realizadas, sistemas controles foram formados, onde a enzima foi substituída por água.

2.5.2. Efeito da massa molar do PEG e do pH no processo de purificação

Para a realização dos ensaios de purificação nas diferentes massas molares de PEG (4000, 6000 e 8000) e pH (6,0, 7,0 e 8,0), foram selecionados sistemas próximos aos estudados por Silva (2009), que apresentaram purificação; e concentrações de PEG e fosfato de potássio enquadradas acima da curva binodal no diagrama de fases (Tabela 1), garantindo assim a separação das fases. Sistemas em que a enzima migrou preferencialmente para a fase rica em fosfato de potássio foram levados em consideração. Como respostas foram obtidas: fator de purificação e recuperação enzimática.

2.5.3. Otimização da purificação de β -galactosidase por SAB

A otimização da purificação e recuperação da enzima β -galactosidase foi realizada através de uma sequência de planejamentos experimentais completos 2^2 para avaliar a influência da concentração de PEG e tampão fosfato de potássio no sistema. Foram obtidos como respostas o fator de purificação e a recuperação da enzima. Os níveis das variáveis, assim como os valores reais, estão apresentados nas Tabelas 2 e 5 para o primeiro e segundo planejamento, respectivamente. A análise dos dados foi realizada através *software Statistica 7.0*.

A massa molar do polímero e o pH foram fixados em 4000 e 7,0, respectivamente, para todos os ensaios, baseado nos ensaios obtidos durante a varredura.

2.5.4. Fator de purificação

O fator de purificação (FP) foi calculado através da Equação 1 (Porto et al., 2008), sendo uma medida para acompanhar as operações de purificação. É definido como a relação entre a atividade específica da β -galactosidase após uma etapa de purificação e a atividade específica de entrada (a partir do extrato aquoso de enzima ou de uma etapa de purificação anterior).

$$FP = \frac{\text{atividade específica da fração purificada}}{\text{atividade específica de entrada}} \quad (1)$$

2.5.5. Recuperação de β -galactosidase

A recuperação (RP) da β -galactosidase foi calculada através da Equação 2 (Porto et al., 2008), e é definida como a relação da atividade total da enzima coletada em uma fase aquosa após o processo de purificação e a atividade enzimática total adicionada ao sistema.

$$RP = \frac{\text{Atividade da enzima purificada} \times \text{Volume purificado}}{\text{Atividade do extrato enzimático} \times \text{Volume alimentado}} \times 100 \quad (2)$$

2.5.6. Coeficiente de partição

O coeficiente de partição ($K_{\text{partição}}$) para a β -galactosidase foi calculado através da Equação 3 (Pericin et al., 2009), pela relação da atividade da enzima na fase de topo e a atividade da enzima na fase de fundo.

$$K_{\text{partição}} = \frac{\text{Atividade enzima (Fase de topo)}}{\text{Atividade enzima (Fase de fundo)}} \quad (3)$$

2.5.7. Razão de volume do sistema

A razão de volume do sistema ($R_{\text{razão volume}}$) foi calculada através da Equação 4 (Nalinanon et al., 2009), pela relação do volume da fase de topo e o volume da fase de fundo.

$$R_{\text{razão volume}} = \frac{\text{Volume na fase de topo}}{\text{Volume na fase de fundo}} \quad (4)$$

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Determinação de biomassa

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, e convertida para massa de célula seca através de uma curva padrão (Numanoglu & Sungur, 2004).

2.6.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Aldrich) de acordo com Inchaurredo et al. (1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C e pH 6,6.

2.6.3. Determinação da proteína

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da influência da massa molar de PEG e pH no SAB.

O efeito de diferentes valores de pH do sistema, concentrações e massas molares de PEG na purificação e recuperação da enzima β -galactosidase foram testados no particionamento da enzima no SAB e são mostrados na Tabela 1.

A escolha da massa molar do PEG 4000, 6000 e 8000; do pH 6,0, 7,0 e 8,0 e das diferentes concentrações de PEG/Fosfato de potássio foram baseadas nos efeitos pronunciados na partição da enzima em trabalhos anteriores (dados não mostrados).

Analisando a influência da massa molar do PEG no coeficiente de partição da enzima, não foi possível estabelecer uma correlação, ou seja, não houve mudança na tendência geral para o comportamento de partição da enzima, que permaneceu na fase inferior rica em fosfato de potássio. Os maiores fatores de purificação ocorreram em sistemas contendo maiores concentrações de PEG, independentemente de sua massa molar ou pH do sistema, com exceção do pH 7,0, PEG 8000.

Avaliando-se o coeficiente de partição (K), pode-se observar que todos os valores de K foram bem inferiores a 1 (um), demonstrando a tendência da partição da enzima para a fase rica em sal. Albertsson (1971) e Marcos et al. (1999) reportam que a fase rica em sal – fase de fundo – possui características hidrofílicas, e a fase rica em PEG – fase de topo – características hidrofóbicas. Deste modo, o particionamento da enzima β -galactosidase apresentou uma afinidade pela fase rica em sal, indicada pela sua interação hidrofílica no sistema.

Quanto ao pH, as maiores purificações ocorreram em pH 7,0 e 8,0 com recuperação de 90 a 100% (ensaios 4, 12 e 15). Como a enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 6,6 - 7,0 (Medeiros, 2008), este último torna-se interessante por evitar a desnaturação enzimática e garantir a manutenção das propriedades biológicas da molécula.

O aumento da concentração de PEG ocasionou um aumento na razão de volume do sistema, resultando em um incremento no fator de purificação, com exceção dos sistemas 15 e 16, porém uma tendência inversa foi observada para a recuperação enzimática, que diminuiu com o aumento da concentração do polímero. Quando as razões de volumes são maiores, ou seja, o volume da fase de fundo é menor, há uma migração preferencial da enzima para essa fase, fenômeno este que não ocorre para os contaminantes, que ao reduzir o volume migram para o topo, resultando em maiores fatores de purificação.

Em geral, o aumento da massa molar e concentração do polímero, que enriquece uma das fases, causam a migração do biocomposto para a outra fase. Isso ocorre principalmente com proteínas de grande massa molar, que são mais influenciadas do que proteínas menores (Albertsson et al., 1990).

O coeficiente de partição e a razão de volume no sistema são importantes fatores na determinação da eficiência de um processo de purificação. A partição unilateral com elevada razão de volume no sistema reduz o volume de fundo a ser tratado nas etapas posteriores de purificação, obtendo-se assim o processo de integração (acoplamento de concentração com a etapa de purificação) (Anandharamakrishna et al., 2005).

Os valores de FP alcançados nos sistemas estudados estão equivalentes aos ensaios realizados por alguns autores, porém, são escassos os trabalhos relacionados à purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. Silva et al. (1997) purificando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* obtiveram fator de purificação e recuperação de 3,9 e 83%, respectivamente. Porém, os mesmos autores encontraram problemas no início do processo. Para alcançar tais resultados e melhorar a extração dos contaminantes e a purificação da enzima, foram necessários a adição de NaCl e de um

ligante bioespecífico, o que pode inviabilizar o aumento de escala pela necessidade de etapas adicionais e elevação dos custos operacionais.

Tabela 1 – Fator de purificação (FP), recuperação (RP), coeficiente de partição ($K_{\text{partição}}$) da enzima β -galactosidase e razão de volume ($R_{\text{razão volume}}$) dos sistemas utilizando PEG 4000, 6000, 8000 em pH 6,0, 7,0 e 8,0.

PEG	pH	Sistema	PEG (%)	Fosfato (%)	Fase de Fundo			
					FP	RP (%)	$K_{\text{partição}}$	$R_{\text{razão volume}}$
4000	6,0	1	12	12	1,3	110,9	0,01	1,3
		2	19	12	1,7	90,9	0,01	1,7
	7,0	3	12	12	1,8	117,7	0,01	1,0
		4	19	12	3,3	92,6	0,01	1,4
	8,0	5	12	12	1,4	93,0	0,01	0,8
		6	19	12	1,8	70,0	0,02	1,2
6000	6,0	7	12	12	1,3	114,7	0,01	1,1
		8	19	12	1,8	95,5	0,01	1,7
	7,0	9	12	12	2,1	119,8	0,01	0,9
		10	19	12	2,4	92,2	0,01	1,4
	8,0	11	12	12	1,3	85,9	0,01	0,8
		12	19	12	3,1	89,3	0,02	1,1
8000	6,0	13	14	16	1,6	90,3	0,06	0,8
		14	19	12	2,2	61,0	0,04	1,8
	7,0	15	14	16	2,9	101,3	0,01	0,6
		16	19	12	2,2	90,6	0,01	1,3
	8,0	17	14	16	1,8	68,7	0,06	0,6
		18	19	12	2,2	77,4	0,01	1,2

Nesta etapa, valores de fator de purificação e recuperação entre 1,3 – 3,3 e 61,0 – 119,8%, respectivamente, foram encontrados.

Valores de recuperação superiores a 100%, como os encontrados nos sistemas 1, 3, 7, 9, 15 e 18, podem ser explicados por dois motivos: pela remoção de metabólitos ou metabólitos secundários durante a purificação e que inibem a atividade da enzima, e ainda pela alta concentração de sal e/ou proteína, os quais ajudam a manter a conformação da proteína na forma ativa (Pan et al., 2001). Tais valores têm sido relatados para a extração de enzimas utilizando SAB.

Mayerhoff et al. (2004) na tentativa de purificarem uma xilose redutase de *Candida mogii* por SAB, utilizando PEG de massa molar 600, obtiveram uma recuperação de 117,2%. Segundo os autores, esse comportamento ocorre devido à eliminação de inibidores na fase de PEG durante a extração, bem como a própria composição do sistema, que pode favorecer a atividade enzimática.

Já Porto et al. (2008) estudaram a extração de uma protease de *Clostridium perfringens* por sistema PEG/citrato e alcançaram uma recuperação de atividade de 255%. Esta pode estar relacionada com a alteração da estrutura do sítio ativo da enzima na presença de PEG, que pode aumentar sua atividade específica.

Na tentativa de extrair xilose redutase de *Debaryomyces hansenii*, Faria et al. (2009) utilizaram SAB com PEG de massa molar 4000 na presença de diferentes sais e alcançaram uma recuperação de até 223%.

Os dados demonstrados neste trabalho e citados por alguns autores apontam a viabilidade para recuperação total da enzima e a eficiência deste processo de purificação.

3.2. Planejamento experimental completo

Após a verificação das melhores condições para a purificação da enzima pelo SAB, realizou-se um planejamento experimental completo (2^2), compreendendo 8 ensaios (4 fatoriais e 4 no ponto central), com as variáveis concentração de PEG e fosfato de potássio, a fim de incrementar e/ou otimizar a purificação e recuperação da enzima β -galactosidade utilizando PEG de massa molar 4000 e tampão fosfato de potássio em pH 7,0.

A matriz do planejamento completo com os valores codificados e reais é apresentada na Tabela 2, onde também estão apresentados os dados de fator de purificação, recuperação da enzima, coeficiente de partição e razão de volume do sistema obtido em cada ensaio.

O ponto central foi definido de acordo com o ensaio que apresentou melhor fator de purificação e recuperação da enzima durante a varredura (item 3.1), (19,0% de PEG e 12% de fosfato de potássio).

Pelo planejamento, o fator de purificação variou de 0 a 1,9. O maior valor do fator de purificação foi obtido no ensaio 3, onde as condições foram: concentração de PEG no nível -1 (14,1%) e concentração de tampão fosfato de potássio no nível +1 (14,8%), apresentando um fator de purificação de 1,9 vezes e 107,1% de recuperação enzimática.

O ponto central não forneceu resultados semelhantes aos obtidos na varredura (FP de 3,3 vezes e recuperação de 92,6%). Isto sugere que o valor inferior de FP possa

estar associado à baixa recuperação, seja por desnaturação e/ou algum outro fenômeno. A utilização de extratos enzimáticos oriundos de fermentações distintas fornece material de partida para os ensaios em diferentes composições, tanto em teor de proteína, atividade enzimática, células e outros materiais biológicos. Isto pode explicar a não reprodutibilidade dos resultados, já que a partição do material biológico é altamente influenciada pela composição do extrato enzimático adicionado ao sistema.

A predição das condições envolvidas na purificação da enzima β -galactosidase por SAB pode ser difícil, uma vez que não se sabe o tipo e a concentração de impurezas presentes no extrato, os quais, sabe-se, que afetam diretamente as propriedades do sistema e do soluto (Chouyyok et al., 2005), e, portanto a separação, a pureza e a recuperação.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de fosfato de potássio e as respostas fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição (K) e razão de volume do sistema ($R_{\text{razão volume}}$).

SAB	PEG	Fosfato	PEG (%)	Fosfato (%)	FP	RP (%)	K	$R_{\text{razão volume}}$
1	-1	-1	14,1	9,2	1,4	120,1	$5 \cdot 10^{-4}$	4,5
2	1	-1	23,9	9,2	1,3	77,3	0,01	2,9
3	-1	1	14,1	14,8	1,9	107,1	0,02	0,9
4	1	1	23,9	14,8	0,0	0,08	0,10	1,6
5	0	0	19	12	1,0	50,6	0,02	1,5
6	0	0	19	12	1,1	56,4	0,02	1,6
7	0	0	19	12	1,5	63,5	0,01	1,6
8	0	0	19	12	1,2	51,3	0,02	1,6

As respostas encontradas aqui fornecem informações de que o FP e a recuperação enzimática podem ser incrementados quando o sistema é constituído por maiores concentrações de fosfato de potássio e menores de PEG.

Para verificação da validade do modelo de purificação e recuperação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em função das variáveis significativas codificadas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4, de acordo com Rodrigues & lemma (2005).

Os coeficientes de correlações (R) de 0,92 e 0,94 para o fator de purificação (Tabela 3) e recuperação enzimática (Tabela 4), respectivamente, demonstraram que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 2,6 para o fator de purificação e 1,8 para recuperação enzimática, tornando os modelos preditivos e significativos para as respostas (Equações 5 e 6, respectivamente).

Tabela 3 – Análise de variância para o fator de purificação do planejamento experimental completo 2².

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F Calculado
Regressão	1,77	2	0,88	15,17
Resíduo	0,29	5	0,058	
Falta de ajuste	0,16	2		
Erro puro	0,13	3		
Total	2,06	7		

R= 0,92; F_{0,95; 2; 5}: 5,79

$$\text{Fator de Purificação} = 1,16 - 0,5 * \text{PEG} - 0,43 * \text{PEG} * \text{Fosfato de potássio} \quad (5)$$

A partir do modelo obtido (Equação 5) foi possível gerar a superfície de resposta e curva de contorno, para analisar as melhores condições (concentrações de PEG e fosfato) que conduzem a um melhor fator de purificação da enzima. A superfície de resposta e a curva de contorno estão apresentadas na Figura 1.

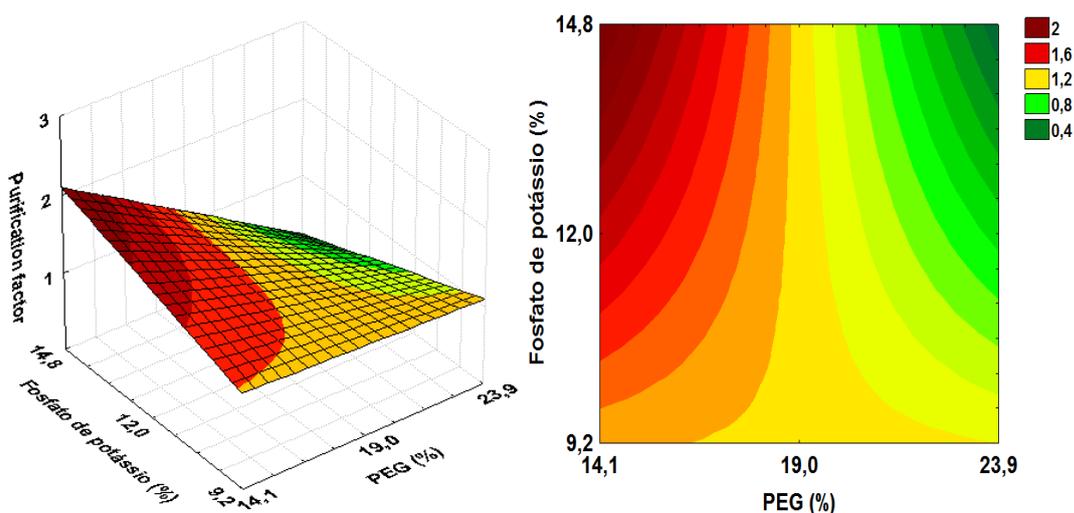


Figura 1 – Superfície de resposta e curva de contorno para fator de purificação da enzima β -galactosidase.

Os ensaios conduzidos em maiores concentrações de fosfato e menores de PEG propiciaram fatores de purificação mais elevados.

Igualmente ao fator de purificação, através do modelo de recuperação enzimática (Equação 6) foi possível gerar a superfície de resposta e curva de contorno para analisar as melhores condições (concentrações de PEG e fosfato) para recuperação da enzima. A superfície de resposta e a curva de contorno estão apresentadas na Figura 2.

Tabela 4 – Análise de variância para a recuperação da enzima β -galactosidase do planejamento experimental completo 2^2 .

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F Calculado
Regressão	8677,47	3	2892,4	12,0
Resíduo	963,01	4	240,7	
Falta de ajuste	856,56	1		
Erro puro	106,45	3		
Total	9640,48	7		

R= 0,94; $F_{0,95; 3; 4}$: 6,59

$$\text{Recuperação} = 65,7 - 37,4 * \text{PEG} - 22,5 * \text{Fosfato de potássio} - 16,0 * \text{PEG} * \text{Fosfato de potássio} \quad (6)$$

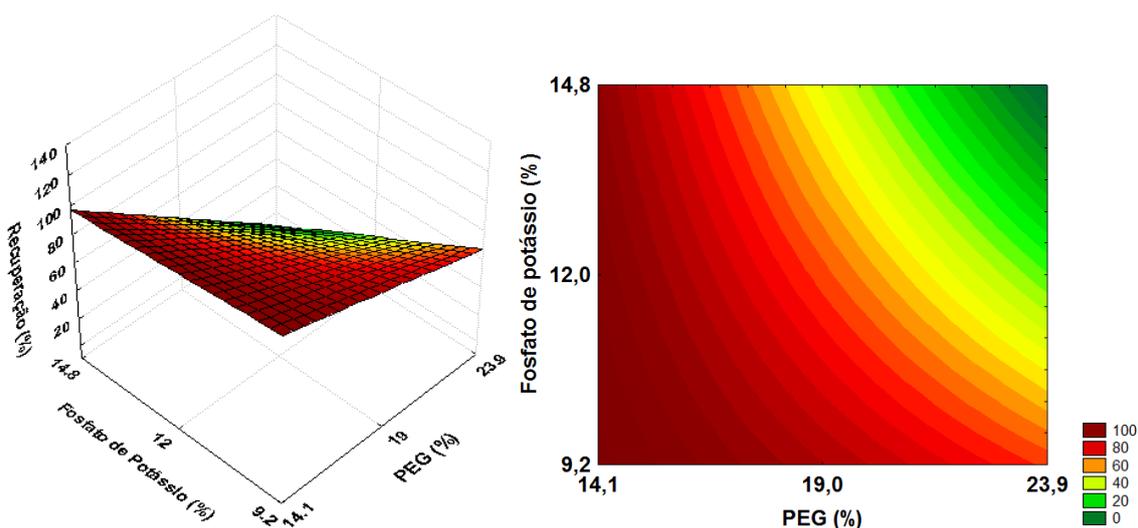


Figura 2 – Superfície de resposta e curva de contorno para recuperação de β -galactosidase.

O maior valor de recuperação da enzima foi obtido no ensaio 1, onde as condições foram: concentração de PEG no nível -1 (14,1%), concentração de tampão fosfato de potássio no nível -1 (9,2%), apresentando uma recuperação de 120,1%.

As maiores recuperações da enzima ocorreram em sistemas com menores concentrações de PEG.

A partir deste planejamento foi possível observar que tanto a purificação, quanto a recuperação da enzima poderiam ser incrementadas, ou até mesmo otimizadas em sistemas com altas concentrações de fosfato e baixas de PEG.

3.3. Otimização da purificação de β -galactosidase por SAB

A partir dos dados obtidos no primeiro planejamento, um novo planejamento experimental completo (2^2), contendo 4 pontos fatoriais, 4 axiais e 3 pontos centrais, foi realizado com as variáveis concentração de PEG de massa molar 4000 e fosfato de potássio em pH 7,0, obtendo-se como respostas o fator de purificação, recuperação de β -galactosidase, coeficiente de partição e razão de volume de sistema.

O ponto central neste segundo planejamento foi definido como sendo o ensaio que apresentou os melhores resultados no planejamento anterior (14,1% de PEG e 14,8% de tampão fosfato de potássio).

A matriz do planejamento completo com os valores codificados e reais é apresentada na Tabela 5, onde também são apresentados os fatores de purificação, recuperação de β -galactosidase, coeficiente de partição, razão de volume de sistema, e os valores preditos de fator de purificação e recuperação enzimática, assim como os respectivos desvios relativos.

Para verificação da validade do modelo para purificação da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em função das variáveis significativas codificadas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA).

O coeficiente de correlação (R) de 0,94 para o fator de purificação, também foi calculado na ANOVA (Tabela 6). A razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi de 7,1 para o fator de purificação, assim, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, tornando-o preditivo e significativo para as respostas.

Tabela 5 – Matriz do planejamento composto central rotacional 2^2 com três pontos centrais, valores codificados e reais para concentrações de PEG e fosfato de potássio, tendo como resposta fator de purificação, recuperação de β -galactosidase, coeficiente de partição, razão de volume do sistema.

SAB	PEG	Fosfato	PEG (%)	Fosfato (%)	FP	FP _{previsto}	D _{relativo}	RP (%)	RP _{prevista} (%)	D _{relativo}	K _{partição}	R _{razão volume}
1	-1	-1	11,2	12,9	1,6	1,7	5,8	128,5	126,1	1,9	$3,0 \cdot 10^{-3}$	0,9
2	1	-1	16,8	12,9	1,5	1,8	20,0	91,4	95,6	5,6	$1,8 \cdot 10^{-2}$	1,3
3	-1	1	11,2	17,1	1,5	1,3	15,3	92,7	90,6	2,3	$2,5 \cdot 10^{-2}$	0,6
4	1	1	16,8	17,1	1,4	1,4	0,0	55,0	60,5	10,0	$4,4 \cdot 10^{-2}$	1,0
5	-1,41	0	10	15	1,4	1,4	0,0	110,2	114,7	4,1	$7 \cdot 10^{-3}$	0,6
6	1,41	0	18	15	1,7	1,5	11,7	77,2	71,8	7,0	$4,2 \cdot 10^{-2}$	1,1
7	0	-1,41	14	12	2,3	1,9	17,4	107,4	118,0	9,9	$4 \cdot 10^{-3}$	1,3
8	0	1,41	14	18	1,1	1,3	18,2	59,3	68,5	15,5	$2,5 \cdot 10^{-2}$	1,2
9	0	0	14	15	4,2	3,8	9,5	105,0	93,3	11,1	$2,1 \cdot 10^{-2}$	0,9
10	0	0	14	15	3,2	3,8	18,75	94,7	93,3	1,5	$2,3 \cdot 10^{-2}$	0,9
11	0	0	14	15	4,1	3,8	7,31	105,4	93,3	11,5	$2,8 \cdot 10^{-2}$	0,9

FP Fator de Purificação, RP Recuperação de β -galactosidase, K_{partição} Coeficiente de partição, R_{razão volume} Razão de volume do sistema,

FP_{previsto} Fator de purificação; RP_{prevista} Recuperação enzimática prevista pelo modelo fornecido pela equação 7 e 8, e os respectivos desvios relativos D_{relativo} dos ensaios experimentais em relação ao modelo.

Tabela 6 – Análise de variância para o fator de purificação do planejamento experimental.

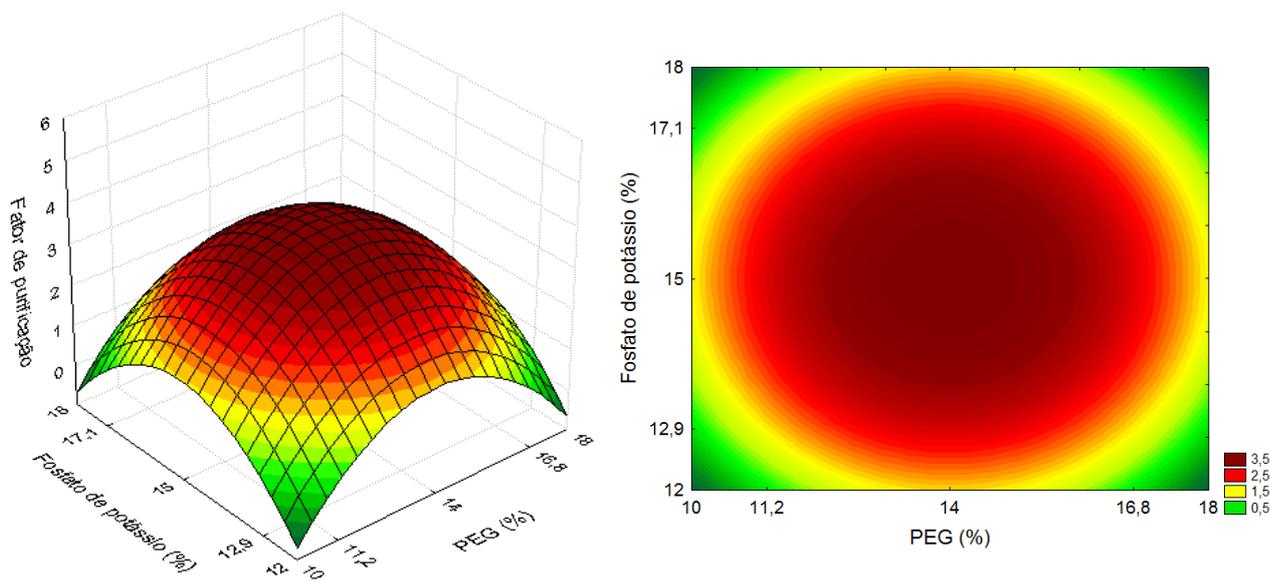
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	10,87	2	5,43	31,94
Resíduo	1,39	8	0,17	
Falta de ajuste	0,71	6		
Erro puro	0,68	2		
Total	12,26	10		

R: 0,94; $F_{0,95; 2; 8}$: 4,46

$$\text{Fator de Purificação} = 3,8 - 1,16 * \text{PEG}^2 - 1,08 * \text{Fosfato de potássio}^2 \quad (7)$$

Dessa forma, foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas do planejamento em função das variáveis (concentrações de PEG e fosfato de potássio), nas faixas estudadas.

A partir do modelo obtido foi possível gerar a superfície de resposta e curva de contorno para analisar as melhores condições de concentração PEG e fosfato de potássio, para a purificação de β -galactosidase. As superfícies de resposta geradas para o fator de purificação estão apresentadas na Figura 3.

**Figura 3** – Superfície de resposta e curva de contorno para o fator de purificação de β -galactosidase como uma função da concentração de PEG e fosfato de potássio.

Pode-se observar pela análise da superfície de resposta e curva de contorno da Figura 3 que a melhor condição para purificação da enzima é alcançada quando a

concentração de PEG é em torno de 14% e de fosfato de potássio de 15%, onde obteve-se um fator de purificação de 3,2 a 4,2 vezes.

A Tabela 7 apresenta a validade do modelo pelo teste F para a variável recuperação, sendo que o $F_{\text{calculado}}$ foi 6,5 vezes maior que o tabelado.

Tabela 7 – Análise de variância para recuperação de β -galactosidade no planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	4303,5	2	2151,7	29,2
Resíduo	589,2	8	73,65	
Falta de ajuste	514,9	6		
Erro puro	74,3	2		
Total	4892,7	10		

R: 0,93; $F_{0,95; 2; 9}$: 4,46

$$\text{Recuperação} = 93,3 - 15,2 * \text{PEG} - 17,5 * \text{Fosfato de potássio} \quad (8)$$

A partir do modelo obtido (Equação 8) foi possível obter a superfície de resposta e curva de contorno para analisar as melhores condições de concentração de PEG e fosfato de potássio, para a recuperação da enzima β -galactosidase. A superfície de resposta e a curva de contorno obtidas para a recuperação da enzima estão apresentadas na Figura 4.

Pode-se observar pela análise da superfície de resposta e curva de contorno da Figura 4 que quando a concentração de PEG é em torno de 10% e de fosfato de potássio em torno de 12%, obteve-se uma recuperação da enzima em torno de 120%.

Em concentrações intermediárias de PEG e fosfato de potássio, em torno de 14% e 15%, respectivamente, as recuperações ficaram próximas a 100%. Já com o aumento das concentrações de PEG e fosfato de potássio há uma redução nas recuperações, que variaram de 60 a 80%.

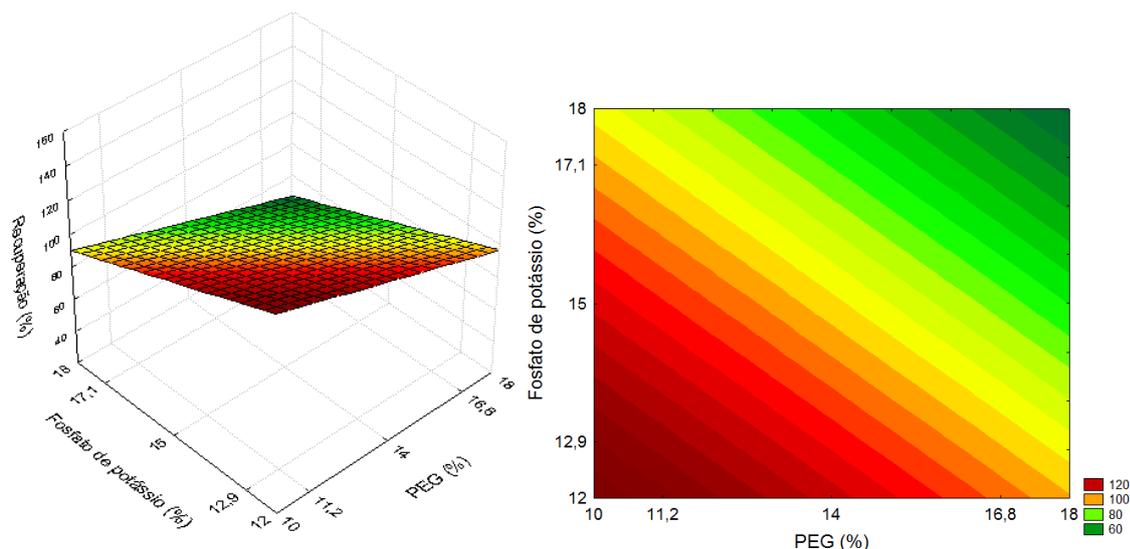


Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para recuperação de β -galactosidase como uma função da concentração de PEG e fosfato de potássio.

O planejamento utilizado neste trabalho permitiu definir condições adequadas e ideais para a purificação e recuperação da enzima β -galactosidase.

Isso demonstra uma perspectiva promissora do SAB para aplicação em larga escala para a purificação da enzima β -galactosidase, pois um fator de purificação e recuperação em torno de 4 e 100%, respectivamente, são sem dúvidas, bons resultados para uma primeira etapa de purificação a partir de um extrato bruto. Desta forma, os resultados obtidos definiram um processo promissor para purificar e recuperar esta enzima.

4. CONCLUSÃO

A otimização da purificação da enzima β -galactosidase através do sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio foi alcançada. Os melhores resultados em termos de fator de purificação (3,8) e recuperação (101,7%) foram obtidos quando o sistema foi composto por uma concentração de 14% de polietilenoglicol de massa molar 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio em pH 7,0, a partir do segundo planejamento experimental realizado. Embora o sistema aquoso bifásico não seja suficientemente seletivo para purificação total da enzima, deve ser levado em consideração como método potencial para concentração e descontaminação nas etapas iniciais dos processos de purificação da enzima.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. John Wiley, 2ª edição, 1971.

ALBERTSSON, P.A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations. **Separation Processes in Biotechnology**, v.(s/n), p.287-327, 1990.

ANANDHARAMAKRISHNA, C.; RAGHAVENDRA, S.N.; BARHATE, R.S.; HANUMESH, U.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction for recovery of proteins from cheese whey. **Food and Bioprocess Technology**, v.83, p.191-197, 2005.

BANSAL, S; OBEROI, H.S; DHILLON, G.S. PATIL, R.T. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, p.337-341, 2008.

BELTER, P.A; CUSSLER, E.L. **Bioseparations-downstream processing biotechnology**. John Wiley and Sons, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GBMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* baker's yeast. **Food Research International**, v.28, p.37-41, 1995.

CARDOSO, M.V.C. **Efeito do centro metálico nas interações intramoleculares dos complexos $[M(CN)_5NO]^x$ com o poli(óxido de etileno) em sistema aquoso bifásico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2007.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, p.3514-3518, 2005.

CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDAN, M.A.; RAMIREZ, O.T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v.40, p.773-778, 2005.

DEL-VAL, M.I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.118-126, 2003.

FARIA, J.T.; SAMPAIO, F.C.; CONVERTI, A.; PASSOS, F.M.L.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Use of response methodology to evaluate the extraction of

*Debaryomyceshanseni*xylosereductase by aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, v.877, p.3031-3037, 2009.

HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; PAPAMICHALE, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes. **Process Biochemistry**, v.23, n.5, p.129-137, 1998.

INCHAURRONDO, V. A.; YAUTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.

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 and Biotechnology**, v.46, p.66-72, 2008.

MARCOS, J.C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL, J.M.S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly (ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal Chromatography B**, v.734, p.15-22, 1999.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phases systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.217-223, 2004.

MEDEIROS, F.O. **Adsorção e purificação da enzima β galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica.** 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2008.

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F.G.; LISBOA, C.R.; MARTINS, D.S.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v.31, n.2, p.336-339, 2008.

NAGANAGOUDA, K.; MULINAMI, V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillusoryzaea*-galactosidase. **Process Biochemistry**, v.43, p.1293-1299, 2008.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnusalalunga*) by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.44, p.471-476, 2009.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v.39, p.703-709, 2004.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS-Jr, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.853-860, 2006.

PAN, I.H.; YAO, H.J.; LI, Y.K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningi* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.196-201, 2001.

PERICIN, D.M.; MADAREV-POPOVIĆ, S.Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L.M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase system using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.31, p.43-47, 2009.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, São Paulo, SP: Editora Manole, 2005.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.438-442, 2003.

PORTO, T.S.; MEDEIROS e SILVA, G.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA-JR, A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 7, p.716-721, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Editora Tarita, 2 edição, 2009.

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*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.567-572, 2004.

SILVA, A.P.R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

SILVA, C.A.S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v.29, p.1345-1351, 2006.

SILVA, M.E.; PELLOGIA, C.; PIZA, F.A.T.; FRANCO, T.T. Purification of three different microbial β -galactosidases by partitioning in aqueous two-phase systems. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.219-223, 1997.

SPELZINI, D; FARRUGGIA, B; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: Chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography B**, v.821, p.60-66, 2005.

WONGMONKOL, N.; PRICHANONT, S. Partition of alkaline protease in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol 1000 and potassium phosphate. **Korean Journal Chemistry Engineering**, v.3, p.71-76, 2006.

Artigo 2

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDADE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 UTILIZANDO TÉCNICA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDADE DE *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 UTILIZANDO TÉCNICA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS

RESUMO

Para viabilização da utilização industrial da enzima β -galactosidase na elaboração de alimentos e fármacos destinados a pessoas intolerantes à lactose são necessários processos de concentração e separação simples que sejam viáveis para aplicação em grande escala. A ultrafiltração (UF) é um processo de biosseparação poderoso para concentração e, em alguns casos, pode ser utilizado para purificação de bioprodutos tais como: drogas terapêuticas, enzimas, hormônios e anticorpos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH (6,5; 7,0 e 7,5), massa molar de corte das membranas (30; 50 e 60 KDa), pressão de operação (1,5; 2,0 e 2,5 kgf/cm²) e influência da força iônica (0,01; 0,05 e 0,1 mol.L⁻¹) na concentração e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por ultrafiltração. A utilização da técnica de UF para a concentração e recuperação da enzima mostrou-se satisfatória alcançando valores de até 8,1 vezes e 112,7%, respectivamente, porém não foi tão eficiente para a purificação, pois alcançou baixos valores de fator de purificação. O aumento da pressão de operação ocasionou prejuízos ao rendimento, bem como a adição de cloreto de sódio e cloreto de potássio, que diminuíram a purificação e recuperação enzimática.

Palavras-chave: ultrafiltração, força iônica, membrana filtrante, permeação.

CONCENTRATION AND PURIFICATION OF β -GALACTOSE by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 USING SEPARATION MEMBRANE TECHNIQUE: PARAMETERS DETERMINATION

ABSTRACT

In order to achieve the industrial viability of β -galactosidase enzyme in the food and drugs preparation intended for intolerant lactose people are necessary simple concentration and separation processes viable for scale up application. The ultrafiltration (UF) is a powerful bioseparation and concentration process, in some cases, used for bioproduct purification such as therapeutic drugs, enzymes, hormones and antibodies. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of pH (6.5, 7.0 and 7.5), molecular weight cutoff of membranes (30, 50 and 60 kDa), operating pressure (1.5; 2.0 and 2.5 kgf/cm²) and ionic strength (0.01, 0.05 and 0.1 mol L⁻¹) in the β -galactosidase concentration and purification using the ultrafiltration technique. The enzyme concentration and yield had satisfactory values reached up to 8.1 fold and 112.7% respectively. The UF was not as effective to β -galactosidase purification, since reached low purification factor values. The increase in the operating pressure resulted in losses, caused by increases in protein concentration and fouling on the membrane. The sodium chloride and potassium chloride addition decreased the enzyme purification and recovery, resulting in denaturation.

Keywords: ultrafiltration, ionic strength, membrane filtration, permeation.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma enzima que hidrolisa a lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados, ideais para consumidores intolerantes à lactose (Rajoka et al., 2003). Para viabilizar sua produção são necessários processos de purificação simples e que sejam viáveis para aplicação em grande escala (Hustedt et al., 1998).

Dentre os processos de concentração e separação, destaca-se a ultrafiltração (UF), que é uma técnica baseada na diferença de tamanho das macromoléculas, que pode ser aplicada tanto para a concentração, como para o polimento de produtos biológicos, tais como proteínas, enzimas, drogas terapêuticas, anticorpos, produtos nutracêuticos e para diagnósticos (Lim & Mohammad, 2010).

A maior vantagem dos processos de concentração e biosseparação por UF sobre os processos convencionais é o alto rendimento do produto. No entanto, apesar do uso generalizado da ultrafiltração em processos de concentração, o potencial para a sua utilização não foi explorado na indústria biotecnológica. Isto é devido principalmente pela falta de compreensão dos mecanismos envolvidos nesta técnica, pois existem diversos fatores no processo de concentração e fracionamento de proteínas: interações soluto-soluto e soluto-membrana, polarização, modo de transporte do soluto, entre outros que podem interferir e influenciar no processo (Cui, 2005).

A concentração e separação do material biológico com membranas não requerem aditivos ou mudanças de fases e podem ser realizadas isotermicamente em baixas temperaturas e pressões, com menor consumo de energia. Asseguram o mínimo de desnaturação, desativação e/ou degradação dos bioprodutos que são altamente instáveis. Além disso, é menos dispendioso do que outros métodos de concentração, separação e purificação (Cui, 2005; Saxena et al., 2009).

Na UF as condições do sistema podem afetar o processo de concentração dos bioprodutos (Pereira, 2009), assim, bons resultados são fortemente dependentes das condições de operação e principalmente da diferença de tamanho entre as proteínas presentes (Ghosh & Cui, 2000).

Ao contrário da maioria dos processos de concentração e separação, a UF apresenta ainda, a vantagem de ser extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de escalonamento e flexibilidade operacional (Habert et al., 2006).

Diversos trabalhos reportam a utilização da ultrafiltração como etapa para concentração, purificação e recuperação de bioprodutos, porém são escassos dados na literatura referentes à ultrafiltração da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. Por isso, este trabalho apresenta grande importância pela contribuição e fornecimento de dados técnicos a respeito da concentração, purificação e recuperação desta enzima. Assim,

o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do pH, massa molar de corte das membranas, pressão de operação e influência da força iônica na concentração e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, utilizando a técnica de ultrafiltração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedido pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP, e selecionado por Manera et al. (2008) como produtor da enzima β -galactosidase. A cepa foi mantida a 4°C em tubos inclinados, contendo ágar YM (ágar extrato de malte e levedura), composto por (g.L⁻¹): extrato de malte (3,0), peptona (5,0), glicose (10,0) e ágar (20,0).

2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (Pinheiro et al., 2003). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, exceto a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração em membrana de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,22 μ m de diâmetro de poros. Após a esterilização, o meio foi resfriado a temperatura ambiente para adição da lactose esterilizada por filtração e em seguida realizou-se a inoculação da levedura. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm por 24 h (Manera et al., 2008).

2.3. Cultivo submerso

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (17,0), (NH₄)₂SO₄ (8,8), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (28,2), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0. A lactose e o meio de cultivo foram esterilizados como descrito no item 2.2. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 30°C, 180 rpm por 96 h (Manera et al., 2008).

2.4. Extração da enzima

A enzima foi extraída em agitador tipo vórtex através do uso de pérolas de vidro. Para isso foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min em agitador tipo vórtex com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 10 min, 4°C). Um mililitro de célula em suspensão foi obtido por ressuspensão de células equivalente a 40 mg de célula seca em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 para obter um volume final de 1 mL (Medeiros et al., 2008).

2.5. Adsorção da enzima na membrana de ultrafiltração

Os estudos para avaliar o grau de adsorção da enzima nas membranas foram realizados pela imersão de 25 mm² de membrana em 5 mL de extrato enzimático bruto em um béquer sob constante agitação. Os ensaios foram conduzidos a 4°C para as membranas de 30, 50 e 60 kDa, nos valores de pH 6,5, 7,0 e 7,5. Foram retiradas alíquotas no intervalo de tempo de 0 a 180 minutos, quantificando-se a atividade enzimática. Para avaliação da desnaturação enzimática com o passar do tempo foi também preparado um ponto de comparação, sem a adição da membrana. A quantidade de enzima adsorvida foi quantificada pela razão entre a atividade do ponto controle e pela atividade no mesmo ponto, na presença da membrana, conforme Equação 1.

$$A_{enzima} = \frac{A_m}{A_b} \quad (1)$$

onde: A_m é a atividade no ponto com membrana e A_b é a atividade (U.mL⁻¹) no ponto de comparação sem membrana.

2.6. Concentração e purificação da enzima β -galactosidase através da separação por membranas

2.6.1. Estudo do pH, massa molar de corte da membrana e pressão de operação

Os ensaios de ultrafiltração foram realizados em uma unidade de bancada tipo *dead-end*, de volume útil de 200 mL, agitada por uma barra magnética suspensa a 5 mm da superfície da membrana, para simulação do escoamento em fluxo cruzado. Foram testadas

membranas com massas molares de corte (MWCO) de 30 (poli(étersulfona), Milipore PBTK 15005), 50 (poli(étersulfona), Milipore PBQK 15005) e 60 kDa (poli(sulfona), Osmonics YMEWSP3001), pressão de operação de 1,5, 2,0 e 2,5 kgf/cm² e valores de pH de 6,5, 7,0 e 7,5. A escolha dos valores de pH citados anteriormente foram realizadas de acordo com o pH de estabilidade da enzima (6,6) e o pH utilizado em outras técnicas de purificação definidas em trabalhos prévios para β -galactosidase, 7,5 para cromatografia de troca iônica (Medeiros, 2008) e 7,0 para o sistema aquoso bifásico (Silva, 2009). Valores superiores a 7,5 não foram cogitados por ser um pH fora da faixa de estabilidade da enzima, e também por não serem utilizados em nenhuma outra técnica de purificação. O sistema foi operado sob agitação constante e com temperatura controlada a 4°C para minimizar perdas por desnaturação (Figura 1). Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade enzimática e o teor de proteína total na alimentação, no retido e no permeado foram quantificados após cada ensaio.



Figura 1 – Célula de ultrafiltração utilizada na concentração e purificação da enzima β -galactosidase.

2.6.2. Estudo da força iônica

O efeito do aumento da força iônica na purificação da enzima β -galactosidase foi avaliado pela adição de sais em diferentes concentrações. Para tal, cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) foram adicionados ao extrato enzimático inicial. Os ensaios foram realizados em duplicata com extrato nas seguintes molaridades: 0,01; 0,05; 0,1 mol.L⁻¹. As

condições estabelecidas nos processos anteriores foram usadas neste estudo: membrana de 50 kDa, pH 7,5 e 1,5 kgf/cm² de pressão, sob agitação constante e a 4°C.

2.7. Determinação da eficiência do processo de concentração e purificação da enzima

A eficiência do processo de concentração e purificação da enzima β -galactosidase por UF foi avaliada pelos cálculos da recuperação, fator de purificação, retenção de atividade e proteína e fator de concentração de volume, atividade e proteína, conforme equações a seguir.

2.7.1. Recuperação enzimática

$$RP \text{ (\%)} = \frac{(A_{\text{retido}} * V_{\text{retido}})}{(A_{\text{entrada}} * V_{\text{entrada}})} * 100 \quad (2)$$

onde: A_{retido} é a atividade enzimática no retido (U.mL⁻¹); V_{retido} é o volume retido na membrana em mL; A_{entrada} é a atividade enzimática da alimentação (U.mL⁻¹) e V_{entrada} é o volume inicial do extrato enzimático adicionado em mL.

2.7.2. Fator de purificação

$$FP = \frac{A_{\text{esp.saída}}}{A_{\text{esp.entrada}}} \quad (3)$$

onde: $A_{\text{esp.saída}}$ é a atividade específica da fração retida (U.mg⁻¹); $A_{\text{esp.entrada}}$ é a atividade específica da enzima na alimentação (U.mg⁻¹).

2.7.3. Retenção de proteínas

$$\% \text{ Retenção de proteínas} = \left(1 - \frac{C_{\text{pp}}}{C_{\text{pa}}} \right) * 100 \quad (4)$$

onde: C_{pp} é a concentração de proteínas no permeado e C_{pa} é a concentração de proteínas na alimentação.

2.7.4. Retenção de atividade

$$\% \text{ Retenção de atividade} = \left(1 - \frac{C_{\text{ap}}}{C_{\text{aa}}} \right) * 100 \quad (5)$$

onde: C_{ap} é a atividade no permeado e C_{aa} é a atividade na alimentação.

2.7.5. Fator de concentração de volume

$$FC_V = \frac{V_{\text{entrada}}}{V_{\text{retido}}} \quad (6)$$

onde: V_{entrada} é o volume alimentado em mL e V_{retido} é o volume em mL da fração retida na membrana.

2.7.6. Fator de concentração de proteínas

$$FC_P = \frac{P_{\text{retido}}}{P_{\text{entrada}}} \quad (7)$$

onde: P_{entrada} é o teor de proteína (mg.mL^{-1}) do extrato alimentado e P_{retido} é o teor de proteína da fração retida (mg.mL^{-1}).

2.7.7. Fator de concentração de atividade

$$FC_A = \frac{A_{\text{retido}}}{A_{\text{entrada}}} \quad (8)$$

onde: A_{entrada} é a atividade do extrato alimentado (U.mL^{-1}) e A_{retido} é a atividade da fração retida (U.mL^{-1}).

2.8. Métodos analíticos

2.8.1. Determinação da concentração de células

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, e convertida para massa de célula seca através de curva padrão (Numanoglu & Sungur, 2004).

2.8.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Aldrich) de acordo com Inchaurredo et al. (1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C em pH 6,6.

2.8.3. Determinação da proteína

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Adsorção da enzima na membrana de ultrafiltração

Interações proteína/proteína e proteína/membrana podem afetar o processo de concentração e separação durante a ultrafiltração, ocasionando a inviabilidade do mesmo em alguns casos. Por isso, o grau de adsorção da enzima β -galactosidase foi avaliado pela diferença na atividade da enzima em contato com as membranas de diferentes massas molares de corte (30, 50 e 60 kDa), e a atividade da enzima em um ensaio controle (sem membrana), realizadas em pH 6,5, 7,0 e 7,5.

As Figuras 2, 3 e 4 mostram que a atividade enzimática não sofreu grandes alterações no decorrer dos 180 min de avaliação em relação à atividade do ponto controle (A_b), independentemente da membrana ou pH utilizado. Isso é comprovado pelo fato que a atividade sofreu uma diminuição sempre inferior a 10%, indicando baixa capacidade de ligação da enzima com as membranas utilizadas no processo, favorecendo assim, a concentração e purificação da enzima sem perdas de atividade pelo fenômeno de adsorção.

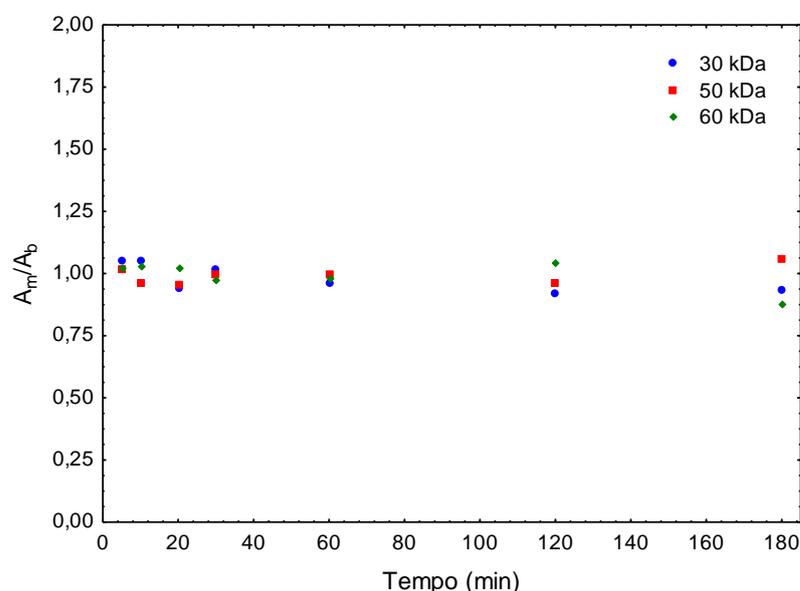


Figura 2 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 6,5.

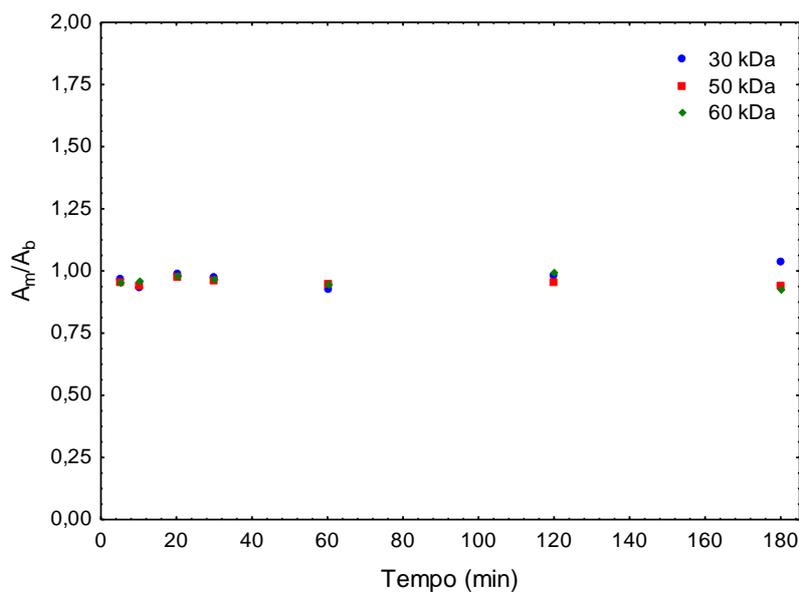


Figura 3 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 7,0.

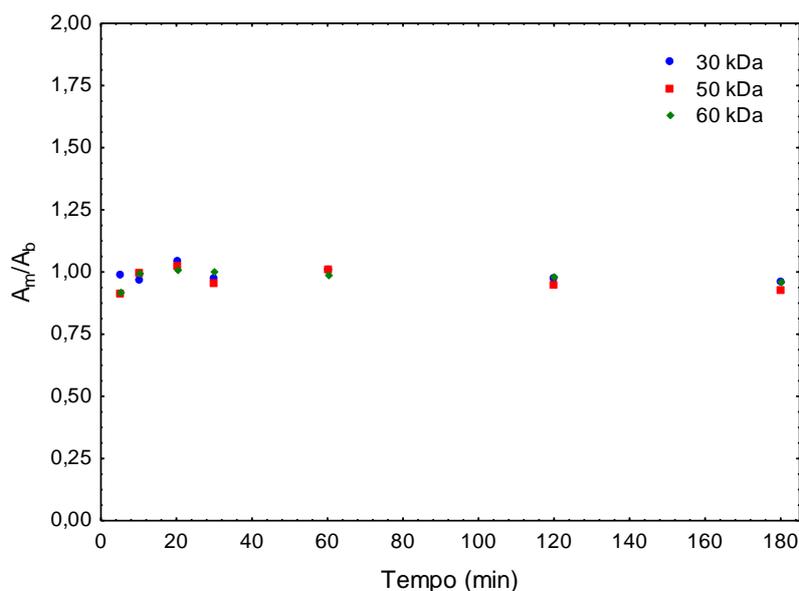


Figura 4 – Cinética de adsorção da enzima β -galactosidase nas membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 7,5.

É importante ressaltar, no entanto, que estes dados refletem apenas a adsorção da enzima na superfície da membrana, e não considera interações que possam ocorrer no interior dos poros das membranas de ultrafiltração, já que este estudo não implica na permeação e passagem da enzima pelos poros das membranas.

3.2. Concentração e purificação da enzima β -galactosidase através da separação por membranas

3.2.1. Estudo do pH e massa molar de corte da membrana

A variação da massa molar de corte e do pH no processo de ultrafiltração da enzima foi realizada com o objetivo de verificar os melhores parâmetros para esse processo, levando-se em consideração a recuperação total, fator de purificação, retenção de atividade e proteína, e o fator de concentração para atividade, proteína e volume.

A utilização de diferentes massas molares de corte para as membranas não provocou, de um modo geral, modificações significativas na concentração, purificação, retenção e recuperação global da enzima (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração e purificação de β -galactosidase utilizando membranas de 30, 50 e 60 kDa em pH 6,5, 7,0 e 7,5.

pH	MMC(kDa)	%RP ^A	FP ^B	R _p (%) ^C	R _A (%) ^D	Fc (V) ^E	Fc ^F (A)	Fc (P) ^G
6,5	30	93,01±0,02 ^{ab}	0,93±0,04 ^{cd}	98,72±1,53 ^a	100,0 ^{*a}	6,66±0,00 ^{ab}	6,18±0,00 ^{abc}	6,78±0,36 ^a
	50	79,45±4,87 ^b	0,9±0,06 ^{cd}	99,42±0,66 ^a	100,0 ^{*a}	6,38±0,26 ^b	5,06±0,33 ^c	5,67±0,04 ^{ab}
	60	89,25±2,94 ^{ab}	0,96±0,10 ^{cd}	95,42±6,26 ^a	100,0 ^{*a}	6,44±0,5 ^b	5,70±0,30 ^{bc}	5,93±5,93 ^{ab}
7,0	30	93,59±11,40 ^{ab}	1,09±0,02 ^{abcd}	99,90±0,12 ^a	100,0 ^{*a}	7,55±0,77 ^{ab}	7,03±0,64 ^{ab}	6,43±0,59 ^a
	50	103,5±10,30 ^{ab}	1,20±0,08 ^{ab}	99,73±0,12 ^a	100,0 ^{*a}	6,31±0,15 ^b	6,54±0,73 ^{ab}	5,42±0,54 ^{ab}
	60	99,93±4,80 ^{ab}	1,03±0,06 ^{bcd}	99,53±0,12 ^a	100,0 ^{*a}	6,19±0,67 ^{ab}	6,17±0,38 ^{abc}	5,61±0,05 ^{ab}
7,5	30	86,04±6,23 ^{ab}	1,13±0,03 ^{abc}	99,14±0,64 ^a	100,0 ^{*a}	8,11±0,25 ^a	6,97±0,35 ^{ab}	6,12±0,46 ^{ab}
	50	112,71±10,7 ^a	1,21±0,06 ^{ab}	96,94±2,77 ^a	100,0 ^{*a}	6,38±0,26 ^b	7,14±0,40 ^a	5,88±0,06 ^{ab}
	60	90,85±9,8 ^{ab}	1,28±0,14 ^a	98,86±0,33 ^a	100,0 ^{*a}	6,83±0,78 ^{ab}	6,16±0,38 ^{abc}	4,82±0,37 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios.

* Não houve desvio

MMC – Massa molar de corte

^A Recuperação de β -galactosidase

^B Fator de purificação

^C Retenção calculada com base na proteína total

^D Retenção calculada com base na atividade enzimática

^E Fator de concentração calculada com base no volume

^F Fator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^G Fator de concentração calculado com base na concentração total de proteínas

Com exceção das membranas de 30, 50 e 60 kDa no pH 6,5, todos os demais ensaios apresentaram valores de fator de purificação superiores a 1 (um). Em relação à recuperação, os ensaios utilizando a membrana de 50 kDa no pH 7,0 e 7,5 apresentaram as maiores recuperações, superiores a 100%.

Valores de recuperação superiores a 100%, como encontrado neste trabalho são explicados pela remoção de metabólitos durante a purificação e que inibem a atividade da enzima, que quando removidos do meio possibilitam a ativação de proteínas inativas na presença do inibidor (Cortez et al., 2004; Pan et al., 2001; Porto et al., 2008).

Quanto à retenção da enzima, é possível observar que em todos os ensaios a enzima pôde ser eficazmente retida por meio das membranas testadas, pois apresentaram 100% de retenção de atividade, não sendo encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$). Assim, todas as membranas são capazes de reter a enzima.

Segundo Zhou & Chen (2001), a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* apresenta massa molar superior a 100 kDa, favorecendo assim, a retenção total da enzima em todas as membranas utilizadas.

Os baixos fatores de purificação podem estar relacionados ao fato das proteínas contaminantes possuírem massa molar semelhante à da enzima de interesse, ou ainda possuírem massa molar menor, mas serem retidas pela membrana dinâmica formada pela camada de proteínas retidas na superfície da membrana (camada gel) (Ghosh, 2000).

Em relação ao fator de concentração de volume, atividade e proteína, de modo geral, os ensaios foram semelhantes, alcançando-se valores de até 8,1, 7,1, e 6,7 vezes, respectivamente. Isto demonstra claramente a eficiência do processo para etapas de concentração, e viabiliza sua aplicação em etapas iniciais para redução de volume de trabalho, já que é normalmente um ponto importante a ser considerado em processos de purificação, e também para polimento do material biológico por diafiltração e/ou ultrafiltração (Lima et al., 2008; Moraes, 2006).

Li et al. (2009) avaliaram o desempenho da ultrafiltração na concentração e purificação da enzima protease de um extrato de baço de atum. A ultrafiltração alcançou um fator de concentração de volume próximo de 2 (dois) e fator de purificação de 2 vezes. Os autores ressaltaram ainda, problemas com a redução do fluxo causado pelo acúmulo de outros materiais na superfície da membrana e pelo bloqueio dos poros por outras proteínas, que provocou um aumento no processo de mais de 9 horas.

Neste trabalho, o maior fator de concentração (8,1 vezes), recuperação (112,7%) e fator de purificação (1,2 vezes) ocorreram em pH 7,5, demonstrando vantagens de utilização em relação aos demais valores de pH.

As Figuras 5, 6 e 7 demonstram a variação do fluxo de permeado com o tempo nos pHs 6,5, 7,0 e 7,5, respectivamente.

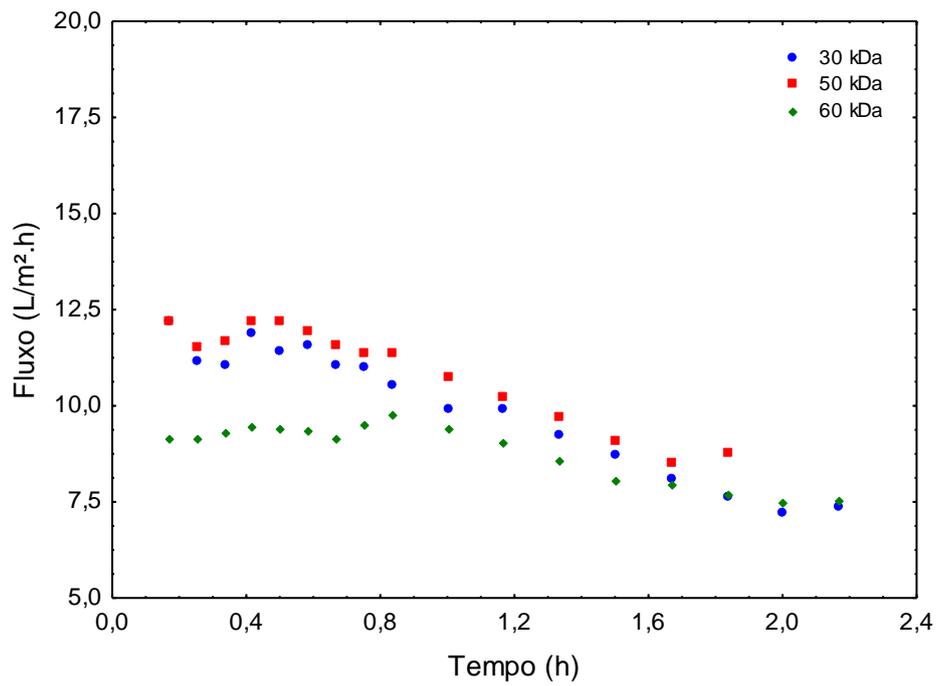


Figura 5 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 6,5.

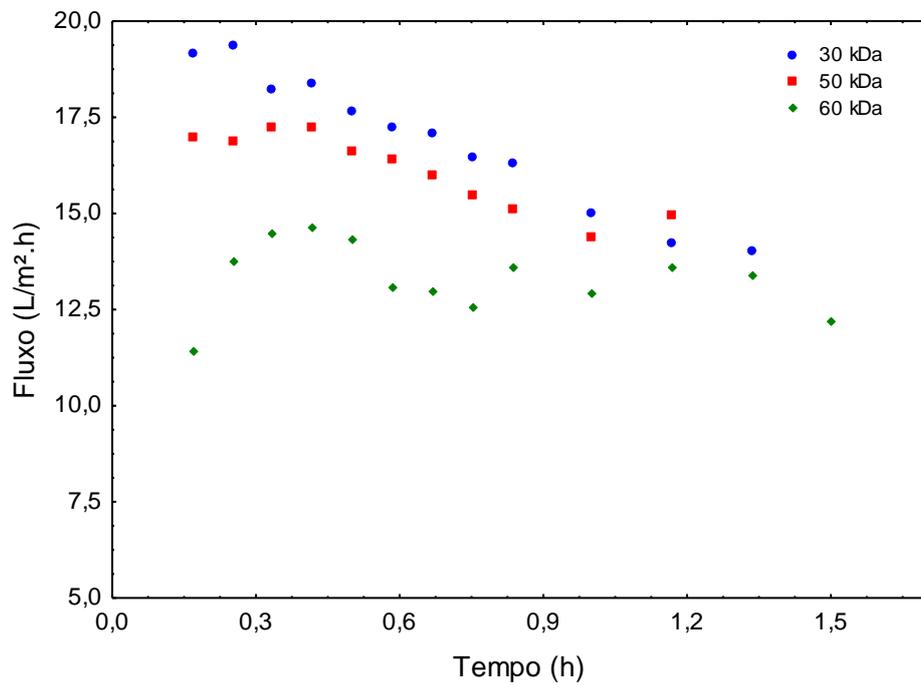


Figura 6 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 7,0.

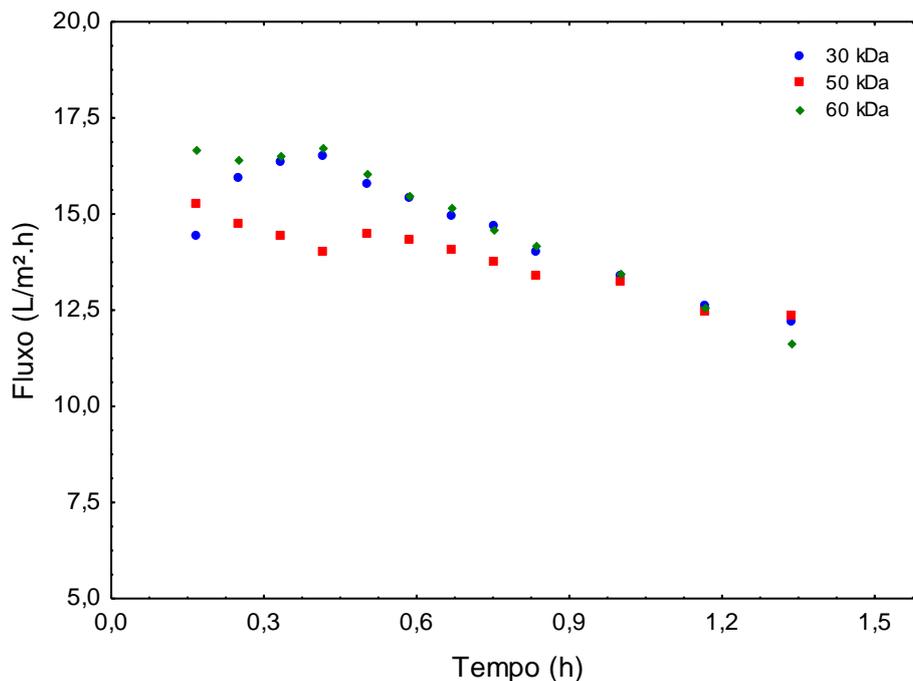


Figura 7 – Fluxo de permeado durante o processo de UF em pH 7,5.

No pH 7,5, assim como no estudo de adsorção, foi onde ocorreu a menor variação do fluxo de permeado em função da massa molar de corte. Em todas as condições estudadas se observou a queda do fluxo de permeado com o tempo de permeação, o que é um comportamento típico dos fenômenos de polarização de concentração e de incrustação da membrana. Conforme a solução vai sendo concentrada, a concentração de proteínas na superfície da membrana aumenta, aumentando a camada polarizada. Dependendo da situação, pode haver a formação de uma camada gel, que por sua vez leva a uma maior queda do fluxo de permeado (Ghosh & Cui, 2000).

O fluxo permeado foi menor em pH 6,5 do que nos demais valores de pH. O fluxo de permeado médio variou de 12,2 a 7,4 L/m².h do início ao final do processo, com redução de 40%, e um tempo máximo de operação de 2,1 h.

O menor fluxo de permeado neste pH pode ter ocorrido pois em valores de pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico as proteínas podem sofrer aglomeração e produzir um depósito na superfície da membrana, diminuindo sua permeabilidade (Palecek et al., 1993), além disso pode ocorrer a adsorção de proteínas contaminantes na superfície da membrana resultando em uma segunda membrana que altera o funcionamento da membrana original, como verificado por Saha et al., 2006 e Bullon et al., 2000, nos estudos utilizando gelatinas.

Em pH 7,0 o fluxo médio variou de 19,1 a 12,2 L/m².h, com redução de 36%, com tempo máximo de operação de 1,5 h. Embora tenha apresentado o maior fluxo inicial, verificou-se uma redução do mesmo ao decorrer do processo de UF de 36%. Em pH 7,5 o

fluxo médio de permeado variou entre 16,6 a 11,6 L/m².h, com redução de 30%, com um tempo máximo de operação de 1,3 h.

Embora a membrana de 60 kDa tenha apresentado resultados semelhantes às demais membranas quanto ao fator de purificação, esta deve ser analisada e utilizada com cautela, pois apresentou um tempo maior de operação e um fluxo de permeado final, em geral, inferior (Figuras 5, 6 e 7), quando comparada às outras membranas, prejudicando o rendimento do processo. Esta queda no rendimento do processo pode levar a um aumento significativo dos custos de concentração e purificação desta enzima e até mesmo inviabilizá-la em escala industrial. Este efeito pode ter ocorrido devido à maior incrustação da membrana, pois um diâmetro de poros maior favorece à permeação de compostos de tamanho semelhante aos poros da membrana, levando a maior ocorrência de bloqueio (entupimento) dos poros.

Os resultados obtidos com as membranas de 30, 50 e 60 kDa nos três valores de pH estudados (6,5, 7,0 e 7,5) de modo geral, foram semelhantes, fornecendo assim uma gama de aplicação para as membranas. Esses dados indicam que as condições descritas na Tabela 1, referentes aos valores de pH e massa molar de corte das membranas, podem ser utilizadas em qualquer parte de uma futura estratégia de purificação desta enzima, pois não sofreram grandes variações dos parâmetros analisados. Assim, a utilização das diferentes membranas e pH ficará a cargo das condições de cada etapa empregada no processo de purificação, o que a torna uma técnica promissora tanto para concentração, quanto como para etapa de diafiltração (remoção de sais).

3.2.2. Estudo da pressão de operação na ultrafiltração

Após a escolha da membrana de 50 kDa e pH 7,5, como sendo as condições que numericamente apresentaram melhores resultados, em termos de recuperação, fator de concentração de atividade e purificação, optou-se por estabelecer a melhor pressão de operação até o momento definida como 1,5 kgf/cm², pois como os poros das membranas de UF são menores, em relação aos outros processos de separação por membrana, é necessária uma força motriz maior para obter vazões elevadas o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente (Habert et al., 2006). No entanto, um aumento da pressão de operação, também leva a um aumento da camada polarizada, que reduz o fluxo de permeado. Para pressões acima de certo limite, o fluxo de permeado torna-se independente da pressão de operação e o fluxo obtido é denominado fluxo limite (Song, 1998; Tang & Leckie, 2007). Recomenda-se, portanto, operar o sistema abaixo de uma pressão, acima da qual o fluxo de permeado não aumente mais linearmente com esta. Nesse ponto, o fluxo de permeado é denominado de fluxo crítico (Bacchin et al., 1995).

Foram conduzidos ensaios em pressões de 2,0 e 2,5 kgf/cm², respeitando a pressão máxima de operação da célula de ultrafiltração.

A Figura 8 mostra que embora inicialmente a operação a pressões mais elevadas tenha apresentado um fluxo de permeado inicial maior do que os sistemas operados em pressões mais baixas, a polarização de concentração e incrustação também são maiores. Já nos sistemas operados em pressões inferiores esta concentração ocorre de forma mais gradativa, ocasionando uma queda muito menor do fluxo e permeado, e conseqüente diminuição do tempo de operação, levando a melhor rendimento do processo.

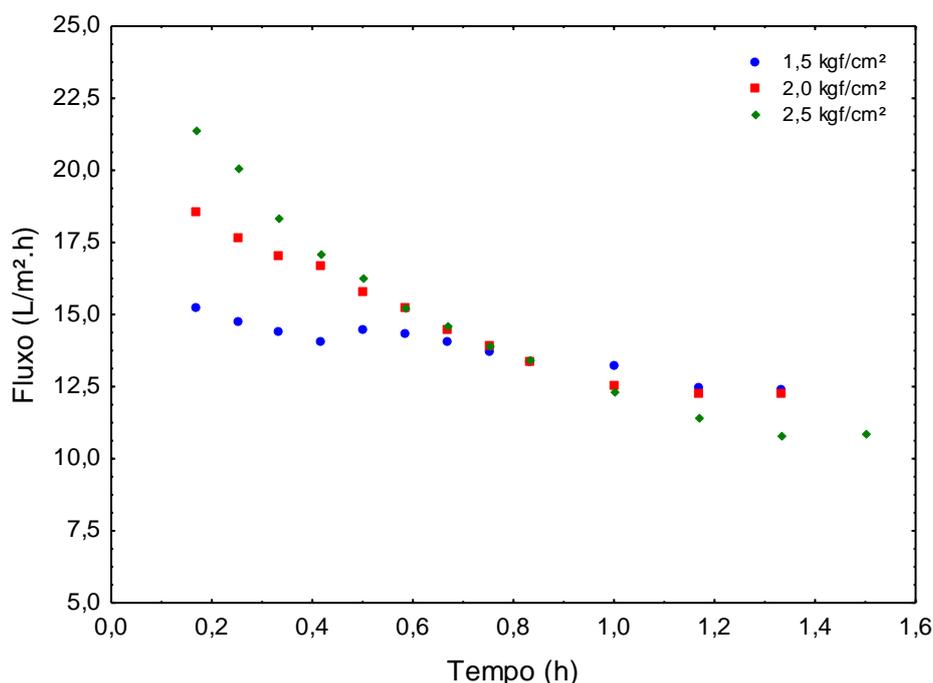


Figura 8 – Fluxo de permeado na UF utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5 em pressões de 1,5, 2,0 e 2,5 kgf/cm².

Comparando-se o fluxo inicial com o fluxo final do processo nas pressões de 1,5, 2,0 e 2,5 kgf/cm², pode-se verificar que a queda de fluxo foi de 2,9, 6,3 e 10,6 L/m².h, respectivamente. Isto mostra que o aumento da pressão ocasiona uma redução expressiva no fluxo de permeado durante o processo. O sistema operado a 1,5 kgf/cm² foi o que apresentou a menor diminuição do fluxo permeado em relação ao inicial, mantendo-se praticamente constante ao longo do processo.

Sistemas operados em pressões superiores a 1,5 kgf/cm², conduziram a redução da recuperação e do fator de purificação da enzima (Tabela 2).

Segundo Mierzwa (2008) e Habert et al. (2006), a redução do fluxo de permeado pode ser ocasionada por alguns fatores, entre eles estão:

(i) deformação mecânica, o qual é função do valor de pressão aplicada e das características estruturais da membrana, incluindo o tipo de polímero utilizado;

(ii) inchamento da matriz devido a interações físico-químicas com solvente ou pela presença de impureza no solvente, que pode provocar entupimento dos poros, também conhecido como *fouling*, que são caracterizadas pela adsorção ou depósito de materiais provenientes do meio de alimentação (Figura 9), levando também à perda de eficiência de separação e mudança na difusão da solução e

(iii) aumento da concentração do soluto na superfície da membrana, conhecido como polarização de concentração que também é capaz de ocasionar a queda do fluxo de permeado.



Figura 9 – Formação do *fouling* na membrana: fenômeno que ocasiona redução do fluxo de permeado.

Os fenômenos citados anteriormente diminuem a produtividade do processo e elevam os custos operacionais em função de danos permanentes causados à membrana, formação de depósitos de difícil remoção e da necessidade de limpezas frequentes. Estes fenômenos podem ser controlados através do ajuste dos parâmetros operacionais, alteração no *design* das membranas e empregos de pré-tratamentos (precipitação, centrifugação, etc) (Pereira, 2009).

Tabela 2 – Efeito da pressão na concentração e purificação da enzima β -galactosidase utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5.

Pressão (kgf/cm²)	RP (%)^A	FP^B	R_p (%)^C	R_A (%)^D	Fc (V)^E	Fc (A)^F	Fc (P)^G
1,5	112,18±10,71 ^a	1,21±0,05 ^a	96,9±2,76 ^a	100,0 ^{*a}	6,38±0,25 ^b	7,14±0,40 ^a	5,88±0,06 ^a
2,0	88,06±3,79 ^b	1,08±0,01 ^{ab}	99,62±0,75 ^a	100,0 ^{*a}	7,54±0,14 ^a	6,64±0,41 ^a	6,11±0,35 ^a
2,5	95,51±3,25 ^{ab}	0,94±0,10 ^b	99,11±0,72 ^a	100,0 ^{*a}	6,55±0,15 ^b	6,25±0,35 ^a	6,66±0,32 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios.

* Não houve desvio

^A Recuperação de β -galactosidade

^B Fator de purificação

^C Retenção calculada com base na proteína total

^D Retenção calculada com base na atividade enzimática

^E Fator de concentração calculada com base no volume

^F Fator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^G Fator de concentração calculado com base na concentração total de proteína

No caso de sistemas operados à pressão constante, como utilizado aqui, estes fenômenos ocorrem devido à deposição de substâncias inorgânicas e orgânicas na superfície da membrana. Na prática, este depósito representa uma segunda membrana sobre o polímero desta, o que reduz a sua permeabilidade e modifica as suas propriedades.

Por menor que seja a ocorrência destes fenômenos, eles são inevitáveis e prejudicam o desempenho da membrana, podendo alterar o fluxo de permeado e viabilidade do processo.

De acordo com Leberknight et al. (2011) quanto maior a pressão trans-membrana utilizada no processo, maior a formação da camada secundária sobre a membrana, reduzindo assim, a capacidade de permeação de proteínas.

Segundo Van-de-Ven et al. (2008), a diminuição da resistência com o aumento da pressão geralmente não é observada em experimentos de filtração. Em geral, a tendência oposta é verdadeira, o aumento da pressão leva ao acúmulo e compactação de uma camada de materiais celulares, além das incrustações, tornando-o menos permeável no decorrer do processo.

O controle desses efeitos negativos no processo de ultrafiltração, segundo Jonsson & Jonsson (1995), pode ser feito através do aumento da agitação ou da diminuição da pressão, ou, ainda, pela utilização de membranas fabricadas com outros materiais capazes de não permitir a adsorção de solutos em sua estrutura.

A polarização de concentração e acúmulo de impurezas sobre a membrana, pode ser identificada segundo Bai & Leow (2002), pela redução do fluxo de permeado no decorrer do processo, consequência do aumento da resistência e bloqueio dos poros.

Assim, neste trabalho os melhores resultados foram obtidos em sistemas operados em pressão de 1,5 kgf/cm². Conforme comentado anteriormente, o fato de se trabalhar em pressões reduzidas e, portanto, com fluxos menores, pode parecer uma incoerência. No entanto, os resultados mostraram que em condições menos polarizadas a incrustação é bem menor e o fluxo de permeado cai menos ao longo do processo, o qual é função do valor de pressão aplicada e das características estruturais da membrana.

3.2.3. Estudo da influência da força iônica na concentração e purificação da enzima

A adição de cloreto de sódio e cloreto de potássio no extrato enzimático durante o processo de ultrafiltração tem sido reportada em alguns trabalhos com o objetivo de verificar se a modificação da força iônica pode atuar com efeito protetor na biopartícula, e na permeabilidade e biosseparação de alguns compostos.

No presente estudo, os sais adicionados ao extrato enzimático, cloreto de sódio e cloreto de potássio, ocasionaram um baixo fator de purificação e recuperação (Tabela 3). O contato prolongado da enzima com os sais pode ter provocado desnaturação enzimática, além disso, podem ter ocorrido alterações na estrutura das moléculas e nas interações eletrostáticas entre as proteínas, ocasionando uma aglomeração proteica e consequente deposição e adsorção na superfície da membrana, conforme observado por Kelly & Zydney, 1997 e Palecek et al., 1993.

Em relação à retenção de atividade e proteína, não houve mudança quando comparado ao ensaio controle. A adição de sal no extrato não provocou a migração da enzima, nem o aumento da migração de proteínas contaminantes para o permeado. Bech et al. (2008), Lin et al. (2008) e Teng et al. (2006) estudaram a adição de NaCl em albumina de soro bovino, lisozima e hemoglobina. Estes autores verificaram que a adição de NaCl pode ter reduzido o tamanho das proteínas, através da compactação da dupla camada elétrica, aumentando assim, sua permeação na membrana. Porém, tal efeito não foi observado neste trabalho.

Os resultados demonstram ainda que o fator de purificação e recuperação da enzima diminuíram quando a concentração de cloreto de sódio e cloreto de potássio foi incrementada de 0,01 M para 0,1 M.

Athès & Combes (1998) avaliaram a adição de KCl, NaCl, KBr e NaBr como agentes protetores da desnaturação por altas pressões em uma solução purificada da enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* Maxilact LX-5000. O KCl e NaCl apresentaram bons efeitos protetores, enquanto NaBr e KBr, apresentaram menor eficiência de proteção. Qualquer concentração de NaBr, KBr, assim como NaCl até 2 M apresentaram um efeito desnaturante da enzima, enquanto KCl apresentou um efeito estabilizante, elevando a meia vida da enzima cerca de 20 vezes em solução com concentração até 2 M e cerca de 60 vezes em solução com concentração até 3 M.

Becht et al. (2008) estudaram o efeito de fosfato de potássio (20 mM – 100 mM) no aumento da força iônica para retenção de albumina de soro bovino (BSA) e lisozima, utilizando ultrafiltração. Para BSA o aumento da força iônica promoveu um incremento na retenção desta proteína, indicado pela diminuição desta no permeado. Já para lisozima, a retenção maior foi encontrada em menor força iônica (20 mM). Isto mostra que, o efeito positivo ou negativo dos sais é dependente da concentração utilizada, e principalmente das características e propriedades das proteínas estudadas.

Neste trabalho a adição dos sais NaCl e KCl não apresentou efeito positivo quando comparado ao ensaio controle (sem adição de sal), reduzindo a atividade, pureza e recuperação da enzima. Além disso, seria necessário uma etapa adicional para remoção do sal.

Tabela 3 – Influência da força iônica na concentração e purificação da enzima β -galactosidase utilizando membrana de 50 kDa, pH 7,5 e pressão de 1,5 kgf/cm².

Sal	Concentração (mol.L ⁻¹)	Rec (%) ^A	FP ^B	R _p (%) ^C	R _A (%) ^D	Fc (V) ^E	Fc (A) ^F	Fc (P) ^G
Controle	-	112,71±10,71 ^a	1,21±0,06 ^a	96,94±2,77 ^a	100,0 ^{*a}	6,38±0,26 ^a	7,14±0,40 ^a	5,88±0,06 ^a
KCl	0,01	92,4±4,1 ^b	0,9±0,05 ^b	99,6±0,9 ^a	100,0 ^{*a}	5,0±0,4 ^b	4,6±0,7 ^{bc}	4,8±0,4 ^{bc}
	0,05	88,3±7,3 ^{bc}	0,8±0,1 ^b	97,8±2,3 ^a	100,0 ^{*a}	5,1±0,6 ^{ab}	5,9±0,1 ^{ab}	5,9±0,2 ^a
	0,1	73,9±4,7 ^{cd}	0,7±0,09 ^b	99,6±0,7 ^a	100,0 ^{*a}	4,4±0,1 ^b	3,3±0,6 ^{cd}	4,1±0,5 ^c
NaCl	0,01	85,9±3,9 ^{bc}	0,8±0,07 ^b	99,3±1,2 ^a	100,0 ^{*a}	5,0±0,6 ^b	4,3±0,4 ^{cd}	5,1±0,2 ^{ab}
	0,05	63,7±6,1 ^d	0,7±0,1 ^b	99,0±0,8 ^a	100,0 ^{*a}	5,0±0,3 ^b	3,2±0,7 ^d	4,8±0,3 ^{bc}
	0,1	60,2±5,7 ^d	0,7±0,06 ^b	99,5±1,9 ^a	100,0 ^{*a}	5,7±0,8 ^{ab}	3,4±0,3 ^{cd}	4,6±0,4 ^{bc}

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios.

* Não houve desvio

^A Recuperação de β -galactosidade

^B Fator de purificação

^C Retenção calculada com base na proteína total

^D Retenção calculada com base na atividade enzimática

^E Fator de concentração calculada com base no volume

^F Fator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^G Fator de concentração calculado com base na concentração total de proteína

4. CONCLUSÃO

Com a utilização da técnica de ultrafiltração foi possível concentrar o extrato enzimático em até 8,1 vezes, indicando sua viabilidade para redução de volume inicial de trabalho para as etapas de purificação.

Mesmo com os baixos valores no fator de purificação (1,2), esta técnica apresenta grande potencial, pois conseguiu atingir elevados valores de recuperação da enzima, em torno de 112,7% devido à possível remoção de inibidores do meio.

Os processos operados em menores pressões apresentaram melhores resultados em relação à recuperação e purificação da enzima, ocasionado pela menor redução do fluxo do permeado ao longo do processo.

O aumento da força iônica durante a UF, com a utilização de cloreto de sódio e cloreto de potássio, não foi efetivo para melhorar a purificação e concentração da enzima. Desta forma, a utilização destes pode ser descartada do processo, pois representaria uma etapa adicional para sua remoção.

A UF forneceu uma gama de aplicações para as diferentes membranas em diferentes valores de pH, que futuramente podem ser aplicadas em diferentes etapas de uma estratégia de purificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHÈS, V; COMBES, D. Influence of additives on high pressure stability of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.532-537, 1998.

BACCHIN, P.; AIMAR, P.; SANCHEZ, V. Model for colloidal fouling of membranes. **AIChE Journal**, v. 41(2), p. 368-376, 1995.

BAI, R.B.; LEOW, H.F. Microfiltration of activated sludge wastewater—The effect of system operation parameters. **Separation and Purification Technology**, v.29, p.189-198, 2002.

BECHT, N.O.; MALIK, D.J.; TARLETON, E.S. Evaluation and comparison of protein ultrafiltration test results: dead-end stirred cell compared with a cross-flow system. **Separation and Purification Technology**, v.62, p.228-239, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BULLÓN, J; BELLEVILLE, M.P; RIOS, G.M. Preparation of gelatin formed-in-place membranes: effect of working conditions and substrates. **Journal of Membrane Science**, v.168, p.159-165, 2000.

CORTÉS, G; TRUJILLO-ROLDAN, M.A; RAMIREZ, O.T; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 773–778, 2005.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – na example of multi-scale complex system. **China particuology**, v.3(6), p.343-348, 2005.

FEINS, M; SIRKA, K.K. Novel internally staged ultrafiltration for protein purification. **Journal of Membrane Science**, v.248, p.137-148, 2005.

GHOSH, R; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pré-treated membrane. **Journal of membrane science**, v.167, p.47-53, 2000.

GHOSH, R; CUI, Z. F. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane surface pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v.139, p.17-28, 1998.

HABERT, A C, NOBREGA, R., BORGES C. **Processos de Separação com Membranas**, Ed. E-papers, 2006.

HUSTEDT H, KRONER KH, PAPAMICHALE N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes. **Process Biochemistry**, v. 23(5), p.129-137, 1998.

INCHAURRONDO, V.A; FLORES, M.V; VOGET, G.E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v.20, p.291–298, 1998.

JONSSON, C; JONSSON, A-S. Influence of the Membrane Material on the Adsorptive Fouling of Ultrafiltration Membranes. **Journal of Membrane Science**, v.108, p.79-87, 1995.

KELLY, S.T; ZYDNEY, A.L. Protein fouling during microfiltration: comparative behavior of different model proteins. **Biotechnology Bioengineering**, v.55, p.91-100, 1997.

LEBERKNIGHT, J; WIELENGA, B; LEE-JEWETT, A; MENKHAUS, T.J. Recovery of high value protein from a corn ethanol process by ultrafiltration and an exploration of the associated membrane fouling. **Journal of membrane science**, v.366, p.405-412, 2011.

LI, Z; H-KITTIKUNA, A; YOURAVONG, W. Purification of protease from pre-treated tuna spleen extract by ultrafiltration: An altered operational mode involving critical flux condition and diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v.66, p. 368–374, 2009.

LIM, Y.P; MOHAMMAD, A.W. Effect of solution chemistry on flux decline during high concentration protein ultrafiltration through a hydrophilic membrane. **Chemical Engineering Journal**, v.159, p.91-97, 2010.

LIMA, M.R; SILVA, V.P.A. FURTADO, R.F; ALVES, C.R; GUEDES, M.I.F; DUTRA, R.A.F. **Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio**. 3º Congresso brasileiro de mamona, 2008.

LIN, S.H; HUNG, C.L; JUANG, R.S. Effect of operating parameters on the separation of protein sin aqueous solutions by dead-end ultrafiltration. **Desalination**, v.234, p.116-125, 2008.

MANERA, A. P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Optimization of the culture médium for the production of β -galactosidase from *Kluyveroyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v.46(1), p. 66-72, 2008.

MEDEIROS, F.O. ALVES, F.G., LISBOA, C.R; MARTINS, D.S; BURKERT, C.A.V; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Quimica Nova**, v.31(2), p.336-339, 2008.

MIERZWA, J.C; SILVA, M.C.C.; RODRIGUES, L.D.B; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração:avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia sanitária e ambiental**, v.13, p.78-87, 2008.

MORAES, C.C. **Extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Rio Grande, 2006.

NUMANOGLU, Y. & SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004.

OGNIER, S; WISNIEWSKI, C; GRASMICK, A. Influence of macromolecule adsorption during filtration of amembranebioreactormixed liquor suspension.**Journal Membrane Science**, v. 209, p. 27–37, 2002.

PALECEK, S.P; MOCHIZUKI, S; ZYDNEY, A.L. Effect of ionic environment on BSA filtration and the properties of BSA deposits. **Desalination**, v.90, p.147–159, 1993.

PAN, I.H; YAO, H.J; LI, Y.K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p.196-201, 2001.

PEREIRA, I.O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado protéico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, Bahia, 2009.

PINHEIRO, R; BELO, I; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.438-442, 2003.

PORTO, T.S; MEDEIROS- SILVA, G.M; PORTO, C.S; CAVALCANTI, M.T.H; NETO, B.B; LIMA-FILHO, J.L; CONVERTI, A; PORTO, A.L.F; PESSOA-JR., A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.716–721, 2008.

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**, v.41(4), p.315–320, 2003.

SAHA, N.K; BALAKRISHNAN, M; ULBRICHT, M. Polymeric membrane fouling in sugarcane juice ultrafiltration: role of juice polysaccharides. **Desalination**, v.189, p.59-70, 2006.

SAXENA, A; TRIPATHI, B.P; KUMAR, M; SHAHI, V.K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, p.1-22, 2009.

SONG, L. A new model for the calculation of the limiting flux in ultrafiltration. **Journal Membrane Science**, v.144, p.173-185, 1998.

TANG, C.Y; LECKIE, J.O. Membrane independent limiting flux for RO and NF membranes fouled by humic acid. **Environmental Science and Technology**, v.41(13), p.4767-4773, 2007.

TENG, M.Y.; LIN, S.H.; WU, C.Y.; JUANG, R.S. Factors affecting selective rejection of proteins within a binary mixture during cross-flow ultrafiltration. **Journal Membrane Science**, v.281, p.103-110, 2006.

VAN-DE-VEN, W.J.C; VAN'T-SANT, K; PUNT, I.G.M; ZWIJNENBURG, A; KEMPERMEN, A.J.B; VAN DER MEER, W.G.J; WESSLING, M. Hollow fiber dead-end ultrafiltration: Influence of ionic environment on filtration of alginates. **Journal of Membrane Science**, v.308, p.218-229, 2008.

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

Artigo 3

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE: *DESIGN* DO PROCESSO

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE: *DESIGN* DO PROCESSO

RESUMO

A enzima β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) tem sido utilizada na indústria para melhoria das características tecnológicas e sensorias de produtos, principalmente aqueles destinados a pessoas intolerantes a lactose. Para utilização efetiva desta enzima é necessária uma série de etapas em uma sequência que conduza à obtenção do produto com alto fator de purificação e recuperação. Este trabalho teve como objetivo estabelecer o *design* do processo de purificação da enzima β -galactosidase avaliando o uso das técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, diafiltração e sistema aquoso bifásico em diferentes sequências. O *design* que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração, com fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,3%. Foi possível estabelecer um *design* para purificação da enzima β -galactosidase passível de ampliação de escala (*scale up*).

Palavras-chave: sistema aquoso bifásico, cromatografia de troca iônica, precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração.

β -GALACTOSIDASE PURIFICATION: *DESIGN* PROCESS

ABSTRACT

The β -galactosidase enzyme (EC3.2.1.23) has been industrially used for improving the technological and sensory products characteristics, especially those targeted at people that suffer from lactose intolerance. In order to use effectively this enzyme are needed a series of steps is needed in a sequence that leads to obtaining of the product with a high purification factor and recovery. This study aimed to establish the purification design process of the enzyme β -galactosidase evaluating the use techniques as ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, ultrafiltration, diafiltration and aqueous two-phase system in different sequences. The design that showed the best overall purification factor was the sequence formed by aqueous two-phase system, diafiltration, ion exchange chromatography and ultrafiltration, with overall purification factor of 10.8 fold and an overall recovery of 41.3%. It was possible to establish a design to the enzyme β -galactosidase purification with the excellent possibility of scale up.

Keywords: aqueous two-phase system, ion exchange chromatography, precipitation with ammonium sulfate, ultrafiltration.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) é uma enzima que catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose, e tem potencial importância na redução do teor de lactose em produtos lácteos (Gekas & López-Leiva, 1985). A aplicação desta enzima torna possível o consumo de alimentos contendo lactose por pessoas intolerantes a este carboidrato, além disso, contribui com a melhoria das características tecnológicas e sensoriais dos alimentos e na formação de galactooligosacarídeos (Mahoney, 1998; Santos et al., 1998).

O aumento da demanda industrial pela enzima β -galactosidase implica na necessidade de métodos de produção que assegurem a viabilidade econômica da hidrólise de lactose em escala comercial. Portanto, tornam-se fundamentais estudos que contemplem a etapa de purificação da enzima, de modo a maximizar a pureza do processo com menores prejuízos no rendimento (Nor et al., 2001).

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é a adequação da melhor técnica ao processo e a transferência da metodologia para a escala de produção, garantindo que o produto final tenha todas as características para seu uso em humanos, para diagnóstico ou uso veterinário (Ho et al., 2002).

A purificação de enzimas requer uma série de etapas, que conduza à obtenção de produtos com especificações desejadas. A seleção destes passos é denominada como *design* do processo (Wheelwright, 1987). Um *design* de processo de purificação é uma série de etapas de separações, que deve conduzir a um produto com alto fator de purificação e recuperação (Wheelwright, 1989).

O esquema ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto.

Diversas técnicas podem ser utilizadas na composição do *design* de purificação de uma enzima. Dentre elas, destacam-se aquelas que apresentam facilidade de aplicação e ampliação de escala, menores custos e tempo reduzido de operação.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer o *design* do processo de purificação da enzima β -galactosidase e incrementar a pureza e a recuperação na sequência estabelecida, utilizando as técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, diafiltração e sistema aquoso bifásico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedido pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP, e selecionado por Manera et al. (2008) como produtor da enzima β -galactosidase. A cepa foi mantida a 4°C em tubos inclinados, contendo ágar YM (ágar extrato de malte e levedura), composto por (g.L⁻¹): extrato de malte (3,0), extrato de levedura (3,0), peptona (5,0), glicose (10,0) e ágar (20,0).

2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (10,0), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (Pinheiro et al., 2003). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, exceto a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração em membrana de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,22 μ m de diâmetro de poros. Após a esterilização, o meio foi resfriado a temperatura ambiente para adição da lactose esterilizada por filtração e em seguida realizou-se a inoculação da levedura. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm por 24 h (Manera et al., 2008).

2.3. Cultivo submerso

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g.L⁻¹): extrato de levedura (17,0), (NH₄)₂SO₄ (8,8), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,4) e lactose (28,2), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0. A lactose e o meio de cultivo foram esterilizados como descrito no item 2.2. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 30°C, 180 rpm por 96 h (Manera et al., 2008).

2.4. Extração da enzima

A enzima foi extraída em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro. Para isso, foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min, com

intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células. Para obtenção do extrato bruto clarificado, a suspensão celular foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 4°C, 10 min). Um mililitro de célula em suspensão foi obtido por ressuspensão de células, equivalente a 40 mg de célula seca, em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 para obter um volume final de 1 mL (Medeiros et al., 2008).

2.5. Estudo do *design* de purificação da enzima β -galactosidase

O estabelecimento dos diferentes *designs* para purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* constituíram da utilização das técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, diafiltração e sistema aquoso bifásico em diferentes sequências (Figura 1), onde foram avaliados o fator de purificação e a recuperação da enzima após cada etapa e ao final do processo.

2.5.1. Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação da enzima foi realizada pela adição de sulfato de amônio a amostra numa concentração de saturação equivalente a 70%. A adição ocorreu sob constante agitação nos 30 min iniciais a 4°C, seguido de repouso por 14 h (*over night*). Após este período, a amostra foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 4°C, por 10 min) e o precipitado ressuspendido em tampão fosfato de potássio 50 mM (KH₂PO₄) com cloreto de manganês (MnCl₂.4H₂O) 0,1 mM pH 6,6 em uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,6 (Grunenvaldt et al., 2006).

2.5.2. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica foi realizada em uma coluna C10/20 GEHealthcare contendo resina aniônica Q Sepharose Fast FlowTM. A coluna encamisada foi acoplada a um banho de recirculação externo, de modo a manter o sistema refrigerado. A resina foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,5, e a coluna de troca iônica alimentada com extrato enzimático através de bomba peristáltica. O sistema foi operado nas seguintes condições: velocidade de alimentação de 20 cm.h⁻¹, 10°C, e pH 7,5 (Medeiros, 2008); lavagem: tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,5; pré-eluição: tampão cloreto de potássio

0,1 M, pH 6,5; eluição: cloreto de potássio pH 6,5, gradiente salino 0,1 – 1 M e volume do gradiente salino de trinta vezes o volume do leite (Medeiros, 2008).

Na etapa de eluição as frações mais concentradas enzimaticamente foram analisadas quanto à proteína total. Determinadas as frações mais purificadas, estas foram reunidas e utilizadas nas etapas subsequentes do processo.

2.5.3. Ultrafiltração

Os ensaios de ultrafiltração, foram realizados em uma unidade de bancada tipo *dead-end*, de volume útil de 200 mL, agitada por uma barra magnética suspensa a 5 mm da superfície da membrana, para simulação do escoamento em fluxo cruzado. Foi utilizado membrana com massa molar de corte (MWCO) de 50 kDa (Milipore Polyethersulfone PBQK 15005), pressão de operação de 1,5 kgf/cm², em pH adequado a cada etapa da sequência de purificação. O sistema foi operado a 4°C para minimizar perdas por desnaturação, agitação média e constante. A atividade enzimática e o teor de proteína total na alimentação, no retido e no permeado foram quantificados após cada ensaio de permeação, para obtenção do fator de purificação e recuperação da enzima.

2.5.4. Diafiltração

A diafiltração utilizou o mesmo sistema da ultrafiltração, porém a retirada dos sais presentes no extrato foi realizada pela passagem de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,05M, através da membrana (50 kDa), no pH adequado em cada *design*. A completa remoção do sal, no caso do sulfato de amônio, foi acompanhada pelo gotejamento do reagente de Nessler no tampão, até o reagente não indicar coloração, demonstrando o término da diafiltração (Kuhn et al., 2006). Para os demais sais, cloreto de sódio e potássio, foi considerado o mesmo diavolume necessário para remoção do sulfato de amônio.

2.5.5. Sistema aquoso bifásico

O sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio utilizado nos *designs*, foi constituído de 14% de PEG de massa molar 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio (40% (m/m)), em pH 7,0. Esta condição otimizada foi estabelecida em trabalhos anteriores. Os sistemas foram formados em tubos graduados de centrífuga, através da adição de quantidades apropriadas de PEG na

massa molar estabelecida, tampão fosfato de potássio no pH desejado e água. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado mecanicamente em vórtex para completa dissolução do polímero. O sistema foi mantido a 4°C e 20% (m/m) de extrato enzimático de β -galactosidase em pH 7,0 foi adicionado. O sistema foi homogeneizado em agitador tipo vórtex (Phoenix - Araraquara, São Paulo, Brasil) e centrifugado por 10 min, a 4700xg e 4°C. Os volumes das fases foram medidos e as fases de topo e fundo foram separadas e analisadas em termos de atividade enzimática e proteína total. Para verificar a interferência dos componentes (PEG/fosfato de potássio) nas análises realizadas, sistemas controles foram formados, onde a enzima foi substituída por água destilada.

2.6. Fator de purificação

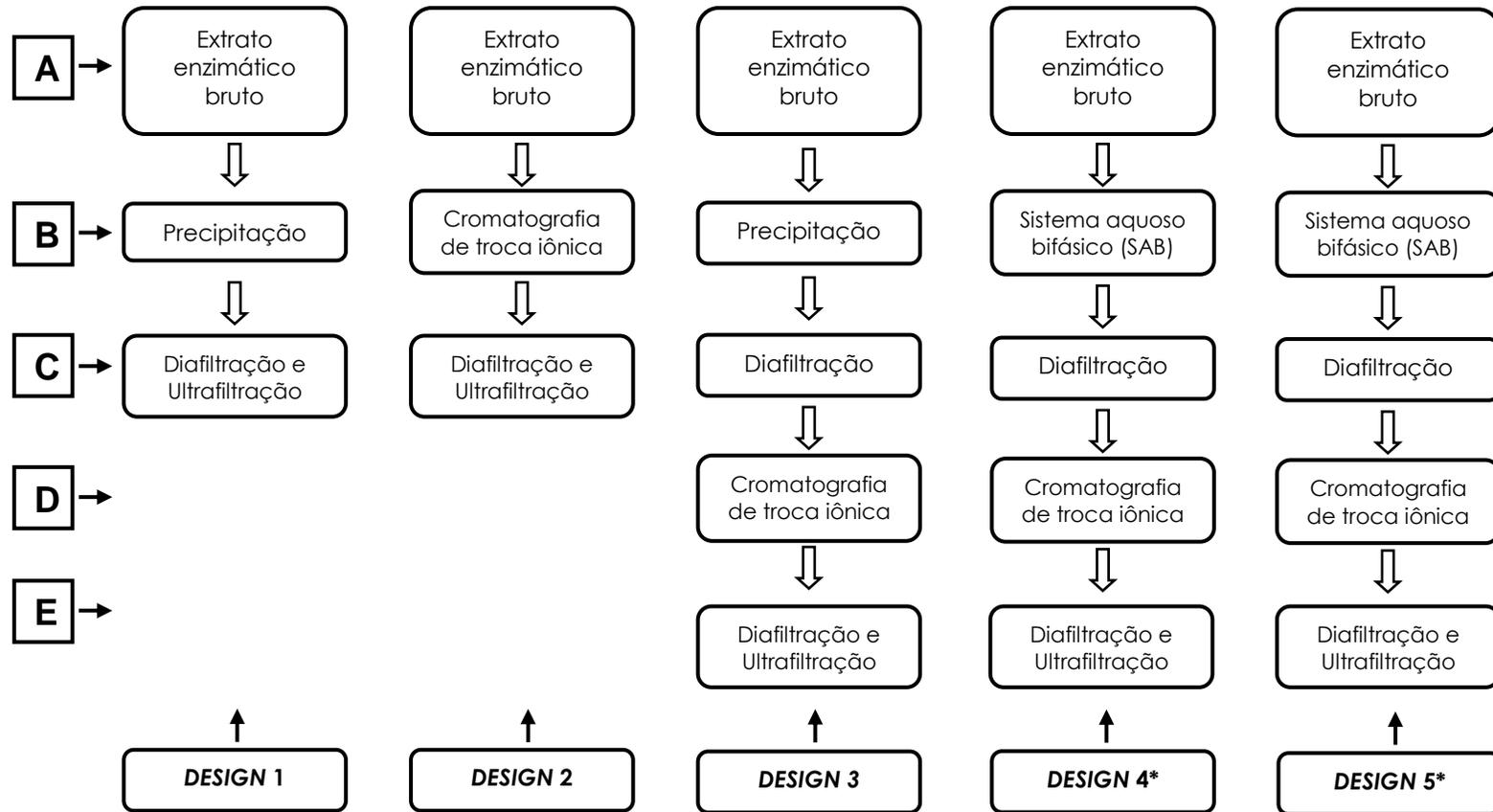
O fator de purificação (FP) foi calculado através da Equação 1 (Porto *et al.*, 2008), sendo utilizado como uma medida para acompanhar as operações de purificação. É definido como a relação entre a atividade específica da β -galactosidase após uma etapa de purificação e a atividade específica de entrada (a partir do extrato aquoso de enzima ou de uma etapa de purificação anterior).

$$FP = \frac{\text{atividade específica da fração purificada}}{\text{atividade específica de entrada}} \quad (1)$$

2.7. Recuperação de β -galactosidase

A recuperação (RP) da β -galactosidase foi calculada através da Equação 2 (Porto *et al.*, 2008), e é definida como a relação da atividade total da enzima coletada em uma fase aquosa após o processo de purificação e a atividade enzimática total adicionada ao sistema.

$$RP = \frac{\text{Atividade da enzima purificada} \times \text{Volume purificado}}{\text{Atividade do extrato enzimático} \times \text{Volume a lim entado}} \times 100 \quad (2)$$



* Os designs 4 e 5 apresentam a mesma seqüência de técnicas, porém uma menor variação de pH entre as técnicas foi utilizada no último.

Figura 1 – Diagrama esquemático dos designs estudados (1, 2, 3, 4 e 5) para purificação da enzima β -galactosidase utilizando diferentes passos (A, B, C e D).

2.8. Métodos analíticos

2.8.1. Determinação de biomassa

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, e convertida para massa de célula seca através de uma curva padrão (Numanoglu & Sungur, 2004).

2.8.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Aldrich) de acordo com Inchaurredo et al. (1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C e pH 6,6.

2.8.3. Determinação da proteína

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ampla gama de características das proteínas presentes no extrato enzimático fornecem muitas opções para as etapas de purificação, assim, estas foram utilizadas de forma a alcançar bons resultados durante a tentativa de purificar a enzima β -galactosidase. A purificação do extrato enzimático bruto envolveu as etapas de precipitação com sulfato de amônio, diafiltração, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração e sistema aquoso bifásico em diferentes sequências, como demonstrado na Figura 1.

A Tabela 1 mostra os resultados de fator de purificação e recuperação em cada uma das etapas dos diferentes *designs*, assim como, o fator de purificação e a recuperação global da enzima ao final das sequências.

Nas sequências propostas em que havia a utilização de sal no processo de purificação, a etapa de diafiltração foi inserida para remoção do sal (sulfato de amônio, cloreto de potássio e fosfato de potássio), uma vez que a alta concentração deste composto pode desnaturar a enzima e interferir nas etapas seguintes de purificação.

Tabela 1 – Avaliação do fator de purificação e recuperação em cada *design* estudado para a enzima β -galactosidase.

<i>Designs</i>	Fator de purificação (FP)							% Recuperação (RP)						
	A	B	C	B+C	D	E	Global	A	B	C	B+C	D	E	Global
1	1	1,4	1,2	1,6	-	-	1,6	100	94,8	85,3	80,8	-	-	80,8
2	1	4,8	1,0	4,7	-	-	4,7	100	64,0	93,4	59,7	-	-	44,8
3	1	1,6	1,0	1,6	4,4	1,1	7,2	100	91,5	92,4	84,5	49,2	90,1	28,5
4	1	2,3	1,1	2,0	3,8	1,1	4,9	100	134,7	89,2	120,1	50,1	91,8	30,8
5	1	1,8	1,1	2,0	4,6	1,1	10,8	100	115,3	98,3	113,3	54,2	94,7	41,3

As etapas empregadas nos designs como a ultrafiltração, precipitação e diafiltração, apresentaram resultados indicando seu uso apenas para remoção de sal e concentração da enzima. O maior incremento no fator de purificação (FP) da enzima ocorreu nos designs formados por duas etapas de purificação, utilizando a cromatografia de troca iônica e/ou sistema aquoso bifásico. Se por um lado tais etapas propiciaram os maiores fatores de purificação, por outro representam as maiores perdas em relação à recuperação enzimática, principalmente a de maior resolução que é a troca iônica. O maior número de etapas no design provoca perdas muito maiores, tanto no volume em trânsito no processo, quanto na atividade enzimática durante as operações.

Embora a utilização da técnica de precipitação com sulfato de amônio tenha apresentado alta recuperação, sempre superior a 90%, a purificação foi muito baixa, o que pode ser explicado pela retirada de apenas alguns contaminantes durante o fracionamento. A utilização do sulfato de amônio em elevadas concentrações altera as características estruturais das proteínas presentes no extrato enzimático e reduz a disponibilidade da água devido à hidratação dos íons fazendo com que estas percam a capacidade de se tornarem solúveis e desta forma, as proteínas precipitam. Ainda que seja uma técnica de fácil ampliação de escala e com custos aceitáveis para grandes volumes, é uma técnica mais de concentração do que propriamente de purificação.

A cromatografia de troca iônica foi a técnica que apresentou o maior fator de purificação. A razão para o melhor desempenho está relacionada com o seu alto poder de resolução e seletividade, baseado na separação das biomoléculas de acordo com suas cargas (Pessoa-Jr. & Kilikian, 2005).

A redução da perda da molécula alvo no processo de purificação é fundamental para garantir a viabilidade do processo, porém esta deve estar sempre associada a um elevado fator de purificação.

Levando-se em consideração a recuperação global das sequências avaliadas, o *design 1* foi o que apresentou a maior recuperação global, porém, esta alta recuperação é justificada pela utilização de apenas um método de purificação, que diminui as perdas durante a purificação. Mesmo apresentando a maior recuperação, o *design 1* não mostrou-se eficiente, uma vez que não houve um incremento significativo na purificação ao final da sequência.

Comparando-se o sistema aquoso bifásico (*design 4* ou *5*) com a precipitação com sulfato de amônio (*design 1* ou *3*), como etapas iniciais nos processos de purificação, o primeiro torna-se muito mais interessante sob três pontos de vista: **(i)** apresenta um maior fator de purificação e visivelmente uma elevada recuperação, resultante da remoção de metabólitos que inibem a atividade enzimática; **(ii)** tempo reduzido de processo, o que pode viabilizar a utilização desta etapa no processo de purificação, e **(iii)** pelo extrato enzimático purificado apresentar-se muito mais clarificado – livre de células e outros materiais biológicos – o que torna as etapas posteriores de diafiltração e ultrafiltração muito mais eficientes pela maior permeabilidade nas membranas, resultante da redução de células e aglomerados protéicos.

Os *designs 4* e *5* foram realizados utilizando-se a mesma sequência de técnicas de purificação, porém, com menor troca de pH entre as etapas. No *design 5* a diafiltração para retirada do sal após os processos de purificação, foi realizada no pH de saída de cada etapa, já no *design 4*, foi realizada sempre no pH de estabilidade da enzima (pH 6,6). Este ajuste no processo ocasionou um aumento em torno de 42% na recuperação da enzima e um incremento de 220,4% no fator de purificação.

É importante salientar que, todos os processos utilizados neste trabalho, sejam para purificação, concentração, ou até mesmo para polimento do material biológico são passíveis de aumento de escala, permitindo a transição de um volume de extrato enzimático menor, para um volume bem superior.

Segundo Wheelwright (1989), o processo de purificação ideal deve fornecer um produto de alta qualidade, em termos de pureza e menor custo. A determinação de uma sequência de etapas de um processo integrado deve assegurar sua viabilidade de aplicação, e principalmente, permitir a purificação de proteínas em larga escala.

Segundo Moraes (2006), em um processo de purificação o importante é utilizar diferentes métodos que se baseiam em propriedades físicas diferentes de separação, pois a cada etapa de separação deve-se tentar obter o máximo de recuperação possível.

Com base nos resultados expostos anteriormente, pode-se dizer que o *design* 5 foi o que proporcionou os melhores resultados, pois apresentou o maior fator de purificação (10,8 vezes) e uma recuperação global de 41,32%.

Moraes & Kalil (2009) estudaram o *design* para purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* utilizando as técnicas de precipitação com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica e permeação em gel, em quatro diferentes sequências. O processo que demonstrou os melhores resultados foi o que se utilizou primeiramente precipitação com sulfato de amônio e diálise, seguido de cromatografia de troca iônica. O produto obtido ao final da sequência apresentou um fator de purificação de 6,3 vezes e uma recuperação de 44%.

Alcântara et al., (2006) utilizou as técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, diálise, centrifugação e permeação em gel para purificar β -galactosidase de cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. Nesta sequência obteve um fator de purificação de 13,5 vezes, porém com uma recuperação extremamente inferior, somente 0,63%.

Outros trabalhos referentes à obtenção de *designs* para purificação de proteínas, e principalmente para a enzima β -galactosidase não são encontrados na literatura. Desta forma, esse trabalho apresenta grande relevância pela contribuição na obtenção de um *design* para purificação desta enzima, passível de ampliação de escala (“*scale up*”).

4. CONCLUSÃO

As etapas de diafiltração, ultrafiltração e precipitação não propiciaram um grande incremento no fator de purificação da enzima, porém, mostraram-se viáveis na remoção de sal presente no extrato enzimático e na concentração da enzima.

O sistema aquoso bifásico apresentou vantagens para aplicações em etapas iniciais, pela remoção elevada de células e contaminantes.

O *design* que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência de número 5, formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e diafiltração/ultrafiltração, fornecendo um fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,3%.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, P.H.N.; MARTIMA, L.; SILVA, C.O.; DIETRICH, S.M.C.; BUCKERIDGE, M.S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.619-627, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v.20, p.1-12, 1985.

GRUNENVALDT, F.L.; VEIGA, I.G.; KUHN, K.R.; KALIL, S.J. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando a técnica de precipitação**. XXI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia, Ijuí, RS, 2006.

HO, P.L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas: uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnologia**, v.13, p.24-26, 2002.

INCHAURRONGO, V.A.; FLORES, M.V.; VOGET, G.E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v.20, p.291-298, 1998.

KUHN, K. R.; VEIGA, I. G.; GRUNENVALDT, F. L.; **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando a técnica de precipitação**. Projeto de Graduação do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2006.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v.63, p.147-154, 1998.

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, p.66-72, 2008.

MEDEIROS, F.O. **Adsorção e purificação da enzima beta galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2008.

MEDEIROS, F.O. ALVES, F.G., LISBOA, C.R; MARTINS, D.S; BURKERT, C.A.V; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v.31, nº2, p.336-339, 2008.

MORAES, C.C. **Extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. **Bioresource Technology**, v.100, p.5312-5317, 2009.

NOR, Z.M.; TAMER, M.I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J.M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E.J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.845-849, 2001.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v.39, p.703-709, 2004.

PESSOA-Jr, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Editora Manole, 2005.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.438-442, 2003.

PORTO, T.S.; MEDEIROS-SILVA, G.M.; PORTO,C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA-JR, A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.716-721, 2008.

SANTOS A.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.558-567, 1998.

WHEELWRIGHT, S.M. Downstream processes for large-scale protein purification. **Journal Biotechnology**, v.5, p.789-793, 1987.

WHEELWRIGHT, S.M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal Biotechnology**, v.11, p.89-102, 1989.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4. CONCLUSÃO GERAL

As condições otimizadas para a purificação e recuperação da enzima utilizando sistema aquoso bifásico, foram obtidas com o sistema composto por uma concentração de 14% de polietilenoglicol de massa molar 4000 e 15% de tampão fosfato de potássio em pH 7,0, com valores de fator de purificação e recuperação de 3,8 vezes e 101,7%, respectivamente.

A utilização da técnica de ultrafiltração possibilitou a concentração do extrato enzimático em até 8,1 vezes, indicando sua viabilidade para redução do volume inicial nas etapas de purificação. A UF apresentou grande potencial, pois atingiu elevados valores de recuperação da enzima, em torno de 112,7%.

O *design* que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e diafiltração/ultrafiltração, com um fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,3%.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P.H.N.; MARTIM, L.; SILVA, C.O.; DIETRICH, S.M.C.; BUCKERIDGE, M.S. Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaeacourbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.619–627, 2006.

ALVES, F.G.; MEUGERI-FILHO, F.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.1528-1539, 2010.

ATES, S.; MEHMETO, U. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry**, v.32, p.433-436, 1997.

BANSAL, S.; OBEROI, H.S.; DHILLON, G.S.; PATIL, R.T. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, p.337–341, 2008.

BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L. **Bioseparations-downstream processing biotechnology**. John Wiley and Sons, 1988.

BRADY, D.; MARCHANT, L.; MCHALE, A. P. Isolamento e caracterização parcial de beta-galactosidase produzida por uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* termotolerante durante o crescimento em meios contendo lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.699-699, 1995.

CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GBMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* baker's yeast. **Food Research International**, v.28, p.37-41, 1995.

CAMPESE, G.M.; TAMBOURGI, E.B. Índice de recuperação de proteína em sistemas de duas fases aquosas PEG-Policaju, usando coluna pulsada. In: VI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007.

CARDOSO, M.V.C. **Efeito do centro metálico nas interações intramoleculares dos complexos $[M(CN)_5NO]^{x-}$ com o poli(óxido de etileno) em sistema aquoso bifásico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

CECCHI, M.H. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da Unicamp, 2ª edição, 2003.

CESAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

CESAR, A.C.W. **Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V.I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R.A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, p.434-443, 2005.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, p.3514-3518, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** Editora da Unicamp, 6ª edição, 1995.

CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDAN, M.A.; RAMIREZ, O.T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v.40, p.773-778, 2005.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v.3, p.343-348, 2005.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.11, p.1-12, 2008.

DEL-VAL, M.I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.118-126, 2003.

EISENMENGER, M.J.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. High pressure enhancement of enzymes: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.331-347, 2009.

FREITAG, R.; HORVÁTH, C. Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v.53, p.17-59, 1995.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v.20, p.1-12, 1985.

GHOSH, R. **Protein bioseparation using ultrafiltration: theory, applications and new developments**. Ed. Imperial College Press, 2003.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v.167, p.47-53, 2000.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane surface pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v.139, p.17-28, 1998.

GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VIERA, F.B.; BRENA, B.M. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p.597-606, 2001.

HO, P.L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas: uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.13, p.24-26, 2000.

HSU, C.A.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Production of β -galactosidase by bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology** v.104, p.197-206, 2005.

HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; PAPAMICHALE, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes. **Process Biochemistry**, v.23, p. 129-137, 1988.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.

INCHAURRONDO, V.A.; FLORES, M.V.; VOGET, G.E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.291-298, 1998.

KIELING, K. Enzimas: aspectos gerais. Material didático: Engenharia bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro tecnológico. Florianópolis, 2002.

KNIGHT, P. Chromatography: 1989 report. **Nature Biotechnology**, v.7, p.243-249, 1989.

KUHN, K.R.; VEIGA, I.G.; GRUNENVALDT, F.L.; **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando a técnica de**

precipitação. Projeto de Graduação do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2006.

LIMA, M.R.; SILVA, V.P.A.; FURTADO, R.F.; ALVES, C.R.; GUEDES, M.I.F.; DUTRA, R.A.F. Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio. **3º Congresso Brasileiro de Mamona**, 2008.

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para a produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2006.

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, p.66-72, 2008.

MARQUEZ, L.D.S.; ARAÚJO, E.H.; RIBEIRO, E.J. Estudos de meios de cultura na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Florianópolis, 2003.

MEDEIROS, F.O. **Adsorção e purificação da enzima beta galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2008.

MORAES, C.C. **Extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2006.

MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract. **Bioresource Technology**, v.100, p.5312-5317, 2009.

MOURA, C.L.A.; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária:Agroindústria Tropical**, Fortaleza, CE, 2007.

NAGANAGOUDA, K.; MULINAMI, V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. **Process Biochemistry**, v.43, p.1293-1299, 2008.

OLIVEIRA, F.L. **Precipitação de proteínas com sulfato de amônio saturada.** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007.

ORNELAS, A.P.; SILVEIRA, F.C.; PASSOS, F.M.L. The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey

as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1008-1013, 2008.

PASTORE, G.M. Isolamento de microrganismos produtores de invertase lactase e aproveitamento para a produção de prebióticos industrial. IX Feira de Ciência e Arte. UNICAMP, Campinas – SP, 2010.

PECOTA, D.C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N.A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.408-416, 2007.

PEREIRA, J.A.M; **Adsorção de β -Galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Biblioteca Virtual. Campinas. 1999.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Editora Manole, 2005.

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 and Biotechnology**, v.41, p.315-320, 2003.

RODRIGUEZ, A. P., LEIRO, R. F., TRILLO, M. C., CERDAN, M. E., SISO, M. I.G., & BECERRA, M. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis*-*Aspergillus niger* beta-galactosidase. **Microbial Cell Factories**, v.5, p.1–13, 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*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, p.567-572, 2004.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B.P.; KUMAR, M.; SHAHI, V.K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, p.1-22, 2009.

SERIO, M.D.; MATURO, C.; ALTERIIS, E.D.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, v.79–80, p.333–339, 2003.

SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI, D.Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p.195-203, 2004.

SILVA, A.P.R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

SILVA, L.H.M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v.29, n.6, p. 1345-1351, 2006.

SILVA, L.L. **Avaliação do efeito do sal volátil carbamato de amônio sobre a estabilidade de enzimas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2008.

SILVA, M.C.H; SILVA, L.H.M; PAGGIOLI, F.J. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v.29, p.1332-1339, 2006.

SOUSA, G.D.B. Influência da aeração na síntese de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T.; STEINBO, M.; KULBE, K.D.; LORENZ, W.; HALTRICH, D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuter*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4999-5006, 2006.

TANUJA, S.; SRINIVAS, D.N.; GOWTHAMAN, K.M.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.63-68, 2000.

VITOLO, M. **Noções sobre fontes e produção de enzimas**. Universidade de São Paulo, 2001.

WHEELWRIGHT, S.M. Downstream processes for large-scale protein purification. **Journal Biotechnology**, v.5, p.789-793, 1987.

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, p.33–40, 2001.

ZUÑIGA, A.D.G.; PEREIRA, J.A.M.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **CEPPA**, v.21, p.61-82, 2003.