



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção da enzima β -galactosidase recombinante em biorreatores através de cultivos em batelada alimentada com controle DO-stat e Linear

Felipe Yuji Okano^{2,4}, Bruna Coelho de Andrade^{2,3}, Victoria Furtado Migliavacca^{2,5},
Vanessa Yuki Grafulin^{2,4}, Juleane Lunardi², Gustavo Roth^{2,3}, Diógenes Santiago Santos³,
Joceli Maria Chies², Gaby Renard², Giandra Volpato⁴

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul- Campus Porto Alegre
90030-041 Porto Alegre- RS

²Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda
90619-900 Porto Alegre-RS

³Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
90619-900 Porto Alegre-RS

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul
90050-170 Porto Alegre- RS

⁵Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
90010-191 Porto Alegre- RS

RESUMO

A β -galactosidase é uma enzima que hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos constituintes, tendo grande importância para a indústria de laticínios. O objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da β -galactosidase recombinante em biorreatores, por meio de cultivos em batelada alimentada com controle DO-stat e Linear. Os cultivos foram realizados em biorreatores de 2 L, foram utilizadas a cepa de Escherichia coli recombinante BL21(DE3), contendo o gene da β -galactosidase de Kluyveromyces sp, o meio LB foi utilizado como meio de cultura e a temperatura de 30°C. Nos cultivos em batelada alimentada, a alimentação foi iniciada após 5 h, e os cultivos foram conduzidos por 30 h. Foram estudados três tempos de indução para expressão da enzima (12h, 18h e 24h), utilizando 1 mM de isopropiltiogalactosídeo (IPTG). As maiores atividades enzimáticas específicas (aproximadamente 40 U/mg_{proteína}) foram obtidas no cultivo com alimentação DO-stat e com indução em 12h de cultivo.

Palavras-chave: lactase, isopropiltiogalactosídeo, fermentação, atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase ou lactase é uma das principais enzimas utilizadas no processamento de alimentos. Sua aplicação tem sido na hidrólise da lactose do leite ou derivados lácteos (Pereira-Rodríguez *et al.*, 2012). Esta enzima também tem sido utilizada como suplemento alimentar por indivíduos intolerantes à lactose (Belem e Lee, 1998). A intolerância a lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo. O número de indivíduos diagnosticados com esta intolerância tem aumentado



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

mundialmente, fazendo com que o mercado disponibilize cada vez mais produtos para este público específico, consequentemente aumentando o uso desta enzima (Panesar *et al.*, 2006).

O uso industrial de enzimas, ainda apresenta um aumento de custo significativo no processo, que se reflete no valor do produto final. Uma alternativa, para aumentar a produtividade e rendimento do processo, seria a utilização da enzima recombinante e produção em larga escala, através de cultivos em batelada alimentada. Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a superexpressão da β -galactosidase recombinante em biorreatores, por meio de cultivos em batelada alimentada com controle DO-stat e Linear.

MATERIAL E MÉTODOS

Os cultivos foram desenvolvidos em biorreator de bancada com duas dornas de 2 L cada (BIOSTAT[®] B Plus). No cultivo foi monitorado o oxigênio dissolvido (OD), consumo de glicose, pH, temperatura, agitação e biomassa. Em todos os cultivos em biorreatores (em batelada e em batelada alimentada), foram utilizadas a cepa de *E. Coli* recombinante BL21(DE3) transformada com o gene que expressa a β -galactosidase de *Kluyveromyces sp.*, o meio de cultura LB (10 g/L cloreto de sódio, 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura, 16 g/L de ágar) e a temperatura de 30°C. Estas condições foram determinadas em cultivos prévios realizados em *shaker*. Os pré-inóculos, foram realizados em *shaker*, com agitação de 180 rpm, em meio de cultivo LB, temperatura de 37°C, por aproximadamente 18 h.

Os cultivos em batelada alimentada foram realizados com volume inicial de 1 L de meio de cultivo LB. O meio de alimentação utilizado continha: 400 g/L de glicose, 25 g/L de sulfato de magnésio e LB concentrado (2 x), a alimentação foi ligada após 5 h de cultivo em batelada e os cultivos foram conduzidos por 30 h. Foram testadas duas estratégias de alimentação: (I) DO-stat, onde a concentração de oxigênio dissolvido (pO_2) foi mantida acima de 30%, a agitação na fase alimentada foi aumentada gradativamente, em um intervalo de 90 minutos, de 650 rpm para 750 rpm permanecendo até o final do cultivo; (II) Linear ascendente com variação de 1 a 3% da vazão total da bomba de alimentação, nesta estratégia o pO_2 foi mantido em 30% através de cascata de agitação.

Foram estudados três tempos de indução para expressão da enzima (12 h, 18 h e 24 h), utilizando 1 mM de IPTG. Os experimentos foram realizados em duplicatas. Foram realizadas coletas ao longo dos cultivos, onde foi determinada a concentração celular. Após cada coleta as amostras foram centrifugadas, onde nos sobrenadantes foram analisadas as concentrações de glicose e acetato. Os precipitados (*pellet* de células), foram padronizados em densidade óptica (OD) 5 (600 nm), em seguida ressuspensos em 500 μ L de tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, rompido por sonicação (três pulsos de 10 s) e centrifugados a 4°C, 13.000 rpm por 30 minutos. As frações foram separadas (solúvel e insolúvel) e analisadas.

MÉTODOS ANALÍTICOS

A densidade óptica dos cultivos foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. A expressão da β -galactosidase foi analisada nas frações solúveis e insolúveis, por meio de SDS-PAGE (12%), utilizando *Comassie Brilliant Blue* como corante e o marcador de peso molecular Page Ruler (ThermoScientific). A proteína intracelular foi quantificada pelo método de Bradford (*Bradford Protein Assay Kit*, BioRad). A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada segundo a metodologia proposta por Rech *et al.*



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

(1999), com modificações, utilizando ONPG (o-nitrofenol- β -D-galactopiranoside) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP (o-nitrofenol) por minuto, nas condições da análise.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela I estão apresentados os valores máximos de atividade específica da β -galactosidase, além dos parâmetros cinéticos dos cultivos estudados. Verifica-se que a atividade máxima foi obtida no cultivo com alimentação DO-stat e com indução em 12 h de cultivo. Os parâmetros cinéticos envolvidos na produção da enzima, como produtividade e rendimento enzimáticos também foram maiores nesta condição. Quando se estudou os tempos de indução com alimentação linear a maior atividade específica e produtividade enzimática foram obtidos com 18 h de indução. Os menores valores foram observados quando utilizada esta estratégia de alimentação realizando a indução em 24 h de cultivo.

Tabela I. Atividade específica máxima de β -galactosidase e parâmetros cinéticos de cultivo para as diferentes condições testadas.

Condição estudada	Atividade específica máxima (U/mg _{prtoeína})	P_X (g/L.h)	P_P (U/L.h)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
Descontínua alimentada em DO-stat com 12 h de indução	39,42	0,510	1359,4	0,68	1036,6
Descontínua alimentada em DO-stat com 18 h de indução	13,04	0,712	351,5	0,63	193,0
Descontínua alimentada em DO-stat com 24 h de indução	11,11	0,545	491,8	0,68	355,4
Descontínua alimentada linear ascendente com 12 h de indução	10,47	0,653	480,5	0,76	312,8
Descontínua alimentada linear ascendente com 18 h de indução	19,80	0,562	507,0	0,64	238,6
Descontínua alimentada linear ascendente com 24 h de indução	3,70	0,735	89,9	0,91	27,1

P_X = produtividade de células; P_P = produtividade enzimática; $Y_{X/S}$ = rendimento celular (conversão de substrato em células); $Y_{P/S}$ = rendimento enzimático (conversão de substrato em enzima).

A Figura I apresenta a expressão da β -galactosidase, nas frações solúvel e insolúvel, para o cultivos com alimentação em DO-stat com tempo de indução de 12 h.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

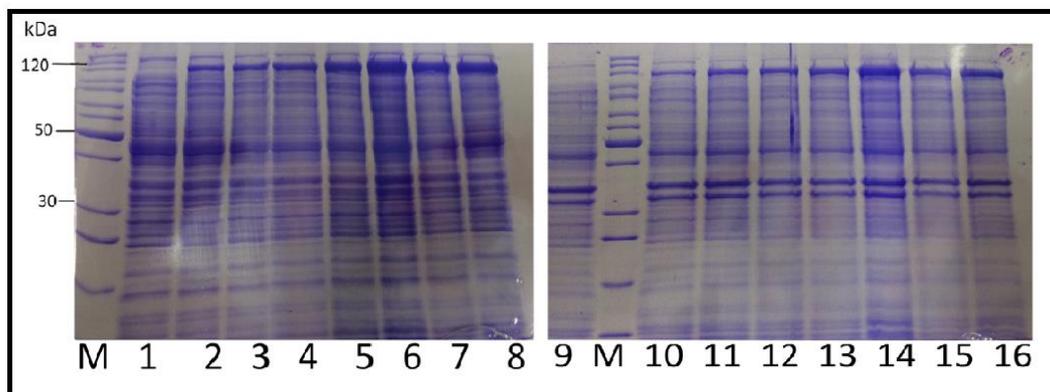


Figura I. Expressão solúvel e insolúvel β -galactosidase no cultivo descontínuo alimentado utilizando a estratégia DO-stat com indução em 12 h. **M**: marcador de peso molecular (*Page Ruler*); **1**: expressão solúvel com 12 h de cultivo, sem indução; **2 a 8**: expressão solúvel com indução, nos tempos de cultivo 16 h, 18 h, 20 h, 24 h, 26 h, 28 h e 30 h, respectivamente; **9**: expressão insolúvel com 12h de cultivo, sem indução; **10 a 16**: expressão insolúvel com indução, nos tempos de cultivo 16 h, 18 h, 20 h, 24 h, 26 h, 28 h e 30 h, respectivamente.

Independente da estratégia de alimentação aplicada e do tempo de indução utilizado, verificou-se a expressão da β -galactosidase no tamanho de aproximadamente 120 kDa. Pode-se observar que foi possível obter a expressão da enzima na fração solúvel e que não há expressão sem indução, o mesmo ocorreu para todas as estratégias de alimentação e tempos de indução testados.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificou-se a grande influência das condições de cultivo para a expressão e atividade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. em *E. coli* recombinante, onde o processo em batelada alimentada foi efetivo para a proposta dessa etapa. Os resultados vêm de encontro ao desenvolvimento de tecnologias que visem o desenvolvimento e redução de custos na obtenção de enzimas alimentícias. Como perspectiva deste trabalho temos a purificação da proteína por cromatografia líquida de alta eficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, S. A.; Satar, R., 2012. Recombinant β -galactosidases – Past, present and future: A mini review. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 81, 1-6.
- Belem, M.A.F.; Lee, B.H., 1998. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 598–656.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H., 2006. Microbial production, immobilization and application of β -galactosidase. *J. Chem. Technol. And Biotech.* 81, 530-543.
- Pereira-Rodríguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M.I., Cerdán, M.E., Becerra, M., Sanz-Aparicio, J., 2012. Structural basis of specific in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *J. Struc. Biol.* 177, 392-401.
- Rech, R., Cassini, C.F., Secchi, A., Ayub, M.A.Z., 1999. Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. and Biotech.* 23, 91-96.