



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

**PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*
UTILIZANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO E SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

Eng^a. Ana Paula Rosa da Silva

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

**RIO GRANDE, RS
2009**

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

**PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*
UTILIZANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO E SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS**

Eng^a. Ana Paula Rosa da Silva

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

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2009

“Alguns homens lutam um dia e são bons;
outros lutam um ano e são melhores;
os que lutam vários anos são ótimos;
mas os que lutam a vida toda...
...esses são imprescindíveis.”
(Bertolt Brecht)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças para vencer os obstáculos, por me proteger e acompanhar-me em todos os dias e por ter-me feito forte para atingir o meu ideal. À professora Susana Kalil, pela sua orientação, atenção, amizade e sua constante dedicação no desenvolvimento da dissertação pelos atendimentos em sua casa sempre com conversas e palavras amigas.

À minha família, minha mãe Arlete e ao meu pai Alberto pelo amor, apoio e incentivo dados no transcorrer de todos esses anos. E por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao professor Marco Di Luccio pela acolhida, orientação e amizade sempre procurando solucionar minhas dificuldades e às professoras Helen Treichel e Débora de Oliveira, pela orientação e amizade no período de convivência em Erechim.

Às amigas e companheiras Ana Sanzo e Elisane pelo auxílio técnico e pelas horas de conversa e convívio sincero.

Às minhas colaboradoras Marcela Brites e Juliana Machado, um agradecimento especial, por terem me proporcionado muitos momentos de alegria, companheirismo e amizade e por terem sido essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À Renata Vardanega por toda sua amizade verdadeira e companheirismo dedicado a mim no tempo em que estive em Erechim realizando minhas análises.

À Renata Monteiro pela amizade sincera, verdadeira e eterna, por ter sempre compartilhado comigo todos os momentos durante a graduação e o mestrado, sempre me incentivando, apoiando e ajudando e pelos momentos inesquecíveis que convivemos juntas.

A todos os meus amigos que sempre me entenderam e me incentivaram a seguir nesta caminhada acadêmica.

Pelas conversas durante horas, pelo carinho e pela acolhida nos momentos difíceis de quem é muito especial para mim.

À egrégora do Yôga por toda amizade e mentalizações feitas em prol de minhas análises e no decorrer de todo o mestrado.

Aos amigos e colegas de laboratório Caroline, Ana Paula Manera, Fabiana, Kessiane, Cintia, Dani Alves, Anna Rafaela, Junior, André, Sidney, Jeferson, Joana, Susan, Lidiane e Renata pelo carinho e por proporcionarem momentos descontraídos ao longo desse trabalho.

Aos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Engenharia Bioquímica, Tecnologia de Alimentos e Análise de Alimentos por disponibilizar equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

À PROCAD/CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE EQUAÇÕES..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS..... | 4 |
| 1.1.1 Objetivo Geral..... | 4 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos..... | 4 |
| CAPÍTULO II..... | 5 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 2.1 Enzimas nos Alimentos..... | 6 |
| 2.2 Enzima β -galactosidase..... | 7 |
| 2.3 Produção de β -galactosidase..... | 9 |
| 2.3.1 Microrganismos produtores de β -galactosidase..... | 9 |
| 2.3.2 A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 11 |
| 2.4 Purificação de Bioprodutos..... | 12 |
| 2.5 Purificação por Sistema Aquoso Bifásico..... | 13 |
| 2.5.1 Diagrama de Fases..... | 15 |
| 2.5.2 Coeficiente de Partição..... | 17 |
| 2.6 Processos de Separação com Membranas..... | 18 |
| 2.6.1 Coeficiente de Rejeição..... | 20 |
| 2.6.2 Fatores Limitantes dos Processos de Separação por Membranas..... | 20 |
| 2.6.3 Limpeza dos módulos de membranas..... | 21 |
| 2.7 Purificação da enzima β -galactosidase..... | 22 |
| 2.8 Considerações Finais..... | 24 |
| CAPÍTULO III..... | 25 |
| 3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO..... | 25 |
| PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)..... | 27 |
| RESUMO..... | 27 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 2.1 Microrganismo..... | 29 |
| 2.2 Preparo do Inóculo..... | 29 |
| 2.3 Fermentação Submersa..... | 29 |
| 2.4 Extração da Enzima β -galactosidase | 30 |
| 2.5 Purificação da Enzima β -galactosidase por Sistema Aquoso Bifásico | 30 |
| 2.5.1 Massa Molar do Polietilenoglicol (PEG) | 30 |
| 2.5.2 Determinação da Curva Binodal | 30 |
| 2.5.3 Estudos de Partição | 31 |
| 2.5.4 Efeito da Massa Molar do PEG e do pH no Processo de Purificação..... | 32 |
| 2.5.5 Fator de Purificação (FP)..... | 32 |
| 2.5.6 Recuperação de β -galactosidase (RP)..... | 32 |
| 2.5.7 Coeficiente de Partição (K_{part}) | 33 |
| 2.5.8 Razão de Volumes do Sistema | 33 |
| 2.6 Métodos Analíticos..... | 33 |
| 2.6.1 Determinação da Biomassa | 33 |
| 2.6.2 Determinação da Atividade Enzimática da β -galactosidase | 33 |
| 2.6.3 Determinação da Proteína | 34 |
| 2.6.4 Determinação do pH | 34 |
| 3 RESULTADOS | 34 |
| 3.1 Purificação da Enzima β -galactosidase por Sistema Aquoso Bifásico (SAB) | 34 |
| 3.1.1 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 6,0 no SAB..... | 34 |
| 3.1.2 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 7,0 no SAB..... | 37 |
| 3.1.3 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 8,0 no SAB..... | 40 |
| 4 DISCUSSÃO | 43 |
| 5 CONCLUSÃO | 45 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β-GALACTOSIDASE(<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO | 50 |
| RESUMO | 51 |
| 1 INTRODUÇÃO | 52 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 53 |

| | |
|---|----|
| 2.1 Microrganismo..... | 53 |
| 2.2 Preparo do Inóculo..... | 53 |
| 2.3 Fermentação Submersa..... | 54 |
| 2.4 Extração da Enzima β -galactosidase | 54 |
| 2.5 Célula de Ultrafiltração (UF) | 54 |
| 2.6 Adsorção da enzima pela membrana..... | 55 |
| 2.7 Fracionamento e concentração da enzima β -galactosidase | 55 |
| 2.8 Efeito do pH e da força iônica | 56 |
| 2.9 Fator de Purificação (FP) | 56 |
| 2.10 Recuperação de β -galactosidase (RP)..... | 56 |
| 2.11 Retenção (R)..... | 57 |
| 2.12 Métodos Analíticos..... | 57 |
| 2.12.1 Determinação da Atividade Enzimática da β -galactosidase | 57 |
| 2.12.2 Determinação da Proteína | 57 |
| 2.12.3 Determinação do pH | 57 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| 3.1 Fracionamento e concentração da enzima β -galactosidase | 58 |
| 3.2 Influência do pH e força iônica..... | 59 |
| 3.2.1 Influência do pH..... | 59 |
| 3.2.2 Influência da Força Iônica | 60 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 61 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |
| CAPÍTULO IV | 64 |
| CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES..... | 64 |
| 4 CONCLUSÕES GERAIS..... | 65 |
| 5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 66 |
| CAPÍTULO V | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |
| ANEXO..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase..... | 10 |
| Tabela 2: Classificação dos Sistemas Aquosos Bifásicos segundo a Composição..... | 15 |
| Tabela 3: Aplicação das diferentes membranas na separação de vários compostos... | 19 |

CAPÍTULO III

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 6,0..... | 35 |
| Tabela 2: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 6,0..... | 35 |
| Tabela 3: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 6,0..... | 35 |
| Tabela 4: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 6,0..... | 36 |
| Tabela 5: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 6,0..... | 36 |
| Tabela 6: Recuperação e Fator de Purificação PEG 300 pH 7,0..... | 37 |
| Tabela 7: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 7,0..... | 37 |
| Tabela 8: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 7,0..... | 38 |
| Tabela 9: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 7,0..... | 38 |
| Tabela 10: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 7,0..... | 38 |
| Tabela 11: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 7,0..... | 39 |
| Tabela 12: Recuperação e Fator de Purificação PEG 300 pH 8,0..... | 40 |
| Tabela 13: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 8,0..... | 40 |
| Tabela 14: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 8,0..... | 41 |
| Tabela 15: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 8,0..... | 41 |
| Tabela 16: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 8,0..... | 42 |
| Tabela 17: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 8,0..... | 42 |

CAPÍTULO III

CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β -GALACTOSIDASE(*Kluyveromyces marxianus* CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Concentração e purificação da β -galactosidase utilizando membranas de diferentes massas molares de corte..... | 58 |
| Tabela 2: Concentração da β -galactosidase em diferentes pH..... | 59 |
| Tabela 3: Recuperação e Concentração da β -galactosidase com adição de NaCl..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO II****REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Figura 1: Observação microscópica de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.12

Figura 2: Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.....16

CAPÍTULO III**PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)**

Figura 1: Esquema da rotina de ensaios da extração de duas fases aquosas.....31

CAPÍTULO III**CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β -GALACTOSIDASE(*Kluyveromyces marxianus* CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO**

Figura 1: Modelo do sistema de UF.....55

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Equação 1: Coeficiente de Partição (K_{part})..... | 17 |
| Equação 2: Coeficiente de Rejeição (%R)..... | 20 |

CAPÍTULO III

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

| | |
|--|----|
| Equação 1: Fator de Purificação (FP)..... | 32 |
| Equação 2: Recuperação de β -galactosidase (RP)..... | 32 |
| Equação 3: Coeficiente de Partição (K_{part})..... | 33 |
| Equação 4: Razão de Volumes do Sistema..... | 33 |

CAPÍTULO III

CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β -GALACTOSIDASE(*Kluyveromyces marxianus* CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

| | |
|--|----|
| Equação 1: Fator de Purificação (FP)..... | 56 |
| Equação 2: Recuperação de β -galactosidase (RP)..... | 56 |
| Equação 3: Retenção (%R)..... | 57 |

RESUMO

A enzima β -galactosidase pode ser encontrada na natureza, distribuída entre vegetais, em órgãos de animais e também ser produzida por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras. A importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite em seus monossacarídeos glicose e galactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose. A β -galactosidase é muito produzida por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, sendo uma enzima intracelular. A purificação da β -galactosidase constitui uma etapa complexa do processo, pois para produtos intracelulares é necessário efetuar o rompimento celular, causando aumento da viscosidade ampliando a diversidade de contaminantes, necessitando de muitas etapas de purificação para remover a enzima desejada, o que aumenta o custo do processo e reduz o seu rendimento. O sistema aquoso bifásico (SAB) é uma alternativa para o primeiro passo de purificação, por remover vários contaminantes em um processo simples e econômico. Os processos de separação por membrana (PSM), como a ultrafiltração, são uma alternativa entre os processos de separação existentes para recuperar, concentrar e até purificar macromoléculas. Estes processos oferecem vantagens como a possibilidade de separação dos produtos e operação em temperaturas brandas, o que os torna adequados para separação de compostos termolábeis como as enzimas. A partir disto este trabalho teve por objetivo estudar a purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica de sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração, determinando as condições de purificação, considerando a pureza e o rendimento da enzima. Na purificação por SAB o sistema era formado por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio, sendo avaliadas as variáveis pH (6,0; 7,0; 8,0) e massa molar de PEG (300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000). A melhor das condições obtida foi com fator de purificação da β -galactosidase de 10,1 vezes e recuperação de 175,2% na fase de fundo do SAB utilizando PEG 8000 no pH 8,0. Testes de ultrafiltração foram realizados a fim de selecionar a massa molar de corte (10, 50 e 60 KDa) de uma membrana comercial mais adequada ao processo, na qual permitisse a passagem da menor quantidade de enzima para o permeado, o que foi quantificado por medidas de atividade enzimática e do teor de proteína na alimentação e no permeado após cada teste. Para o fracionamento com membranas foi utilizado o sistema pH 6,0 e a temperatura entre 5-10 °C em pressão manométrica de 147,1 KPa em uma célula de ultrafiltração tipo "dead-end" com agitação magnética. A membrana de massa molar de corte de 50 KDa foi a que apresentou melhores resultados, permitindo uma recuperação de 66,3% e fator de concentração de 7,6 vezes. Foi avaliada a variação de pH (6,0; 7,0; 8,0) e adição de NaCl à solução de alimentação contendo a enzima utilizando a membrana de 50 KDa selecionada anteriormente. Através dos resultados obtidos, foi verificado que mudanças no pH e na força iônica da solução enzimática não levaram a melhoria na separação.

Palavras-chave: enzimas, membranas, partição.

ABSTRACT

The enzyme β -galactosidase can be found in the nature, distributed among vegetables, in organs of animals and they are also produced by a great amount of microorganisms, such as filamentous fungi, bacteria and yeasts. The industrial importance of the β -galactosidase is in its application in the dairy industry. This enzyme hydrolyzes the lactose, the characteristic carbohydrate of the milk, in their monosaccharides glucose and galactose, improving the solubility and digestibility of the milk and milk-based products, what is ideal for consumers intolerant to lactose. The β -galactosidase is highly produced by the yeast genus *Kluyveromyces*, being an intracellular enzyme. The purification of the β -galactosidase constitutes a complex stage of the process, because for intracellular products it is necessary to break the cells, causing an increase in the viscosity and in the diversity of contaminants. This increase the need for many purification steps for removing the desired enzyme, what increases the cost of the process and reduces its yield. The aqueous two-phase system (ATPS) is an alternative for the first step of purification, since it can remove many contaminants in a simple and economical process. The membrane process (MP), such as ultrafiltration, is an alternative to the existing processes of separation to recover, concentrate and even purify macromolecules. These processes offer advantages as the separation of the products and operation at mild temperatures, which makes this process suitable for heat sensitive compounds, as enzymes. This work aimed to study the purification of the enzyme β -galactosidase produced by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 using aqueous two-phase systems (ATPS) and ultrafiltration, determining the purification conditions and considering the purity and the yield of the enzyme. In the purification using ATPS, the system consisted in polyethyleneglycol (PEG) and potassium phosphate buffer. The pH (6.0; 7.0; 8.0) and molecular weight of PEG (300, 1500, 4000, 6000, 8000 and 10000) were evaluated. The best factor of purification of β -galactosidase was 10.1-fold and recovery of 175.2% in the top phase of ATPS using PEG 8000 at pH 8.0. Ultrafiltration tests were carried out to more select the most suitable molecular weight cut off (10, 50 and 60 KDa) of commercial membranes, which allowed the permeation of the least amount of enzyme to the permeate. The enzymatic activity and the protein content in the feed and permeate were measured in each test. The permeation runs were carried out at pH 6.0 and at 5-10 °C, in a feed manometric pressure of 147.1 KPa, using a dead-end stirred ultrafiltration cell. The membrane with MWCO of 50 KDa was the one that presented the best results, yielding a 66.3% recovery and a concentration factor of 7.6. The variation in pH from 6.0 to 8.0 and the addition of NaCl to the feed solution containing the enzyme were assessed. The results showed that the changes in pH and ionic strength did not influence separation performance, showing the efficiency of the ultrafiltration process in the recovery and concentration of the enzyme.

Key word: enzymes, membranes, partition.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem mostrado inúmeras possibilidades para uma produção em larga escala, de várias proteínas/enzimas que são importantes em pesquisas relacionadas a área farmacêutica e aplicações industriais. Com isso, muitos produtos oriundos de processos biotecnológicos vêm sendo aplicados como alimentos, antibióticos, entre outros.

Segundo Santiago *et al.* (2004) uma destas aplicações vem sendo feita com a β -galactosidase que é uma enzima popularmente conhecida como lactase e classificada como hidrolase. Ela pode ser encontrada na natureza, distribuída entre vegetais, em órgãos de animais e também é produzida por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais.

A importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose, obtendo-se assim, alimentos com baixos teores deste açúcar melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (RAJOKA *et al.*, 2003).

A intolerância a lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como Deficiência de Lactase 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 (SANTIAGO *et al.*, 2004).

A hidrólise da lactose do leite resulta em economia de sacarose, pois diversos produtos fabricados a partir de leite com baixo teor de lactose requerem pouca ou nenhuma adição de sacarose (MAHONEY e WHITATER, 1997). Além disto, este tipo de hidrólise previne a cristalização da lactose em produtos lácteos como doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado entre outros, melhorando as características sensoriais destes alimentos como cor e sabor.

A hidrólise enzimática de lactose em glicose e galactose pela β -galactosidase (EC.3.2.1.23) é um dos processos biotecnológicos mais antigos conhecidos pela humanidade. Os microrganismos usualmente associados à alta produção de β -galactosidase são bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* e leveduras, como *Kluyveromyces* e *Aspergillus oryzae*, através de fermentação em estado sólido e fermentação submersa (BECERRA e GONZÁLEZ SISO, 1996).

O aperfeiçoamento dos processos de separação e purificação de β -galactosidase de origem microbiana são interessantes para reduzir o custo das etapas de preparação da enzima, desde a extração, purificação e concentração, que são geralmente responsáveis por até 40% do custo total de produção (KULA, 1990).

A purificação de bioprodutos como a β -galactosidase constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios. Para produtos associados às células é necessário efetuar o rompimento celular prévio e esses produtos intracelulares tornam o processo de purificação mais difícil em comparação aos extracelulares. Como consequência, ocorre aumento da viscosidade e maior a diversidade de contaminantes. Assim, a purificação de uma determinada proteína pode requerer muitas etapas para remover um grande número de outras proteínas que estão acompanhando aquela que se deseja purificar (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser uma alternativa para o primeiro passo de purificação, por remover vários contaminantes em um processo simples e econômico (MAYERHOFF *et al.*, 2004).

O SAB explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros ou de um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas. As duas fases aquosas assim formadas diferem na sua composição, sendo cada uma delas rica num dos constituintes do sistema, isto é, os dois polímeros ou o polímero e o sal concentram-se em fases distintas (SARUBBO, 2000).

Há vários anos, vem sendo aplicado como alternativa aos sistemas mais estudados, a preparação de SAB com polietilenoglicol (PEG) e sal, principalmente nos processos de grande escala, pois apresentam menor custo e maior seletividade (LIMA, 2002).

Para a viabilização comercial e produção em larga escala de enzimas e proteínas, é preciso uma eficiente técnica de processo “downstream” que seja suficiente para preservar a atividade específica da enzima (SRINIVAS *et al.*, 2002)

Há diversas vantagens no SAB, quando comparados com outras técnicas de separação, comumente utilizadas, no qual podemos citar a grande quantidade de água em ambas as fases (70-80%), tornando o meio biocompatível, uma baixa tensão interfacial, minimizando a degradação do produto. Proporcionando dessa forma, uma boa resolução e alto rendimento. Este sistema apresenta ainda, alta capacidade e fácil “scale-up”, além de utilizar materiais de baixo custo, com possibilidade de reciclagem do polímero, e capacidade de extrair um material em particular diretamente do meio (MAYERHOFF *et al.*, 2004).

Nos sistemas de separação por membranas, usualmente utilizados na indústria de alimentos, o fluido contendo dois ou mais componentes é colocado em contato com uma membrana que permite a passagem seletiva de alguns componentes (GHOSH e CUI, 1998).

Os processos com membranas mais utilizados na recuperação de bioprodutos são a osmose reversa (OR), ultrafiltração (UF), microfiltração (MF) e diálise (D). Tais vantagens envolvem a facilidade no escalonamento dos equipamentos, elevada estabilidade, o processo ocorre em temperaturas moderadas, os estresses químico e físico podem ser minimizados, além de permitir que a concentração e a purificação possam ser obtidas em uma única etapa (ZUNIGA *et al.*, 2003).

A principal vantagem é a separação contínua dos produtos, que permeiam a membrana, dos reagentes e enzimas que, devido ao seu elevado peso molecular, ficam retidas (CHARCOSSET, 2006). Sendo que dependendo do diâmetro de poros da membrana, as enzimas podem passar pela mesma.

Segundo SILVA (2006) é alta a demanda por métodos de extração e purificação de biopartículas (proteínas, enzimas, células) que sejam eficientes e economicamente viáveis. Nessa linha é importante o estudo do SAB e do processo de ultrafiltração para recuperação e purificação da β -galactosidase avaliando as variáveis que conduzam a uma maior purificação sem grandes perdas na recuperação da enzima.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo estudar a purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica de sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração.

1.1.2 Objetivos Específicos

Estudar a purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica do sistema aquoso bifásico (SAB) em sistemas constituídos de diferentes massas molares de PEG e de valores de pH;

Avaliar o desempenho do processo de ultrafiltração na concentração e purificação da enzima β -galactosidase;

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas nos Alimentos

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica, que participam nas reações químicas que ocorrem em células vivas. As enzimas atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade daquelas em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, a temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como reduzindo as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Embora todas as enzimas sejam produzidas, inicialmente, no interior das células, algumas são excretadas através da parede celular e funcionam no ambiente em que está a célula. Com base no local de ação, são considerados dois tipos de enzimas: enzimas intracelulares ou endoenzimas e enzimas extracelulares ou exoenzimas. A maioria das enzimas produzidas por microrganismos é intracelular e algumas destas têm sido produzidas em uma escala industrial. Muitas dessas enzimas são utilizadas industrialmente, principalmente em alimentos. Os métodos para obtenção do produto intracelular devem ser capazes de romper a parede celular, e ao mesmo tempo não causar inativação das substâncias biológicas (ÖZBEK e ÜLGEN, 2000).

Além da classificação de acordo com o mecanismo de ação, as enzimas são usualmente classificadas quanto a suas fontes produtoras, e este é o método mais empregado para fins de aplicação industrial, que são animal, vegetal e microbiana. As fontes animal e vegetal encarecem os procedimentos de obtenção de preparados e isolados enzimáticos. Já os microrganismos, pela sua distribuição na natureza, são as fontes mais versáteis e fáceis de manuseio em laboratório, e conseqüente produção industrial de enzimas específicas. Os microrganismos produzem uma enorme variedade de enzimas potencialmente úteis, muitas das quais são excretadas ao exterior das células. Além disso, são capazes de desenvolver-se fácil e rapidamente em seu meio de cultivo e a tecnologia a respeito, em grande escala, se encontra hoje bem estabelecida (GACESA e HUBBLE, 1990).

Há enzimas que são rotineiramente utilizadas em processos industriais produzidas por inúmeros microrganismos. Microrganismos tais como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Candida mogii*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Thermus*

thermophilus entre outros. Há um interesse geral no uso da biotecnologia, na aplicação destas enzimas e, também, nos microrganismos que as produzem.

Com o rápido crescimento de produtos industrializados e o desenvolvimento tecnológico, novas prioridades estão sendo estabelecidas para promover a qualidade e o aumento no tempo de conservação dos alimentos. Nos últimos anos, o uso comercial de enzimas cresceu de um papel insignificante para um importante aspecto do processamento de alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Neste contexto, a Indústria Alimentícia passou a introduzir novas técnicas em sua linha de fabricação, utilizando a catálise biológica, envolvendo enzimas e outros compostos que fossem capazes de conferir aos alimentos propriedades importantes do ponto de vista comercial (MARIOTTI *et al.*, 2000).

As enzimas são aplicadas nos alimentos com efeitos desejáveis modificando as matérias-primas e/ou obtendo produtos específicos nas indústrias de panificação, modificação enzimática de materiais amiláceos, fabricação de sucos de frutas, modificação de proteínas, fabricação de bebidas alcoólicas e fabricação de laticínios.

Dentre diversas enzimas tem-se a β -galactosidase que catalisa a hidrólise da lactose em galactose e glicose, sendo estes dois açúcares considerados mais doces que a lactose, um dos principais aspectos para a sua aplicação nos alimentos. Aplicações da enzima β -galactosidase nos alimentos podem ser observadas em sorvetes, preservando a cristalização da lactose o qual resulta na textura da fibra; no leite, atuando na estabilização de suas proteínas, em leites congelados por remoção da lactose e na hidrólise da lactose, permitindo o uso por adultos deficientes na lactase intestinal e em crianças com deficiência em lactase congênita (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A base competitiva para se produzir e vender enzimas está na qualidade do produto desejado a um custo aceitável por unidade de produto final. Portanto, é com esta base que se busca microrganismos para a produção de novas enzimas industriais, utilizando-se normalmente organismos com classificação GRAS (Generally Recognized as Safe). Mas, se a descoberta de uma nova enzima for necessária, deve-se abrir uma triagem de modo a se ampliar a possibilidade de encontrá-la (PIVARNIK *et al.*, 1995).

2.2 Enzima β -galactosidase

β -galactosidase ou lactase (EC 3.2.1.23) é uma importante enzima na indústria farmacêutica e alimentícia. As principais fontes de β -galactosidases são as bactérias, fungos e leveduras. Um ponto crítico do estudo da produção desta enzima está

relacionado com a determinação das condições ótimas para o crescimento celular. A purificação deste tipo de enzima por ser esta uma enzima intracelular requer muitas etapas, sendo necessário encontrar a melhor estratégia para a escala de produção pretendida. Limitações nutricionais e controles adequados de parâmetros físicos e químicos da cultura oferecem uma interpretação do metabolismo celular e da regulação do modelo de síntese enzimática (ALCÂNTARA *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2004).

As β -galactosidases são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Galb1 - 4Glc) para formar glicose e galactose. As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais - particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã, em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, sendo os fungos as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais (JURADO *et al.*, 2002).

As propriedades das enzimas dependem de suas fontes. Suas melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte da mesma. Em geral, lactases apresentam a melhor condição de operação num faixa ácida (2,5-4,5) e lactases de leveduras e bactérias numa região de pH neutro (6,0-7,0 e 6,5-7,5) respectivamente. Estas diferentes condições de pH fazem com que cada lactase seja apropriada para uma aplicação específica. Então, lactases fúngicas são usadas para hidrólise de soro ácido, enquanto as lactases de leveduras e bactérias são apropriadas para leite (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A importância industrial da β -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em seus monossacarídeos glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (LADERO *et al.*, 2004). A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, também conhecida como Deficiência de Lactase 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 (VASILJEVIC e JELEN, 2002).

O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Além disso, as β -galactosidases são também galactotransferases, enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos, constituindo assim, importantes pesquisas na última

década (RIBEIRO *et al.*, 2006). Esta atividade de galactosiltransferase é responsável pela síntese de oligossacarídeos transgalactosilados, que atuam como alimentos funcionais, trazendo diversos efeitos benéficos para seus consumidores (YANG e SILVA, 1995).

2.3 Produção de β -galactosidase

2.3.1 Microrganismos produtores de β -galactosidase

A seleção ou escolha de um microrganismo apropriado é o primeiro e mais importante passo para a produção de enzimas. A escolha do microrganismo deve levar em consideração, entre outros fatores, os seguintes:

- facilidade de cultivo, em substratos simples e econômicos;
- estabilidade em suas características genéticas de produtor de determinada enzima;
- exigências nutritivas;
- facilidade de recuperação da enzima a partir do meio, pelos métodos de extração, concentração e purificação;
- isenção de formação de produtos tóxicos;
- aprovação pelas autoridades sanitárias, quando se trata de enzima para indústria alimentícia (REGULY, 2000).

Existe uma variedade de microrganismos produtores da enzima β -galactosidase. A Tabela 1 apresenta alguns destes microrganismos relatados na literatura.

Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase.

| Microrganismo | Referência |
|---------------------------------|---|
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Rajoka <i>et al.</i> (2003); Santiago <i>et al.</i> (2004); Cortés <i>et al.</i> (2005); Medeiros <i>et al.</i> 2005; Manera (2006); Ribeiro <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | Fontes <i>et al.</i> (2001); Carminatti (2001); Becerra <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | Mahoney e Whitater (1997); Jurado <i>et al.</i> (2002); Ladero <i>et al.</i> (2002); Ladero <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | Kim <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Thermus</i> | Ladero <i>et al.</i> (2005); Ladero <i>et al.</i> (2006a) |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | Vasilijevic e Jelen (2001) |
| <i>Aspergillus Níger</i> | Domingues <i>et al.</i> (2005); Hatzinikolaou <i>et AL.</i> (2005) |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Giacomini <i>et al.</i> (2002); Albayrak e Yang (2002) |

O número de leveduras capaz de utilizar lactose é limitado. Entre elas, as mais expressivas são *Kluyveromyces marxianus* (ou *fragilis*) e *Kluyveromyces lactis*. O mecanismo de absorção e hidrólise da lactose ocorre, após o seu transporte, através da parede celular, mediado pelo sistema lactose-permease. Dentro da célula, o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose pela lactase. Estes açúcares são, então, metabolizados através da via glicolítica normal (RAJOKA *et al.*, 2003).

O uso de lactases nos produtos industriais derivados do leite é uma das mais promissoras aplicações de enzimas no processamento de alimentos (LADERO *et al.*, 2002). A β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* é intracelular e possui características de grande interesse para processos industriais. Estas leveduras apresentam propriedades fisiológicas adequadas para a produção de enzimas para a aplicação na produção de alimentos. A fermentação de lactose por leveduras tais com *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, ou fúngica como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* têm sido utilizado em muitas preparações (RIBEIRO *et al.*, 2006).

2.3.2 A levedura *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui características de grande interesse para processos industriais, tais como crescimento a elevadas temperaturas (40°C), diminuindo os custos de resfriamento e os riscos de contaminação e altas velocidades de crescimento (FURLAN *et al.*, 1995).

Entre os substratos que permitem o crescimento deste microrganismo estão os açúcares galactose, celobiose, xilose, glicose entre outros. Sendo a lactose um substrato passível de utilização, mas, neste caso, sua utilização é intracelular (RAJOKA *et al.*, 2003).

O emprego de *Kluyveromyces marxianus* para a produção de lactase oferece algumas vantagens, tais como:

- bom rendimento de crescimento, o que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos;
- aceitabilidade como um microrganismo seguro, aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias;
- podem crescer a uma ampla faixa de temperatura;
- atividade de β -galactosidase mais alta (em algumas cepas de *Kluyveromyces marxianus*) que outras leveduras quando lactose é usada como substrato.

A versatilidade da utilização da levedura *Kluyveromyces marxianus* (Figura 1) como microrganismo de interesse industrial, tem sido amplamente ilustrada pela diversidade de processos industriais propostos pela literatura. Entre eles, estão a produção de lactase, algumas vezes, simultaneamente, com inulinase e com pectinases. Em todos estes processos, destaca-se a utilização do soro de queijo ou sua fração glicídica como meio de cultura. A possibilidade de utilização desta matéria-prima baseia-se no fato de que as leveduras *Kluyveromyces marxianus* são capazes de metabolizar lactose, o açúcar presente no soro (RECH, 1999).

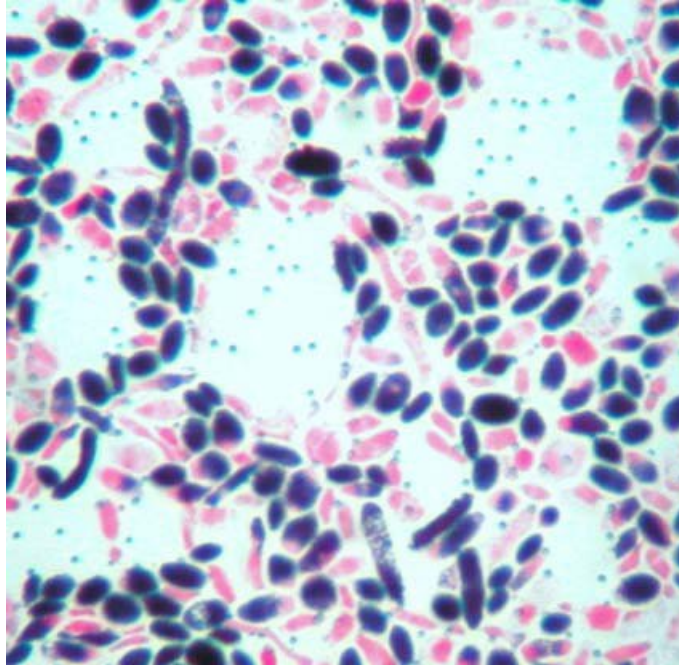


Figura 1: Observação microscópica de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

Fonte: Laboratório de Microbiologia – FURG

2.4 Purificação de Bioprodutos

Com o crescente interesse pela biotecnologia, a atenção tem sido dirigida para os avanços nos aspectos genéticos e técnicos da fermentação. No entanto, pesquisadores consideram que as técnicas de extração e purificação de proteínas são partes inseparáveis do processo biotecnológico global. Avanços em biotecnologia têm aberto numerosas possibilidades para a produção em larga escala de muitas proteínas que possuem importantes aplicações industriais e farmacêuticas (WISEMAN, 1991).

O isolamento e a purificação de enzimas são operações que devem ser entendidas como processos de separação de proteínas, visando a livrar determinada e pretendida enzima de acompanhantes, proteínas ou não, possibilitando obter a máxima concentração de atividade enzimática específica, por grama de proteína-enzima pura (REGULY, 2000).

As enzimas são proteínas, portanto os métodos para purificá-las estão baseados nas propriedades destas, sendo que as propriedades mais empregadas para separação de uma enzima em uma mistura são: solubilidade, densidade e distribuição de carga, grau de hidratação, tamanho, forma, grupo reativo específico e estabilidade relativa. As etapas de extração e purificação de enzimas precisam ser monitoradas em

termos de atividade enzimática e teor de proteína. Em geral, a estimativa da atividade enzimática se faz acompanhando o teor de substrato desaparecido, ou a quantidade de produto formado após um tempo de atuação do preparado em condições fixas do meio, tais como pH, temperatura e força iônica (RITO-PALOMARES, 2004)

Das muitas técnicas disponíveis, nem todas são adequadas para trabalhar em grande escala, devido a restrições inerentes ao método ou aos equipamentos disponíveis (WISEMAN, 1991).

2.5 Purificação por Sistema Aquoso Bifásico

Alguns dos principais requisitos para a produção, em escala comercial, de compostos de origem biotecnológica são a pureza e a integridade física e química destes compostos. Estas características tornam as etapas de separação onerosas e as exigências de mercado, no tocante às características do produto, geraram o desenvolvimento de processos com sistemas não convencionais (LIMA, 2002).

O sistema de duas fases aquosas (SAB) foi observado inicialmente em 1896, quando o microbiologista Beijerinck, ao misturar a gelatina, agar-agar e água em certas concentrações, obteve um sistema de duas fases aquosas com a fase rica em gelatina na parte superior e a fase rica em agar-agar na parte inferior. Em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki fizeram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de pares de polímeros em presença de água e solventes orgânicos, conseguindo a separação de fases, em diversos casos. Na década dos anos 40, Craig e Craig foram os pioneiros na aplicação de sistemas de duas fases aquosas composto por água e solventes orgânicos para a purificação de proteínas em processos com distribuição contracorrente. Em 1955, Albertsson, pesquisou a influência de polímeros solúveis e solventes orgânicos na obtenção de duas fases aquosas. Desde então estes sistemas vem sendo amplamente investigados e utilizados na purificação de biomoléculas. Uma das principais características destes sistemas é fornecer um ambiente favorável para a separação de materiais biológicos (CHUMPITAZ, 2002).

O sistema aquoso bifásico (SAB) explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros ou de um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas. As duas fases aquosas assim formadas diferem na sua composição, sendo cada uma delas rica num dos constituintes do sistema, isto é, os dois polímeros ou o polímero e o sal concentram-se em fases distintas. Estas fases apresentam elevados teores em água, podendo em

alguns casos atingir valores entre 85-90%, constituindo ambientes suaves para moléculas e partículas biológicas (TUBIO *et al.*, 2003).

Os SAB resultam da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, embora a variedade de SAB's seja grande, os mais aplicados à extração líquido-líquido são os constituídos Polietilenoglicol (PEG)/dextrana e Polietilenoglicol (PEG)/sal (fosfato, sulfato, citrato). A incompatibilidade ocorre em função da concentração desses compostos, quando comparados com sistemas tradicionais compostos com solventes orgânicos. Os sistemas PEG/sal têm sido usados para extração de enzimas em larga escala por apresentarem baixo custo, elevada seletividade das proteínas, tempo de separação de fases, possibilidade de esterilização, atoxidade e faixa de aplicação. Outra vantagem dos SAB é a reciclagem dos seus componentes (ZUNIGA *et al.*, 2003).

A partição por sistemas aquosos bifásicos apresenta algumas vantagens para a purificação de enzimas em grande escala (ALBERTSSON, 1986):

- Facilidade em prever o "scale-up" através de pequenos ensaios em laboratório;
- A transferência de massa e o equilíbrio das fases são atingidos rapidamente, o que diminui os gastos com energia;
- Pode ser desenvolvido como um processo contínuo;
- Os polímeros estabilizam as enzimas;
- A separação é rápida e seletiva;
- É mais econômica, quando comparada a outros métodos de purificação.

Existem várias substâncias que podem formar duas fases ao serem misturadas. Essas substâncias podem ser polímeros ou compostos de baixo peso molecular, como os sais (MINAMI, 1997).

Albertsson (1986) dividiu os sistemas de duas fases aquosas em quatro grandes grupos, como mostra a Tabela 2:

Tabela 2: Classificação dos Sistemas Aquosos Bifásicos segundo a Composição

| Grupo | Exemplos |
|--|---|
| Dois polímeros não iônicos | PEG/ficoll, PEG/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana |
| Um polieletrólito e um polímero não iônico | Sulfato de dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/metil celulose |
| Dois polieletrólitos | Sulfato de dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carboximetildextrana de sódio/carboximetilcelulose de sódio |
| Um polímero não iônico e um composto de baixo peso molecular | Polipropileno glicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietileno glicol/fosfato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG/citrato de sódio |

Fonte: ALBERTSSON, 1986.

2.5.1 Diagrama de Fases

A composição química das duas fases que se encontra em equilíbrio termodinâmico é geralmente representada em um diagrama de fase retangular (Figura 2). Esta representação gráfica é de grande importância para os estudos de partição, pois é utilizada inicialmente como ferramenta básica para o desenvolvimento de um processo de extração (SILVA, *et al.*, 2006).

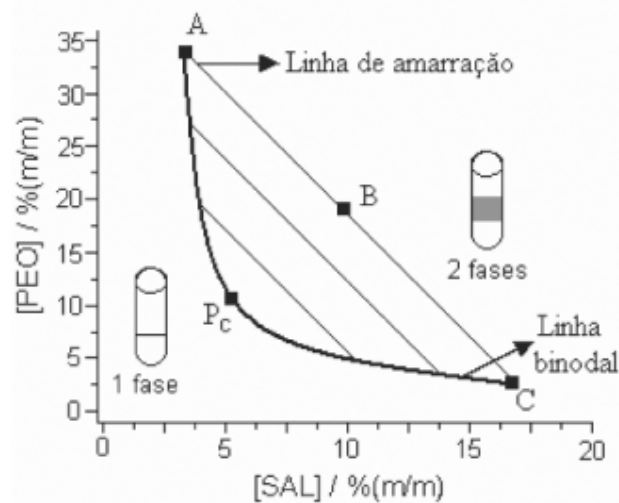


Figura 2: Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.

Fonte: SILVA *et al.*, 2006.

Neste diagrama de fase, a abscissa representa a concentração de sal e a ordenada, a concentração do polímero presente no sistema. Dessa forma, o diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal (AP_cC). A posição da 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. Existem diferentes métodos para obtenção da linha binodal, sendo geralmente utilizados os de titulação turbidimétrica e de análise da composição das fases (CHUMPITAZ, 2002).

No diagrama de fase (Figura 2) são também representadas as linhas de amarração (ex: linha ABC) que, para determinada composição global do sistema (ponto B), fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos A (fase superior) e C (fase inferior) (LIMA, 2002).

É possível encontrar na literatura diversos diagramas de fases, principalmente em sistemas PEG/dextrana e PEG/sal (ALBERTSSON, 1986; SNYNDER *et al.*, 1992; citados por MINAMI, 1997). Porém, como os diagramas são específicos para cada tipo de sistema (PEG/dextrana, PEG/fosfato, PEG/sulfato) e para cada condição (pH, temperatura e peso molecular do polímero) muitas vezes existe a necessidade de se determinar o diagrama de fases para o caso desejado.

2.5.2 Coeficiente de Partição

No processo de separação em sistema aquoso bifásico é necessário que os compostos a serem separados distribuam-se seletivamente nas fases. Para verificar esta distribuição pode-se calcular o coeficiente de partição (K) que é a relação entre a concentração da substância na fase de topo pela concentração da mesma na fase de fundo como mostra a Equação 1.

$$K = \frac{C_{s,topo}}{C_{s,fundo}} \quad (1)$$

Onde $C_{s,topo}$ e $C_{s,fundo}$ são as concentrações de soluto nas fases de topo e de fundo, respectivamente. Duas proteínas podem ser separadas de uma mistura inicial mediante a sua partição em ambas as fases com valores diferentes de K . Quanto maior ou menor que 1 for o coeficiente de partição, mais o componente tenderá a se concentrar na fase superior ou na fase inferior, respectivamente (CHUMPITAZ, 2002).

O K é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar esses valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham valores distintos entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o K está associado (MINAMI, 1997).

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto, existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (ALBERTSSON, 1986).

Dentre os fatores que Influenciam o coeficiente de partição temos o peso molecular do polímero e da proteína, a temperatura, a concentração dos componentes do sistema, o pH do sistema, o tipo de sal, a concentração de proteínas e a razão de volumes (LIMA, 2002).

2.6 Processos de Separação com Membranas

Os sistemas de separação por membranas foram usados durante muito tempo nos processos da indústria química, sendo depois empregados pela indústria de alimentos. As aplicações típicas na indústria de alimentos incluem a purificação da água, a concentração e a clarificação de sucos de frutas, de produtos lácteos, de bebidas alcoólicas e no tratamento de águas. Nos sistemas de separação por membranas, o fluido contendo dois ou mais componentes é colocado em contato com uma membrana que permite a passagem seletiva de alguns componentes. A estrutura das membranas (como, por exemplo, o tamanho do poro e a distribuição do tamanho do poro) e a natureza física e química da mesma podem afetar diretamente a separação (Tabela 3) (SAXENA *et al.*, 2009).

Os processos da tecnologia de membrana mais utilizados na separação de bioprodutos são a osmose reversa (OR), ultrafiltração (UF), microfiltração (MF) e diálise (D). Tais vantagens envolvem a facilidade no escalonamento dos equipamentos, elevada estabilidade, o processo ocorre em temperaturas moderadas, os estresses químico e físico podem ser minimizados, além de permitir que a concentração e a purificação possam ser obtidas em uma única etapa (SAKSENA & ZYDNEY, 1994). Sendo que os principais atrativos para estes processos são o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas em um processamento, a maior eficiência na separação e a maior qualidade do produto final (PETRUS, 1997).

As membranas empregadas pela osmose reversa (OR) são caracterizadas pela massa molar de corte (molecular weight cut off, MWCO) de, aproximadamente, 100 Da, cujo processo envolve pressões 5 a 10 vezes maiores que a ultrafiltração. Na técnica de ultrafiltração (UF) a faixa de pressão varia de 70 a 700 kPa (manométrica) e o tamanho dos poros de 0,001 a 0,02 μm , com MWCO de 1 a 80 KDa. A ultrafiltração está emergindo gradativamente como processo de biosseparação importante para a purificação e polimento de bioprodutos como drogas terapêuticas, enzimas, hormônios, anticorpos, etc. A microfiltração (MF) constitui extensão da UF, porém as membranas apresentam tamanho de poro maior. As macromoléculas passam através da membrana, ficando retidos os colóides e as células. O tamanho do poro varia de 0,2 – 2,0 μm , podendo separar de forma seletiva as partículas com massa molecular acima de 200000 Da (70) (ZUNIGA, 2003).

Para a purificação da enzima β -galactosidase é empregado o método de ultrafiltração no qual proporciona uma elevada retenção de proteínas e outras macromoléculas mediante verificação do peso molecular da enzima. Gekas e López-Leiva (1985) verificaram que o peso molecular da enzima pode variar de 850.000 Da

para a enzima de *Escherichia coli* e até 201.000 e 90.000 Da para *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

Tabela 3: Aplicação das diferentes membranas na separação de vários compostos.

| Compostos | Massa molar (Da) | Tamanho (nm) | Compostos retidos | | | |
|--------------------|---------------------|-----------------|-------------------|----|----|---|
| | | | OR | UF | MF | D |
| Leveduras e Fungos | | $10^3 - 10^4$ | | | X | |
| Bactérias | | $300 - 10^4$ | | - | X | X |
| Colóides | | $100 - 10^3$ | | X | X | X |
| Vírus | | 30 – 300 | | X | X | X |
| Proteínas | $10^4 - 10^6$ | 2 – 10 | | X | | X |
| Polissacarídeos | $10^4 - 10^6$ | 2 – 10 | | X | | X |
| Enzimas | $10^4 - 10^6$ | 2 – 5 | | - | X | X |
| Antibióticos | $300 - 10^3$ | 0,6 – 1,2 | | - | | - |
| Açúcares simples | 200 – 400 | 0,8 – 1,0 | | X | | |
| Ácidos orgânicos | 100 – 500 | 0,4 – 0,8 | | X | | |
| Ácidos inorgânicos | 10 – 100 | 0,2 – 0,4 | | X | | |

Fonte: ZUNIGA, 2003.

OR = Osmose Reversa.

UF = Ultrafiltração.

MF = Microfiltração.

D = Diálise.

Os processos de ultrafiltração são os processos com membranas mais amplamente utilizados quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. Como os poros das membranas de ultrafiltração são menores, é necessária uma força motriz para se obter os fluxos de permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Num equipamento de ultrafiltração industrial (fluxo tangencial), a solução a tratar circula sob pressão em contato com uma membrana finamente porosa. Sob efeito desta pressão, o solvente e os solutos de baixa massa molecular passam através da membrana, constituindo o permeado, e as macromoléculas e partículas coloidais são retidas (OLIVEIRA, 2000).

De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas categorias: densas e porosas. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas anisotrópicas se caracterizam por uma região superior muito fina, mais fechada (com poros ou não) chamada de “pele”, suportada em uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões

são constituídas por um único material, a membrana é do tipo anisotrópica integral. Casos materiais diferentes sejam empregados, a membrana será anisotrópica composta (CARMINATTI, 2001).

Saxena *et al.* (2009) relata que polietersulfona (PES) tem-se tornado um material padrão entre os fabricantes de membranas por ser um material viável e disponível em quantidades suficientes. PES são empregadas em aplicações biológicas como permeação seletiva, recuperação e purificação de proteínas, isolamento de proteínas de soja. Tendo uma vasta aplicação na indústria alimentícia.

Além de suas aplicações em separação e purificação de produtos, os processos de separação por membranas também vem sendo adotados com o objetivo de melhorar a eficiência dos processos bioquímicos, seja pela esterilização contínua do meio de cultura e do ar de alimentação, seja pela remoção contínua dos produtos. A grande vantagem dessa nova concepção é que a reação e a separação ocorrem simultaneamente e, se possível em um mesmo equipamento. Além disso, as células ou os biocatalisadores são mantidos no sistema, o que pode ser conseguido com o uso de uma membrana capaz de retê-los ou pela imobilização destes na estrutura da membrana (CHARCOSSET, 2006).

2.6.1 Coeficiente de Rejeição

A porcentagem de um componente retido pela membrana em um processo de filtração pode ser determinada pelo coeficiente de rejeição (%R) que esta membrana possui em relação ao componente que se pretende isolar. O coeficiente de rejeição também pode ser calculado através da Equação 2 (REIS *et al.*, 2003).

$$\% R = \left(\left(1 - \frac{C_p}{C_a} \right) * 100 \right) \quad (2)$$

Onde: C_p é a concentração do componente no permeado e C_a é a concentração do componente na alimentação.

2.6.2 Fatores Limitantes dos Processos de Separação por Membranas

Apesar da importância do processo de separação por membranas, este ainda apresenta alguns fatores que ocasionam o declínio de fluxo de permeado, dentre eles a polarização de concentração e *fouling*. O *fouling* envolve os fenômenos de bloqueio dos poros e formação de camada gel, que podem reduzir consideravelmente o fluxo de permeado (CHERYAN, 1998; BASSETTI *et al.*, 2003; JAMES *et al.*, 2003). Estes

problemas se agravam na ultrafiltração, devido aos altos fluxos e baixos coeficientes de transferência de massa (MULDER, 2000).

A polarização de concentração leva à formação de uma camada mais concentrada em soluto próxima à superfície da membrana. Quando se processa soluções de proteínas, a concentração na superfície da membrana pode atingir valores que levam à formação de um gel protéico, que por sua vez, pode atuar como uma membrana secundária. A literatura cita a albumina de soro bovino (BSA), como proteína modelo para a caracterização de polarização de concentração de membranas de ultrafiltração. Porém, a literatura também indica que pouco se sabe o que esta proteína pode formar na superfície da membrana. A BSA contém uma percentagem de ácidos graxos, e alguns pesquisadores detectaram a influência de ácidos graxos no comportamento da BSA frente à polarização de concentração (E-COLLEN e LENCKI, 1999; GAO *et al.*, 2001).

A formação da camada gel ocorre quando a concentração de partículas junto à superfície filtrante atinge um determinado valor, não variando mais. Ocorre então uma precipitação de macromoléculas sobre a membrana, formando a camada gel. Esta camada perturba o funcionamento hidrodinâmico do sistema pelo aparecimento de uma resistência suplementar e de novas características de permeação. A colmatagem é classificada pela penetração e pelo acúmulo de partículas presentes em soluções macromoleculares nas paredes internas dos poros das membranas. A intensidade da colmatagem depende da membrana e do soluto, das condições operacionais e do tempo de operação. Este problema pode ser revertido pela limpeza da membrana. Porém, alguns *fouling*s são irreversíveis, necessitando assim, da troca da membrana após determinado tempo de uso (JULIANO, 2000).

2.6.3 Limpeza dos módulos de membranas

Outro fator importante na utilização de processos de separação por membranas é o método de limpeza dos módulos de membranas. Conforme o tipo de fluido e a condição de processo podem ocorrer à deposição de várias camadas orgânicas e inorgânicas na superfície da membrana. Portanto, após o processo de limpeza, se torna necessária uma análise do fluxo de permeado em uma condição padronizada (VEIGA e VIOTTO, 2001).

Periodicamente, são necessárias paradas para a limpeza das unidades e módulos de membranas, que consomem energia, tempo, e geram custos ao processo de separação. Porém, a limpeza não só aumenta a vida útil da membrana como também maximiza as condições de operação. Até recentemente, poucos estudos eram

realizados a fim de definir métodos de limpeza de membranas. No entanto, já se tem indicações de protocolos de limpeza química com soluções ácidas e alcalinas e até a aplicação de enzimas para otimizar os processos de limpeza. As reduções de fluxo geralmente estão associadas a processo de polarização de concentração, que é um fenômeno reversível, porém isto não isenta a membrana de bloqueios irreversíveis como é o caso do *fouling* (ARGUELLO *et al.*, 2002).

A utilização de enzimas proteolíticas também tem sido testada como coadjuvante nos processos de limpeza. Arguello *et al.* (2002) testou a limpeza enzimática de membranas de ultrafiltração utilizando alcalase, que tem uma boa taxa de reação em temperaturas de 50 a 70°C e pH entre 6-10.

Veiga e Viotto (2001) citam outra metodologia para a realização da limpeza dos módulos, baseada na seguinte seqüência: 1) enxágüe com água deionizada; 2) limpeza com solução de hidróxido de sódio 1% a 70°C, por 30 minutos; 3) enxágüe com água deionizada até neutralização; 4) lavagem com solução de ácido nítrico 0,35%, a 50°C, por 30 minutos; 5) enxágüe com água deionizada até neutralização. Após, a limpeza, o fluxo de água pura foi medido a 25°C, para avaliar a eficiência da limpeza e, quando o fluxo de água pura for inferior ao fluxo inicial medido anteriormente, o processo de limpeza foi repetido. Antes de cada processamento, a membrana foi sanitizada, seguindo a seqüência: 1) enxágüe com água deionizada; 2) limpeza com solução de hipoclorito de sódio 200 ppm, à temperatura ambiente, por 30 minutos; 3) enxágüe com água deionizada até pH neutro e desaparecimento do cheiro de cloro. O fluxo de água pura era medido a 25°C. No entanto, deve-se considerar que existem diversos tipos de membranas, formadas por diferentes materiais, com diferentes limitações, que podem então demandar diferentes procedimentos de limpeza.

2.7 Purificação da enzima β -galactosidase

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células animais constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse e devido aos elevados custos associados à produção e purificação. As etapas de extração e purificação de enzimas precisam ser monitoradas em termos de atividade enzimática e teor de proteína com isso, torna-se possível avaliar outros grupamentos químicos que podem ocorrer. Não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente, porém, para qualquer proteína, é

possível escolher uma seqüência de etapas de separação que, dependendo da pureza desejada, podem resultar em aumento do custo e redução da produção (LIMA, 2002).

A literatura apresenta dados bibliográficos da enzima β -galactosidase com pesquisas sobre isolamento de microrganismos produtores, condições de produção, imobilização, síntese enzimática, microencapsulamento, inativação térmica e síntese de galactooligossacarídeos (BECERRA e SISO, 1996; MAHONEY, 1998; ALBAYRAK e YANG, 2002; GIACOMINI *et al.*, 2002; LADERO *et al.*, 2006b; VASILJEVIC e JELEN, 2002; RODRIGUEZ-NOGALES e DELGADILLO, 2005; DI SERIO *et al.*, 2003; BAYRAMOGLU *et al.*, 2007). Pesquisas sobre a purificação da β -galactosidase por sistema aquoso bifásico (SAB) são limitadas (SILVA e FRANCO, 1999; SILVA *et al.*, 1997) e trabalhos utilizando processo de separação por membranas na mesma enzima abordam ensaios de hidrólise e comportamento da enzima.

Silva *et al.* (1997) purificou por sistema aquoso bifásico três diferentes β -galactosidases microbianas sendo investigado o efeito do peso molecular de polietilenoglicol (PEG) sobre a partição das enzimas β -galactosidases de diferentes origens microbianas: *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*. Foi observado que os melhores sistemas para purificação da enzima de *Escherichia coli* foram os formados por PEG 4000, 6000 e 8000/fosfato, fornecendo os mais elevados fatores de purificação da enzima.

Em estudos da purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* por partição por bioafinidade verificaram que foi necessário ativar quimicamente o PEG 4000 com cloreto de tresila e o ligante bioespecífico p-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosídeo (APGP) foi acoplado ao PEG 4000 ativado. A enzima foi purificada em duas etapas se concentrando na fase de topo na primeira fase com 9,7 vezes de fator de purificação e 55% de recuperação e fase de fundo na segunda fase com 19 vezes de fator de purificação e 39% de recuperação, sendo mais efetivo do que o sistema PEG 4000/dextrana sem ligante que obteve 2,8 vezes de fator de purificação e 57% de recuperação da enzima (SILVA e FRANCO, 1999).

Köhler *et al.* (2002) purificaram por sistema aquoso bifásico, utilizando polietilenoglicol de massa molar 4000 Da e fosfato de potássio, uma fusão de quatro tipos de β -galactosidases.

Carminatti (2001) estudou os ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator de membrana utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e verificou que a membrana utilizada permitiu a passagem de compostos com baixa massa molecular glicose, galactose e lactose, impedindo, quase que totalmente, a permeação da enzima β -galactosidase.

Teixeira (2000) estudou o comportamento da enzima β -Galactosidase no processo de ultrafiltração investigou-se o pH (6,5) e a temperatura (40°C) em pressão manométrica (180, 280 e 380 kPa) e da presença do substrato na atividade relativa e no tempo de meia vida da enzima, neste trabalho observou-se a eficiência do processo de ultrafiltração na recuperação das proteínas.

De modo geral, a literatura apresenta poucos dados sobre a purificação por sistema aquoso bifásico (SAB) e utilização do processo de separação por membranas na enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, sendo necessário um estudo detalhado sobre o assunto.

2.8 Considerações Finais

Nos últimos anos têm-se assistido a um grande e rápido desenvolvimento na área da Biotecnologia, com o aparecimento de novos processos a nível industrial que recorrem a microrganismos. Os processos biotecnológicos têm atualmente uma grande aplicação em áreas como saúde humana e animal, agricultura, alimentos e manejo do meio ambiente. A generalidade dos processos biotecnológicos pode dividir-se em duas categorias: reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas), e reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas ou bio-transformações). Os processos biotecnológicos são usados para a produção de uma grande quantidade de produtos com diferentes valores comerciais.

Não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente, porém, para qualquer proteína, é possível, geralmente, escolher-se uma seqüência de etapas de separação que irão resultar em um grau elevado de purificação e um alto rendimento.

A utilização do sistema aquoso bifásico (SAB) e a técnica de separação por membranas são assuntos promissores na área da biotecnologia. Com isso faz-se necessário o estudo mais detalhado a fim de determinar as variáveis e seus importantes efeitos nesse tipo de sistema para obtenção de altos valores para o fator de purificação da enzima, sem prejuízo do rendimento e medidas que proporcionem aplicação industrial a essa metodologia de recuperação enzimática.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

**PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS
DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)**

PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Microbiologia, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900, (53)32338754, *dqmsjk@furg.br

RESUMO

A purificação utilizando a técnica de sistema aquoso bifásico (SAB) da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi estudada neste trabalho. A enzima foi produzida por fermentação submersa em frascos agitados empregando lactose como fonte de carbono. As condições de cultivo foram 30°C e 180 rpm por 96 h. O sistema em estudo era formado por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio, sendo utilizadas as massas molares do polietilenoglicol, 300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000, variando o pH da enzima e do sistema em 6, 7 e 8. Foram testados diferentes pontos na região bifásica de cada sistema variando as concentrações de PEG e tampão fosfato de potássio. A enzima β -galactosidase apresentou comportamento distinto ao longo das variações de cada sistema obtendo o melhor resultado utilizando as concentrações 27% PEG 8000 e 10% sal no pH 8,0 atingindo fator de purificação de 10,1 vezes e recuperação de 175,2% na fase de fundo.

Palavras-chave: enzima, downstream, fator de purificação, recuperação.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são obtidas a partir de extratos biológicos ou por processos fermentativos e sua produção envolve, normalmente, a separação de compostos indesejáveis presentes no meio de fermentação como células, compostos celulares, proteínas contaminantes, sais e água. Os maiores desafios da biotecnologia moderna estão em como obter essas substâncias com os graus de pureza e recuperação desejados, e ainda manter a produtividade do processo elevada (CALDWELL, 2005).

Enzimas microbianas possuem vasta aplicação no setor alimentício e farmacêutico por serem substâncias naturais, apresentarem elevada especificidade catalítica, atuarem em condições brandas de temperatura e pH e serem eficientes a baixas concentrações (SILVA e FRANCO, 1999).

A β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) ou lactase é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose de leite e soro de queijo (GÉKAS e LEIVA, 1985). Atualmente, sua importância vem sendo realçada por sua atividade de galactosiltransferase responsável pela síntese de galactooligossacarídeos que atuam como alimentos funcionais, trazendo diversos efeitos benéficos para seus consumidores (YANG & SILVA, 1995).

A separação de proteínas torna-se muito freqüentemente o fator limitante no desenvolvimento próspero de produtos à base de proteína. O isolamento e custo de purificação podem ser uma fração significativa do custo total de produção para a maioria dos produtos de origem biológica e isto constitui um incentivo ao desenvolvimento de processos de isolamento e purificação a custos menores.

O sistema aquoso bifásico (SAB) tem se mostrado um método de extração eficiente e seletivo sendo possível sua aplicação à amostras reais. Sua utilização como um método alternativo, em substituição àqueles que empregam solventes orgânicos, é completamente viável e vantajoso devido a sua não-toxicidade. Além disso, seus constituintes são comercialmente acessíveis e de baixo custo (SILVA *et al.*, 2006). O estudo deste tipo de purificação é necessário devido a não existência de trabalhos na literatura, que abordem a purificação por sistema aquoso bifásico na enzima β -galactosidase em diferentes faixas de pH.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a purificação da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através do sistema aquoso bifásico formado por polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio, avaliando a influência da massa molar de PEG 300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 nos sistemas de pH 6,0; 7,0 e 8,0 e das concentrações de polímero e do sal no fator de purificação e na recuperação da enzima em cada um destes sistemas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção da enzima β -galactosidase foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP e selecionada por Manera *et al.* (2008). 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). Após o crescimento do microrganismo em ágar YM inclinado foi realizada a inoculação da cultura em caldo extrato de malte e levedura e incubada a 30°C, 180 rpm por 24 h. Após este período, uma alíquota de 5 mL desta suspensão foi transferida assepticamente para tubos de ensaio contendo o mesmo volume de uma solução de glicerol 20%, previamente esterilizada. Esses tubos foram armazenados sob congelamento, a -18°C (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.2 Preparo do Inóculo

O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo apresentou a composição (g L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄ · 7H₂O (0,4) e lactose (10,0). O meio foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0 ajustado com soda (NaOH 1N) ou ácido clorídrico (HCl 1N). O inóculo que foi preparado em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min sem a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração (Sistema Sartorius, com 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 à temperatura ambiente e a cultura em glicerol, previamente descongelada, foi adicionada em uma concentração de 10% (v/v) e incubado por 24 h a 30°C e 180 rpm (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.3 Fermentação Submersa

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de fermentação em uma relação de 10% (v/v). As fermentações foram realizadas 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) com pH ajustado para 6,0. A lactose e o meio de fermentação foram

esterilizados como descrito no item 2.2. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória Tecnal TE-420 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 180 rpm, 30 °C por 96 h (MANERA *et al.*, 2008).

2.4 Extração da Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase foi extraída através do rompimento das células da levedura. Para isso foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm, para cada mL de suspensão de células. A suspensão foi agitada em um vórtex Phoenix (Araraquara, São Paulo, Brasil) por 40 min, e em seguida centrifugada em uma centrífuga refrigerada Cientec CT-5000R (Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 6000 rpm (5031 x g) por 10 min a 4°C. O sobrenadante, livre de células, foi utilizado para medida da atividade enzimática (MEDEIROS *et al.*, 2008).

Um mL de suspensão de células foi obtido por ressuspensão de uma massa de células equivalente a 40 mg de célula seca em tampão fosfato de potássio 50 mM (KH_2PO_4) e cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,1 mM pH 6,6 para se obter um volume final de 1 mL (MEDEIROS, 2008).

2.5 Purificação da Enzima β -galactosidase por Sistema Aquoso Bifásico

2.5.1 Massa Molar do Polietilenoglicol (PEG)

Para o processo de purificação da β -galactosidase no sistema PEG/ Fosfato potássio foram selecionadas as massa molares de polietilenoglicol, 300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000, com base nos trabalhos de Minami (1997) e Brandoo *et al.* (1999).

2.5.2 Determinação da Curva Binodal

As curvas binodais para o SAB composto de fosfato de potássio e PEG de massas molares de 8000 e 10000 para os valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0 foram determinadas segundo metodologia descrita por Minami (1997), dispostas em anexo, enquanto que para os SAB fosfato de potássio e PEG de massa molares 300, 1500, 4000 e 6000 nos diferentes valores de pH (6,0; 7,0 e 8,0) foram assumidas as curvas obtidas pelo mesmo autor.

2.5.3 Estudos de Partição

O sistema aquoso bifásico de PEG/sal foi formado em tubos graduados de centrifuga através de pesagem de quantidades apropriadas de PEG, tampão fosfato de potássio (30% e 40% m/m de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) e água deionizada de acordo com os limites de concentração de PEG e fosfato de potássio definidos com base no diagrama de fases determinado para cada massa molar do polímero. O tampão fosfato foi adicionado de forma a garantir não só a concentração de sal, mas também o pH desejado (6,0; 7,0 e 8,0) no sistema. O conteúdo destes tubos foi homogeneizado mecanicamente em vórtex para completa dissolução do polímero, o sistema foi levado a banho de gelo e adicionou-se 2 g do extrato enzimático de β -galactosidase, com pH ajustado ao do sistema, para completar o peso de 10 g em todos os sistemas e imediatamente levou-se a agitação em vórtex Phoenix (Araraquara, São Paulo, Brasil) e centrifugação sob refrigeração durante 10 min a 4700 x g. A seguir o sistema foi mantido em repouso para equilíbrio das fases (MEDEIROS *et al.*, 2005).

As fases de topo e de fundo foram separadas tomando-se o cuidado de não perturbar o equilíbrio, e os volumes foram medidos. Foi retirada uma alíquota de cada fase para a determinação da atividade enzimática e quantidade de proteína total. O branco consistia na adição de água no lugar da enzima (Figura 1).

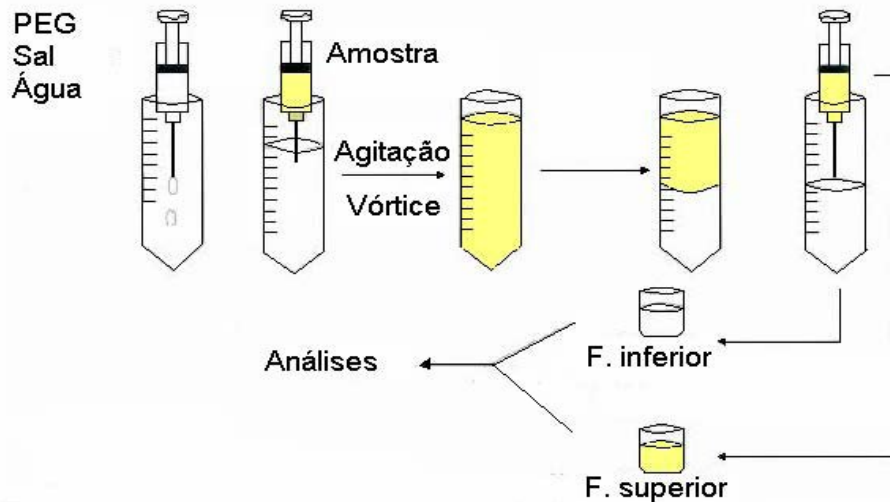


Figura 1: Esquema da rotina de ensaios da extração de duas fases aquosas.

Fonte: PORTO, 2004.

2.5.4 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 e valores de pH foram selecionados pontos na região bifásica das curvas binodais em diferentes concentrações do polímero e de fosfato de potássio (Tabelas 1 a 17). Os ensaios foram realizados em triplicata, com realização de tréplica de análises, sendo aplicada análise de variância seguida de Teste de Tukey para determinar a melhor condição em cada um dos sistemas. Como respostas foram obtidos o fator de purificação, recuperação da β -galactosidase, coeficiente de partição (K_{part}), razão de volumes do sistema e atividade da enzima, conforme os itens descritos a seguir.

2.5.5 Fator de Purificação (FP)

O fator de purificação FP obtido para a enzima foi calculado através da Equação 1 (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$FP = \frac{A_{esp. saída}}{A_{esp. entrada}} \quad (1)$$

Onde: $A_{esp. saída}$ é a atividade específica de β -galactosidase na saída (U/ mg); $A_{esp. entrada}$ é a atividade específica de β -galactosidase na entrada (U/mg).

2.5.6 Recuperação de β -galactosidase (RP)

A recuperação da β -galactosidase RP (%) foi calculada pela Equação 2 (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$RP = \frac{[A_{fase} \times V_{fase}]}{[A_{extrato inicial} \times V_{inicial}]} * 100 \quad (2)$$

Onde: A_{fase} é a atividade enzimática de β -galactosidase na fase considerada (U/mL); $A_{extrato inicial}$ é a atividade enzimática β -galactosidase no extrato inicial (U/mL); V_{fase} é o volume da fase considerada em mL; $V_{inicial}$ é o volume inicial do extrato adicionado em mL.

2.5.7 Coeficiente de Partição (K_{part})

O coeficiente de partição K_{part} para a β -galactosidase foi calculado pela Equação 3 (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$K = \frac{A_{F\ topo}}{A_{F\ fundo}} \quad (3)$$

Onde: $A_{F\ topo}$ é a atividade enzimática de β -galactosidase na fase de topo, em U/mL, após o processo de purificação; $A_{F\ fundo}$ é a atividade enzimática de β -galactosidase na fase de fundo, em U/mL, após o processo de purificação.

2.5.8 Razão de Volumes do Sistema

A razão de volume V_r do sistema foi determinada pela Equação 4 (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

$$V_r = \frac{V_{topo}}{V_{fundo}} \quad (4)$$

Onde: V_{topo} é o volume da fase de topo, em mL, após o processo de purificação; V_{fundo} é o volume da fase de fundo, em mL, após o processo de purificação.

2.6 Métodos Analíticos

2.6.1 Determinação da Biomassa

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, e convertida para peso seco conforme a curva padrão (RECH *et al.*, 1999).

2.6.2 Determinação da Atividade Enzimática da β -galactosidase

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Aldrich) como substrato, segundo 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, sob as condições do ensaio de 37°C e pH 6,6.

2.6.3 Determinação da Proteína

As proteínas foram determinadas segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

2.6.4 Determinação do pH

O determinação do pH foi feita segundo normas da AOAC (1995).

3 RESULTADOS

3.1 Purificação da Enzima β -galactosidase por Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Os estudos da purificação da β -galactosidase foram realizados considerando-se os valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0 valores estes determinados a partir do pH de estabilidade da enzima segundo estudo realizado por Medeiros (2008). Os resultados de recuperação e fator de purificação da enzima β -galactosidase foram divididos de acordo com os valores de pH.

O coeficiente de partição da β -galactosidase nos sistemas de purificação de pH 6,0; 7,0 e 8,0 apresentou $K > 1$ quando o sistema era formado por PEG 300/fosfato de potássio e em geral $K < 1$ nos demais sistemas, com exceção do sistema formado por PEG 1500/fosfato de potássio o qual apresentou K elevado para os sistemas com pH de 6,0 e 8,0 em contrapartida a enzima se manteve na fase de fundo quando o sistema analisado era PEG 1500/fosfato de potássio no pH 7,0. A atividade enzimática da enzima bruta utilizada nos ensaios de SAB foi de $50,9 \text{ U.mL}^{-1}$.

3.1.1 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 6,0 no SAB

Para o PEG de massa molar 300 no pH 6,0 não foi possível realizar os ensaios de purificação, pois todos os pontos traçados não formaram duas fases, assim como Minami (1997) que também teve dificuldade em trabalhar com a curva binodal neste pH para sistemas de PEG 300, 400 e 600. Os resultados obtidos para o PEG 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 no pH 6,0 estão demonstrados nas Tabelas 1 a 5.

Tabela 1: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 6,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|------|--------------------------|---------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 15 | 12 | Topo | 1,3 ^b ±0,12 | 73,3 ^a ±5,19 | 3,6 | 2,20 |
| 2 | 24 | 12 | Topo | 1,3 ^b ±0,12 | 63,7 ^{a,b} ±2,71 | 3,1 | 10,14 |
| 3 | 8 | 18 | Topo | 2,1 ^a ±0,18 | 60,7 ^{a,b} ±9,79 | 0,4 | 6,35 |
| 4 | 16 | 18 | Topo | 1,4 ^b ±0,11 | 60,8 ^{a,b} ±2,57 | 1,0 | 26,47 |
| 5 | 10 | 20 | Topo | 1,6 ^{a,b} ±0,35 | 51,0 ^b ± 11,60 | 0,5 | 4,45 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 2: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 6,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|--------------------------|----------------------------|-----|-----------------------|
| 1 | 23 | 7 | Fundo | 1,3 ^c ±0,06 | 73,6 ^d ±16,22 | 7,2 | 0,03 |
| 2 | 16 | 9,5 | Fundo | 1,0 ^c ±0,05 | 111,7 ^c ±3,10 | 3,0 | 4,47x10 ⁻³ |
| 3 | 12 | 12 | Fundo | 5,1 ^a ±0,39 | 136,9 ^{b,c} ±6,91 | 2,0 | 0,01 |
| 4 | 19 | 12 | Fundo | 4,2 ^b ±0,36 | 107,2 ^{c,d} ±22,2 | 2,9 | 0,07 |
| 5 | 5 | 15 | Fundo | 4,4 ^{a,b} ±0,56 | 220,2 ^a ±8,84 | 0,2 | 0,70x10 ⁻³ |
| 6 | 12 | 15 | Fundo | 3,9 ^b ±0,21 | 165,8 ^b ±4,46 | 0,8 | 0,01 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 3: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 6,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|--------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 10 | 11 | Fundo | 0,9 ^a ±0,12 | 79,5 ^a ±13,36 | 1,7 | 0,01 |
| 2 | 18 | 11 | Fundo | 1,3 ^a ±0,05 | 89,1 ^a ±4,87 | 1,5 | 0,05 |
| 3 | 14 | 12 | Fundo | 1,1 ^a ±0,06 | 92,2 ^a ±3,11 | 1,1 | 0,01 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 4: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 6,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|-------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 22 | 8 | Fundo | 0,5 ^a ±0,15 | 35,0 ^b ±0,63 | 3,7 | 0,12 |
| 2 | 16 | 12 | Fundo | 0,6 ^a ±0,01 | 45,8 ^a ±2,69 | 1,1 | 0,12 |
| 3 | 14 | 16 | Fundo | 0,7 ^a ±0,02 | 36,0 ^b ±0,84 | 0,7 | 0,16 |
| 4 | 8 | 20 | Fundo | 0,7 ^a ±0,05 | 38,3 ^b ±1,28 | 0,3 | 0,33 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 5: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 6,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|--------------------------|-----|-----------------------|
| 1 | 18 | 10 | Fundo | 1,0 ^a ±0,04 | 96,2 ^a ±2,58 | 1,7 | 2,85x10 ⁻³ |
| 2 | 13 | 15 | Fundo | 0,9 ^a ±0,02 | 87,9 ^a ±4,10 | 0,7 | 0,06 |
| 3 | 8 | 20 | Fundo | 0,9 ^a ±0,13 | 85,4 ^a ±10,14 | 0,3 | 0,16 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

De acordo com os valores obtidos na purificação por sistema aquoso bifásico de pH 6,0 os ensaios que apresentaram as melhores condições foram utilizando, 8% PEG 1500 e 18% sal na fase de topo, e 5% PEG 4000 e 15% sal na fase de fundo obtendo 2,1 e 4,4 vezes de fator de purificação (FP) e 60,7 e 220,2% de recuperação (RP), respectivamente.

Analisando estes resultados, foi verificado que no SAB utilizando PEG 1500 o fator de purificação de 2,1 vezes foi estatisticamente igual ao ensaio 5 e superior aos demais ensaios, enquanto que a recuperação de 60,7% não foi estatisticamente diferente da recuperação do ensaio 1, 2 e 4 (73,3%; 63,7 e 60,8). No SAB de PEG 4000 a recuperação da enzima de 220,2% foi estatisticamente superior comparado aos outros ensaios e o FP de 4,4 vezes não foi estatisticamente inferior ao do ensaio 3 (5,1), sendo assim as condições do ensaio 5 consideradas mais adequadas para a purificação da enzima .

Analisando a região que proporcionou os melhores resultados em termos de fator de purificação e rendimento para o PEG 1500 e 4000 no pH 6,0, é possível verificar que isto ocorreu em maiores concentrações de sal e menores de PEG.

3.1.2 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 7,0 no SAB

Os resultados obtidos para o PEG 300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 no pH 7,0 estão demonstrados nas Tabelas 6 a 11.

Tabela 6: Recuperação e Fator de Purificação PEG 300 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|------|------------------------|--------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 28 | 11 | Topo | 0,8 ^b ±0,10 | 82,5 ^b ±6,55 | 8,7 | 1,03 |
| 2 | 35 | 11 | Topo | 0,9 ^b ±0,14 | 72,1 ^b ±10,09 | 5,0 | 1,00 |
| 3 | 21 | 17 | Topo | 0,7 ^b ±0,10 | 70,0 ^b ±5,00 | 2,3 | 1,17 |
| 4 | 28,5 | 17 | Topo | 0,5 ^b ±0,01 | 67,4 ^b ±9,46 | 2,5 | 1,11 |
| 5 | 15 | 22,5 | Topo | 1,5 ^a ±0,16 | 121,3 ^a ±5,78 | 0,9 | 3,08 |
| 6 | 23 | 22,5 | Topo | 1,4 ^a ±0,34 | 90,8 ^b ±11,51 | 1,4 | 1,19 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 7: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|--------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 20 | 9 | Fundo | 1,7 ^a ±0,13 | 84,3 ^a ±11,75 | 4,7 | 0,02 |
| 2 | 11 | 12,8 | Fundo | 1,3 ^a ±0,32 | 93,3 ^a ±1,60 | 1,0 | 0,06 |
| 3 | 16 | 16,5 | Fundo | 0,9 ^a ±0,21 | 39,6 ^b ±5,92 | 1,1 | 0,18 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 8: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|----------------------------|------|-------------------|
| 1 | 27 | 5 | Topo | 2,3 ^a ±0,14 | 61,6 ^{b,c} ±12,93 | 11,2 | 0,21 |
| 2 | 36 | 5 | Topo | 1,6 ^b ±0,41 | 47,2 ^c ±11,36 | 7,3 | ∞ |
| 3 | 16 | 10 | Fundo | 1,1 ^b ±0,20 | 72,4 ^{a,c} ±11,11 | 1,9 | 0,02 |
| 4 | 4 | 15 | Fundo | 1,0 ^b ±0,22 | 89,9 ^a ±9,23 | 0,1 | 0,14 |
| 5 | 12 | 15 | Fundo | 1,1 ^b ±0,04 | 78,3 ^{a,b} ±3,75 | 0,8 | 0,07 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 9: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|--------------------------|---------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 10,5 | 10 | Fundo | 1,1 ^a ±0,21 | 103,9 ^a ±17,21 | 1,1 | 0,01 |
| 2 | 15 | 10 | Fundo | 0,7 ^b ±0,10 | 59,2 ^{b,c} ±2,62 | 1,6 | 0,82 |
| 3 | 7,7 | 17,8 | Fundo | 0,9 ^{a,b} ±0,08 | 82,8 ^{a,b} ±2,55 | 0,3 | 0,34 |
| 4 | 12,5 | 17,8 | Fundo | 0,2 ^c ±0,02 | 48,3 ^c ±7,90 | 0,5 | 0,30 |
| 5 | 6,3 | 23 | Fundo | 0,1 ^c ±0,03 | 36,5 ^c ±8,52 | 0,2 | 0,62 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 10: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|-------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 18,8 | 7,5 | Fundo | 1,8 ^a ±0,02 | 89,9 ^a ±4,03 | 3,2 | 0,03 |
| 2 | 13 | 16 | Fundo | 1,6 ^a ±0,07 | 77,7 ^a ±1,37 | 0,5 | 0,22 |
| 3 | 20 | 16 | Topo | 1,5 ^a ±0,04 | 39,2 ^b ±0,99 | 1,1 | 3,69 |
| 4 | 14 | 25 | Topo | 0,4 ^b ±0,51 | 6,1 ^c ±2,72 | 0,4 | 2,48 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 11: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 7,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|--------------------------|-------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 17 | 10 | Fundo | 2,0 ^a ±0,12 | 91,1 ^a ±6,71 | 1,3 | 0,03 |
| 2 | 25,5 | 10 | Topo | 2,4 ^a ±0,44 | 36,2 ^c ±0,56 | 2,0 | 0,48 |
| 3 | 11,5 | 17 | Fundo | 1,3 ^{b,c} ±0,05 | 80,0 ^b ±3,10 | 0,5 | 0,14 |
| 4 | 19 | 17 | Topo | 1,4 ^b ±0,09 | 28,7 ^c ±1,21 | 0,9 | 4,32 |
| 5 | 8 | 24 | Fundo | 0,4 ^d ±0,09 | 11,2 ^d ±0,97 | 0,2 | 2,74 |
| 6 | 15 | 24 | Topo | 0,9 ^{c,d} ±0,04 | 17,9 ^d ±0,02 | 0,5 | 5,29 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

De acordo com os dados apresentados na purificação por sistema aquoso bifásico de pH 7,0 os ensaios que resultaram nas melhores condições foram utilizando, 27% PEG 4000 e 5% sal na fase de topo, e 17% PEG 10000 e 10% sal na fase de fundo obtendo 2,3 e 2,0 vezes de fator de purificação e 61,6 e 91,1% de recuperação, respectivamente.

Analisando estes resultados observa-se que no SAB utilizando PEG 4000 o fator de purificação de 2,3 vezes foi estatisticamente superior aos demais ensaios, enquanto que a recuperação de 61,6% não foi estatisticamente superior. Para o SAB de PEG 10000 a recuperação da enzima de 91,1% foi superior, comparado aos demais ensaios e o FP de 2,0 vezes foi estatisticamente igual ao ensaio 2, porém neste a recuperação foi baixa.

Avaliando o ensaio 1 do SAB PEG 4000 pH 7,0 nota-se que o K_{part} foi de 0,21 (K<1), mesmo a enzima estando em maior quantidade na fase de topo. Este fato se deve provavelmente a fase de fundo ser bem menor (V=0,7mL) que a fase de topo fazendo com que a enzima se deslocasse também para a fase de topo, prejudicando a partição, apesar do maior fator de purificação.

3.1.3 Avaliação da influência de diferentes Massas Molares do PEG para o pH 8,0 no SAB

Os resultados obtidos para o PEG 300, 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 no pH 8,0 estão demonstrados nas Tabelas 12 a 17.

Tabela 12: Recuperação e Fator de Purificação PEG 300 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|------|------------------------|--------------------------|------|-------------------|
| 1 | 35 | 8 | Topo | 0,4 ^a ±0,02 | 59,4 ^a ±4,69 | 11,3 | 25,0 |
| 2 | 44 | 8 | Topo | 0,4 ^a ±0,08 | 46,3 ^a ±10,20 | 10,5 | 18,8 |
| 3 | 22,5 | 14 | Topo | 0,3 ^a ±0,06 | 52,1 ^a ±4,24 | 3,9 | 25,9 |
| 4 | 32 | 14 | Topo | 0,4 ^a ±0,06 | 57,5 ^a ±4,14 | 3,7 | 29,3 |
| 5 | 21 | 21 | Topo | 0,4 ^a ±0,08 | 57,7 ^a ±5,92 | 1,5 | 35,4 |
| 6 | 10 | 27,5 | Topo | 0,5 ^a ±0,07 | 53,4 ^a ±6,47 | 0,5 | 55,5 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 13: Recuperação e Fator de Purificação PEG 1500 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|------|------------------------|--------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 20 | 8,3 | Topo | 1,3 ^c ±0,27 | 61,2 ^a ±9,03 | 4,5 | 0,48 |
| 2 | 29 | 8,3 | Topo | 1,3 ^c ±0,10 | 60,0 ^a ±4,96 | 4,2 | 146,43 |
| 3 | 11 | 12 | Topo | 4,2 ^a ±0,34 | 71,2 ^a ±6,42 | 0,8 | 3,21 |
| 4 | 20 | 12 | Topo | 1,6 ^c ±0,13 | 60,6 ^a ±2,33 | 1,5 | 35,51 |
| 5 | 6 | 15 | Topo | 2,8 ^b ±0,32 | 63,4 ^a ±11,38 | 0,2 | 10,63 |
| 6 | 15 | 15 | Topo | 1,7 ^c ±0,11 | 65,0 ^a ±3,68 | 0,8 | 192,22 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 14: Recuperação e Fator de Purificação PEG 4000 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|--------------------------|---------------------------|------|-------------------|
| 1 | 30 | 4 | Fundo | 1,5 ^a ±0,10 | 63,7 ^b ±4,53 | 10,8 | 0,01 |
| 2 | 18 | 7 | Fundo | 1,2 ^b ±0,09 | 67,9 ^b ±1,90 | 3,7 | 0,03 |
| 3 | 10 | 10 | Fundo | 1,5 ^a ±0,15 | 117,6 ^a ±13,55 | 0,9 | 0,01 |
| 4 | 15 | 10 | Fundo | 1,6 ^a ±0,15 | 112,0 ^a ±15,54 | 1,4 | 0,01 |
| 5 | 4 | 13 | Fundo | 1,5 ^{a,b} ±0,20 | 139,5 ^a ±16,97 | 0,2 | 0,03 |
| 6 | 10 | 13 | Fundo | 1,4 ^{a,b} ±0,02 | 110,5 ^a ±3,30 | 0,7 | 0,02 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 15: Recuperação e Fator de Purificação PEG 6000 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|---------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 14 | 8 | Fundo | 1,5 ^a ±0,01 | 106,1 ^a ±4,87 | 2,0 | 0,01 |
| 2 | 20 | 8 | Fundo | 1,5 ^a ±0,05 | 81,9 ^b ±1,56 | 2,5 | 0,02 |
| 3 | 9 | 10 | Fundo | 1,4 ^a ±0,02 | 103,5 ^a ±2,24 | 0,6 | 0,01 |
| 4 | 13 | 10 | Fundo | 1,6 ^a ±0,09 | 92,9 ^{a,b} ±6,61 | 1,2 | 0,02 |
| 5 | 4 | 12 | Fundo | 1,1 ^b ±0,07 | 95,2 ^{a,b} ±4,03 | 0,2 | 0,02 |
| 6 | 10 | 12 | Fundo | 1,5 ^a ±0,13 | 103,0 ^a ±8,56 | 0,6 | 0,02 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 16: Recuperação e Fator de Purificação PEG 8000 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|-------------------------|---------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 25 | 5 | Fundo | 2,2 ^c ±0,09 | 138,5 ^b ±26,82 | 8,1 | 0,04 |
| 2 | 35 | 5 | Fundo | 5,7 ^b ±0,16 | 149,0 ^b ±7,07 | 6,2 | 0,07 |
| 3 | 17 | 10 | Fundo | 6,1 ^b ±0,64 | 372,7 ^a ±36,75 | 1,2 | 0,09 |
| 4 | 27 | 10 | Fundo | 10,1 ^a ±2,11 | 175,2 ^b ±39,39 | 1,8 | 0,73 |
| 5 | 13 | 15 | Fundo | 6,9 ^b ±0,21 | 377,6 ^a ±13,95 | 0,5 | 0,07 |
| 6 | 20 | 15 | Topo | 5,0 ^b ±0,21 | 198,5 ^b ±13,52 | 0,9 | 4,53 |
| 7 | 10 | 20 | Fundo | 6,1 ^b ±0,72 | 322,5 ^a ±47,22 | 0,3 | 0,18 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Tabela 17: Recuperação e Fator de Purificação PEG 10000 pH 8,0.

| Ensaio | %PEG | %Sal | Fase | FP | RP (%) | Vr | K _{part} |
|--------|------|------|-------|------------------------|---------------------------|-----|-------------------|
| 1 | 21 | 7,5 | Fundo | 1,4 ^a ±0,01 | 79,6 ^{a,b} ±2,61 | 2,3 | 0,01 |
| 2 | 30 | 7,5 | Topo | 1,8 ^a ±0,32 | 93,6 ^a ±17,12 | 3,6 | 155,97 |
| 3 | 12 | 15 | Fundo | 2,2 ^a ±1,65 | 66,5 ^{b,c} ±4,25 | 0,5 | 0,14 |
| 4 | 7,5 | 22,5 | Fundo | 0,8 ^a ±0,15 | 48,0 ^c ±9,53 | 0,2 | 0,23 |

Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas há diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as médias dos ensaios para a Recuperação e Fator de Purificação

Os resultados apresentados na purificação por sistema aquoso bifásico de pH 8,0 que conduziram as melhores condições foram utilizando, 11% PEG 1500 e 12% sal na fase de topo, e 27% PEG 8000 e 10% sal na fase de fundo obtendo 4,2 e 10,1 vezes de fator de purificação (FP) e 71,2 e 175,2% de recuperação (RP), respectivamente.

Observa-se que no SAB utilizando PEG 1500 o fator de purificação de 4,2 vezes é estatisticamente superior aos demais ensaios, enquanto que a recuperação de 71,2% foi estatisticamente igual a todos outros ensaios. Para o SAB de PEG 8000 o valor de FP 10,1 vezes foi bem superior quando comparado aos outros ensaios, mas analisando a recuperação de 175,2% esta não foi estatisticamente superior, nos

ensaios 3 e 5, com fatores de purificação na ordem de 6 a 7 vezes, obtêm-se recuperações próximas a 400%.

Notou-se que nos sistemas de purificação com pH 8,0 o ensaio com PEG 1500 (ensaio 1) apresentou $K < 1$ mesmo que a enzima tenha se concentrado na fase de topo, fato este observado anteriormente no PEG 4000 pH 7,0 devido a enzima não ter uma boa partição.

4. DISCUSSÃO

A influência da massa molar do polímero utilizado no sistema aquoso bifásico é um dos parâmetros a ser avaliado quando se trabalha com extração líquido-líquido, com isso verificamos que a partição da enzima β -galactosidase foi diferente nas diferentes massas molares de PEG. Sendo que esta enzima se concentrou na maioria das vezes na fase rica em sal (fase de fundo) quando o SAB era formado com PEG de maiores massas molares e na fase rica em PEG (fase de topo) quando o SAB era formado com PEG de menor massa molar, PEG 300 e PEG 1500, neste último para os valores de pH de 6,0 e 8,0.

Observa-se que a massa molar do PEG influencia a partição, pois com menores valores de massa molar de PEG a partição aumenta. Este comportamento é justificado pela teoria do volume excluído, pois quanto maior a massa do polímero menor será o espaço ou volume livre na solução e é neste espaço para onde as moléculas particionam. Então em grandes massas molares, o volume excluído aumenta e conseqüentemente diminui a partição das biomoléculas para a fase rica em polímero (PORTO, 2004).

Segundo Rojas *et al.* (2004) o comportamento de partição da proteína depende da sua hidrofobicidade, sendo a fase de topo, rica em PEG, mais hidrofóbica que a fase mais rica em sal.

Na maioria dos ensaios a enzima β -galactosidase teve preferência de migrar para a fase do sistema rica em sal (fase de fundo) quando este apresentava menor razão de volume (V_r), porém quando a esta razão de volume era aumentada, dentro da mesma massa molar de PEG, a enzima algumas vezes particionava para a fase de topo, porém com valores de $K < 1$, indicando presença de β -galactosidase nas duas fases.

Marcos *et al.* (1999), estudando a purificação de penicilina acilase de *Escherichia coli* em sistema aquoso bifásico formado por polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio, verificou o mesmo comportamento, ou seja, que o coeficiente de partição desta enzima (K_{part}) diminui com o aumento da massa molar do PEG, o que

significa dizer que a enzima teve uma tendência a se localizar na fase rica em sal, conforme o peso molar do PEG era aumentado. Os mesmos autores atribuem esse comportamento ao aumento da hidrofobicidade da fase superior, rica no polímero, pois conforme o comprimento da cadeia de PEG aumenta, menor será a quantidade de grupos hidroxil para a mesma concentração do polímero, aumentando sua hidrofobicidade, o que faria com que a enzima se deslocasse para a fase oposta.

Pessoa e Kilikian (2005) comentam que a solubilidade de proteínas em SAB também é dependente da hidrofobicidade superficial. Moléculas com elevada proporção de aminoácidos hidrofóbicos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano e prolina) apresentarão afinidade acentuada em relação à fase de topo, em comparação a proteínas mais solúveis

Quando a enzima se localiza na fase de fundo e ocorre uma redução da razão de volume, sem que a mesma migre para a fase de topo, a purificação tende a aumentar, pois conforme já colocado por Antelo (2007) a diminuição do volume da proteína-alvo possibilita que uma maior parte das proteínas contaminantes migre para a outra fase, contribuindo para o aumento do fator de purificação devido à alta afinidade da enzima por uma das fases e permanência na mesma.

Observa-se que a recuperação da enzima β -galactosidase no sistema de PEG 4000 ultrapassou valores de 100%. Pan *et al.*, (2001) estudaram a extração efetiva e a purificação por sistema aquoso bifásico da β -xylosidase de *Trichoderma koningii* no pH 4,4 e verificaram que no sistema utilizando 25% PEG 1500 e 25% Fosfato de sódio a recuperação variou de 410% até 627% . Isto ocorre devido a alguns fatores como a existência de metabólitos ou metabólitos secundários que podem ser removidos durante a extração e que estariam inibindo a atividade da enzima. E altas concentrações de sal e proteína podem ajudar a manter a conformação de uma proteína na forma ativa.

Nos ensaios do SAB de pH 8,0 a enzima β -galactosidase obteve afinidade preferencialmente pela fase de fundo rica em sal. Como já comentado algumas recuperações da enzima β -galactosidase foram superiores a 100%. Porto *et al.* (2006), estudando a purificação de uma protease de *Clostridium perfringens* através de sistema aquoso bifásico composto por PEG/citrato de sódio, obtiveram 131,0% de recuperação da enzima na fase PEG. Mayerhoff *et al.* (2004) obtiveram resultados semelhantes, utilizando sistemas de duas fases aquosas para extrair xilose redutase, o qual apresentaram um aumento de pureza de 1,89 e uma recuperação de 103,5%. Segundo Cortez *et al.* (2004) recuperações acima de 100% podem ser obtidas em sistema de extração líquido-líquido, pois com o processo de purificação, a ação dos

inibidores diminui, provavelmente pela sua localização na fase oposta à da enzima, aumentando assim sua atividade enzimática.

Quanto a purificação atingida, esta foi maior na massa molar de 8000 para o pH 8,0. Silva *et al.* (1997) purificando três diferentes β -galactosidases microbianas por partição em sistemas de duas fases aquosas, investigaram o efeito da massa molar de polietilenoglicol (PEG) sobre a partição da enzima β -galactosidase de: *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*. Foi observado que os melhores sistemas para purificação da enzima de *E. coli* foram os formados por PEG 6000 e 8000/fosfato, fornecendo os mais elevados fatores de purificação da enzima, 8,0 e 9,7. Como pode-se verificar nos resultados anteriores do presente trabalho, o melhor sistema de purificação por SAB para a enzima β -galactosidase também foi utilizando PEG de maiores massas molares. Vale ressaltar que os referidos autores não conseguiram purificar a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, em nenhuma massa molar utilizada, sendo que trabalharam sempre com pH 7,0. No presente trabalho, neste pH, obteve-se uma purificação, porém não foi superior a duas vezes.

Apesar da β -galactosidase não ter apresentado uma partição diretamente relacionada à mudança de pH, o seu aumento levou a maior retirada de contaminantes, provavelmente pela maior carga negativa de outras proteínas, sendo particionadas para a fase de topo positiva, propiciando maior purificação do composto alvo. A carga líquida dos resíduos de aminoácidos da superfície determina as propriedades superficiais da proteína e pode ser alterada pela troca de pH. As interações entre a proteína e as fases contribui para a partição. A fase de topo de um sistema composto por PEG e sais de fosfato, tem uma carga positiva e a fase de fundo carga negativa (CAVALCANTI *et al.*, 2002; GAUTAM e SIMON, 2006).

5. CONCLUSÃO

Os estudos da partição da β -galactosidase por sistema aquoso bifásico (SAB) nos valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0 demonstraram que a utilização deste sistema de purificação foi eficiente para a enzima em estudo.

A purificação da enzima β -galactosidase foi atingida utilizando o SAB constituído por PEG/fosfato, com polímero de massa molar 8000. A melhor condição no sistema foi utilizando 27% PEG e 10% sal, no pH 8,0, em que a recuperação da enzima foi de 175,2% na fase de fundo e fator de purificação de 10,1 vezes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTELO, F. S. **Purificação de Ficocianina de *Spirulina platensis* através de Sistema Aquoso Bifásico e Caracterização Cinética da Desnaturação Térmica.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995

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.

BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipase from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 57-62, 1999.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637—644, 2005.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR, A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 135–140, 2006.

CORTEZ, E. V.; ALMEIDA, M. G. F.; ROBERTO, I. C.; PESSOA JR, A.; VITOLO, M. Liquid-liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.55-60, 2004.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of α -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 104–108, 2006.

GEKAS, V.; LEIVA, L. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**. P. 2-12, 1985.

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.

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

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 of 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-phase Systems. **Biochemical Engineering Journal**, p. 217-223, 2004.

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 para extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima β -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, 2008.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. **Extração de β -galactosidase de *kluyveromyces marxianus* CCT 7081 e purificação através de sistema aquoso bifásico.** Graduação (Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação de amiloglicosidase.** 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, L. A.; NETO, B. B.; PORTO, A. L. F. P.; TAMBOURGI, E. B. Extractive Cultivation of Xylanase by *Penicillium janthinellum* in a Poly(ethylene glycol)/Cashew-Nut Tree Gum Aqueous Two-Phase System. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1880-1884, 2004.

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.

PESSOA, 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. 47, p. 716-721, 2006.

PORTO, T. S. **Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas Utilizando PEG/Citrato**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RECH, R. et al. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

ROJAS, E. E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ZUNIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1751–1759, 2004.

SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 324-331, 1999.

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, nº 3, 1997.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familial carbohydrate, milk lactose. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541 – 2562, 1995.

**CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β -GALACTOSIDASE (*Kluyveromyces
marxianus* CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO**

CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE β -GALACTOSIDASE (*Kluyveromyces marxianus* CCT 7082) UTILIZANDO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Microbiologia, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900, (53)32338754, *dqmsjk@furg.br

RESUMO

A enzima β -galactosidase ou lactase tem sido muito estudada devido a sua grande aplicabilidade na indústria alimentícia e farmacêutica. A utilização desta enzima demanda distintos graus de pureza em função da aplicação à qual será destinada. O processo de ultrafiltração é um processo com membranas, que pode vir como uma alternativa entre os processos de separação existentes para recuperar, concentrar e purificar macromoléculas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade de concentração e fracionamento de extratos de β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando o processo de ultrafiltração. Foram testadas membranas comerciais de ultrafiltração com diferentes diâmetros de poros (massa molar de corte), mantendo-se a solução enzimática em pH 6,0 e a temperatura entre 5-10 °C. O desempenho das membranas foi avaliado pela quantificação da atividade enzimática e do teor de proteína total na alimentação, no retido e no permeado em cada teste. Os efeitos do pH e da força iônica do extrato enzimático foram avaliados sobre o desempenho da separação, utilizando a membrana de 50 KDa selecionada anteriormente. O pH foi variado entre 6,0; 7,0 e 8,0 e NaCl foi adicionado na solução de alimentação para aumentar a força iônica do meio. A ultrafiltração se mostrou eficiente na recuperação e concentração da β -galactosidase, sendo que a membrana de 50 KDa apresentou o melhor desempenho permitindo a passagem da menor quantidade de enzima para o permeado, apresentando uma recuperação da enzima de 66,3% e um fator de concentração de 7,6 vezes. Os resultados mostraram que o pH e a força iônica não levaram a melhoria no desempenho do processo.

Palavras-chave: *fouling*, recuperação, fator de concentração, enzimas.

1. INTRODUÇÃO

A bioseparação de proteínas se refere à recuperação e purificação de produtos protéicos e é uma importante operação na indústria de alimentos, farmacêutica e biotecnológica. A separação de proteínas é no presente momento mais importante na indústria de bioprocessos do que em qualquer momento anterior. Isto está em grande parte relacionado aos fenômenos de desenvolvimento dos últimos anos no campo de biotecnologia moderna. Cada vez mais produtos protéicos têm que ser purificados em quantidades maiores.

Enzimas são catalisadores biológicos que podem ser usadas *in vitro* para catálise em escala industrial. A enzima β -galactosidase, mais especificamente produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 pode ser aplicada para hidrólise da lactose em grande escala. A hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos tendo em vista seus efeitos benéficos na assimilação de alimentos contendo lactose, bem como as possíveis vantagens tecnológicas e ambientais de aplicação industrial (CARMINATTI, 2001).

Os Processos de Separação por Membrana (PSM) têm sido considerados como uma alternativa aos processos de separação existentes, sendo cada vez mais difundidos em função da constante redução do custo de equipamentos e membranas. Uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes na fase. A membrana controla a taxa de transporte relativo de várias espécies e, como toda separação, fornece um produto menos concentrado de certos componentes e um outro produto mais concentrado nestes componentes (LOPES *et al.*, 2005).

As principais aplicações do PSM em Biotecnologia se concentram nas operações de pós-processamento (“downstream processing”), ou seja, na recuperação, concentração e purificação de bioprodutos (SAXENA *et al.*, 2009).

Suas vantagens incluem a possibilidade de separar moléculas mantendo a qualidade consistente dos produtos, sendo necessárias mínimas intervenções, minimização de danos causados por temperatura, possibilidades de reciclo e pouca geração de efluentes, consumo de energia moderado, baixa perda de carga, ausência de solventes e mudanças de fase (SKELTON, 2000)

A tecnologia de separações com membranas, no entanto, ainda está em desenvolvimento, encontrando cada vez mais aplicações na indústria de alimentos e de biotecnologia, sendo que muitos desafios têm sido superados rapidamente.

Com base na importância de estudar os processos de recuperação e purificação de produtos biológicos, o presente trabalho teve por objetivo estudar a avaliação da concentração e fracionamento de β -galactosidase utilizando processo de ultrafiltração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção da enzima β -galactosidase foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP e selecionada por Manera *et al.* (2008). 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). Após o crescimento do microrganismo em ágar YM inclinado foi realizada a inoculação da cultura em caldo extrato de malte e levedura e incubada a 30°C, 180 rpm por 24 h. Após este período, uma alíquota de 5 mL desta suspensão foi transferida asépticamente para tubos de ensaio contendo o mesmo volume de uma solução de glicerol 20%, previamente esterilizada. Esses tubos foram armazenados sob congelamento, a -18°C (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.2 Preparo do Inóculo

O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo apresentou a composição (g L⁻¹): extrato de levedura (1,0), (NH₄)₂SO₄ (1,2), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄ · 7H₂O (0,4) e lactose (10,0). O meio foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0 ajustado com soda (NaOH 1N) ou ácido clorídrico (HCl 1N). O inóculo que foi preparado em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min sem a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração (Sistema Sartorius, com 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 à temperatura ambiente e a cultura em glicerol, previamente descongelada, foi adicionada em uma concentração de 10% (v/v) e incubado por 24 h a 30°C e 180 rpm (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.3 Fermentação Submersa

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de fermentação em uma relação de 10% (v/v). As fermentações foram realizadas 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) com pH ajustado para 6,0. A lactose e o meio de fermentação foram esterilizados como descrito no item 2.2. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória Tecnal TE-420 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 180 rpm, 30 °C por 96 h (MANERA *et al.*, 2008).

2.4 Extração da Enzima β-galactosidase

A enzima β-galactosidase foi extraída através do rompimento das células da levedura. Para isso foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm, para cada mL de suspensão de células. A suspensão foi agitada em um vórtex Phoenix (Araraquara, São Paulo, Brasil) por 40 min, e em seguida centrifugada em uma centrífuga refrigerada Cientec CT-5000R (Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 6000 rpm (5031 x g) por 10 min a 4°C. O sobrenadante, livre de células, foi utilizado para medida da atividade enzimática (MEDEIROS *et al.*, 2008).

Um mL de suspensão de células foi obtido por ressuspensão de uma massa de células equivalente a 40 mg de célula seca em tampão fosfato de potássio 50 mM (KH₂PO₄) e cloreto de manganês (MnCl₂·4H₂O) 0,1 mM pH 6,6 para se obter um volume final de 1 mL (MEDEIROS, 2008).

2.5 Célula de Ultrafiltração (UF)

Para a realização dos ensaios de ultrafiltração foi utilizada uma unidade de bancada tipo “dead-end”, de volume útil de 200 mL, agitada por barra magnética suspensa a 5 mm da superfície da membrana, que pode ser operada em batelada ou em modo contínuo. Um diagrama esquemático da célula é apresentado na Figura 1.

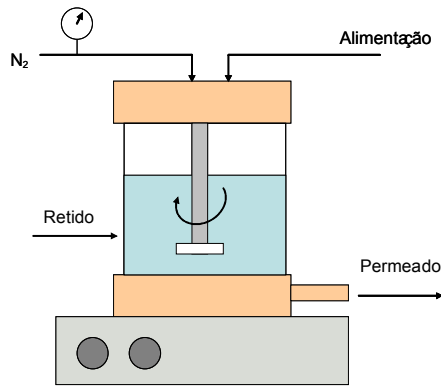


Figura 1: Modelo do sistema de UF.

2.6 Adsorção da enzima pela membrana

Este teste foi utilizado para verificar o grau de adsorção da enzima pelas membranas. Em um béquer foram adicionados 5 mL do extrato enzimático (pH 6,0) e 25 mm² da membrana a ser testada. Cada béquer foi submetido a agitação constante em um agitador magnético em temperatura de 7°C durante 24 h. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 0, 4 e 24 h, quantificando-se a atividade enzimática e o teor de proteína total. Os testes foram realizados utilizando o extrato enzimático bruto e o extrato diluído 20 vezes.

2.7 Fracionamento e concentração da enzima β -galactosidase

Foram testadas membranas de UF com massas molares de corte (MWCO) de 10 (Millipore Polyethersulfone PBGC), 50 (Osmonics DDS-GR51PP) e 60 (Osmonics Polisulfone 1156432) KDa.

A temperatura do sistema foi mantida em torno de 7°C, para minimizar perdas por desnaturação, agitação média em agitador magnético, pressão de operação 147,1 KPa (manométrica) e pH do extrato enzimático em 6,0. Os testes foram realizados para escolha da membrana mais adequada ao processo, na qual permitisse a passagem da menor quantidade de enzima para o permeado, e maior fator de purificação (que indica que as proteínas não ativas permearam a membrana, retendo a enzima de interesse). A atividade enzimática e o teor de proteína total na alimentação, retido e no permeado foram quantificadas após cada ensaio de permeação.

2.8 Efeito do pH e da força iônica

Após a determinação da membrana mais adequada nos testes de fracionamento e concentração da β -galactosidase, o efeito do pH e da força iônica do meio sobre o desempenho do processo foi avaliado. Estes parâmetros afetam diretamente a conformação das proteínas e conseqüentemente a interação soluto-soluto e soluto-membrana (BHATTACHARJEE *et al.*, 2006; ZULKALI *et al.*, 2005; TENG *et al.*, 2006)

Com relação ao pH, a enzima β -galactosidase foi submetida a variações de pH entre 6,0; 7,0 e 8,0. Foram utilizadas as soluções tampão fosfato de potássio 50 mM com $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 mM (pH 6,0), tampão acetato de sódio 50 mM com $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 mM (pH 7,0) e tampão tris HCl 50 mM com $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 mM (pH 8,0), as soluções foram diluídas 1:5 e os testes foram realizados com a membrana de massa molar de corte 50 KDa (Osmonics DDS-GR51PP). Para a mudança da força iônica do extrato foi adicionado ao mesmo NaCl até a saturação, mantendo-se o pH 6,0.

2.9 Fator de Purificação (FP)

O fator de purificação FP obtido para a enzima foi calculado através da Equação 1 (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$FP = \frac{A_{esp. saída}}{A_{esp. entrada}} \quad (1)$$

Onde: $A_{esp. retido}$ é a atividade específica de β -galactosidase no retido (U/ mg); $A_{esp. alim}$ é a atividade específica de β -galactosidase na alimentação (U/mg).

2.10 Recuperação de β -galactosidase (RP)

A recuperação da β -galactosidase RP (%) foi calculada pela Equação 2 (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$RP = \left[\frac{A_{fase} \times V_{fase}}{A_{extrato inicial} \times V_{inicial}} \right] * 100 \quad (2)$$

Onde: A_{retido} é a atividade enzimática de β -galactosidase no retido (U/mL); A_{alim} é a atividade enzimática β -galactosidase na alimentação (U/mL); V_{alim} é o volume inicial do extrato adicionado em mL.

2.11 Retenção (%R)

A retenção da membrana foi obtida para a proteína e atividade através da Equação 3 (REIS *et al.*, 2003).

$$\% R = \left(\left(1 - \frac{C_p}{C_a} \right) * 100 \right) \quad (3)$$

Onde: C_p é a concentração do componente no permeado e C_a é a concentração do componente na alimentação.

2.12 Métodos Analíticos

2.12.1 Determinação da Atividade Enzimática da β -galactosidase

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, Aldrich) como substrato, segundo 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, sob as condições do ensaio de 37°C e pH 6,6.

2.12.2 Determinação da Proteína

As proteínas foram determinadas segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA, Sigma, Fração V isenta de protease) como padrão.

2.12.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi feita segundo normas da AOAC (1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fracionamento e concentração da enzima β -galactosidase

A adsorção da enzima β -galactosidase pôde ser estimada pelas medidas de atividade das soluções antes e após o contato com a membrana. Estes ensaios mostraram que a máxima adsorção foi de 10% para a membrana de 10 KDa. Este resultado, no entanto, deve ser visto com cautela, pois parte da queda da atividade da solução sobrenadante pode ter sido devido à inativação enzimática e não devido à adsorção. A avaliação da estabilidade da atividade enzimática na mesma temperatura dos ensaios de adsorção (5°C) mostrou que a enzima perde no máximo 10% da atividade inicial após 24 h. Desta forma, pode-se concluir que o efeito da adsorção da enzima na membrana pode ser desprezado. A atividade enzimática da enzima bruta utilizada nos ensaios de ultrafiltração foi de 42,1 U.mL⁻¹.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos ensaios de concentração e purificação da β -galactosidase por ultrafiltração com diferentes membranas.

Tabela 1: Concentração e purificação da β -galactosidase utilizando membranas de diferentes massas molares de corte.

| Massa molar de corte | %R | FP | R _P (%) ^a | R _A (%) ^b | F _C (V) ^c | F _C (A) ^d | F _C (P) ^e |
|----------------------|------|-----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 10 KDa | 62,2 | 1,0 | 100 | 100 | 13,9 | 8,6 | 8,8 |
| 50 KDa | 66,3 | 1,1 | 100 | 100 | 11,5 | 7,6 | 7,2 |
| 60 KDa | 43,3 | 0,8 | 99,2 | 99,9 | 13,2 | 5,7 | 7,2 |

^aRetenção calculada com base na proteína total

^bRetenção calculada com base na atividade enzimática

^cfator de concentração calculado com base no volume

^dfator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^efator de concentração calculado com base na concentração total de proteínas

Os resultados mostram que com o aumento do MWCO acima de 50 KDa há uma diminuição na retenção e conseqüentemente nos fatores de concentração calculado com base na atividade enzimática. No entanto, o fator de purificação sofre pouca variação. Este comportamento pode ser provavelmente relacionado à possível semelhança entre o tamanho da β -galactosidase e das proteínas inativas, levando-as

a apresentarem a mesma retenção, não ocorrendo, assim, a purificação. Ainda, a formação de agregados protéicos pode também ocorrer, dificultando a separação das proteínas não ativas da enzima de interesse. Outro fator agravante é a possível formação de camada gel na superfície da membrana, que causa a formação de uma membrana dinâmica, que por sua vez pode aumentar a retenção das proteínas presentes no extrato. As baixas recuperações da enzima podem estar relacionadas a perdas devido à formação de camada gel na superfície da membrana. Segundo BRANS *et al.* (2004) durante a ultrafiltração ocorrem fenômenos responsáveis pelo declínio do fluxo de permeado. Este declínio geralmente é decorrente de fenômenos resistivos. Um destes fenômenos é conhecido por *fouling*, que é geralmente caracterizado pela associação dos fenômenos da camada gel (adsorção de partículas na superfície da membrana) e da colmatagem, que é o bloqueamento dos poros.

A membrana de massa molar de corte de 50 KDa foi a mais adequada ao processo, pois apresentou a maior recuperação da enzima (66,3%), com capacidade de retenção de 100% impedindo a passagem da enzima para o permeado, concentrando a β -galactosidase em 7,6 vezes.

3.2 Influência do pH e força iônica

3.2.1 Influência do pH

Tabela 2: Concentração da β -galactosidase em diferentes pH.

| pH | %R | FP | R _P (%) ^a | R _A (%) ^b | F _C (V) ^c | F _C (A) ^d | F _C (P) ^e |
|-----|------|-----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 6,0 | 26,2 | 1,3 | 96,6 | 99,6 | 43,8 | 11,3 | 8,9 |
| 7,0 | 56,9 | 1,1 | 97,7 | 99,8 | 14,3 | 8,1 | 7,6 |
| 8,0 | 49,7 | 1,1 | 99,6 | 99,4 | 17,1 | 8,4 | 7,7 |

^aRetenção calculada com base na proteína total

^bRetenção calculada com base na atividade enzimática

^cfator de concentração calculado com base no volume

^dfator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^efator de concentração calculado com base na concentração total de proteínas

De acordo com os resultados da Tabela 2, observou-se que a mudança no pH da enzima ocasionou pouca diferença no processo de concentração da β -galactosidase, com exceção do ensaio em pH 6,0 o qual apresentou valores distintos de recuperação. Neste ensaio não foi possível um bom controle da permeação,

ocorrendo a concentração demasiada da alimentação. O volume de retido foi então muito pequeno, levando a alto valor de concentração volumétrica (43,8) e grande perda da enzima, pois possivelmente grande parte ficou retida na superfície da membrana na camada gel. DEREK *et al.* (2004) observaram que o *fouling* é formado pelo acúmulo de partículas macromoleculares na superfície da membrana, e/ou cristalização e precipitação de solutos menores na superfície e nos poros da membrana.

Os fatores de purificação em pH 7,0 e 8,0 foram os mesmo obtidos no ensaio com a membrana de 50 KDa apresentado na Tabela 1, mostrando que o pH não influencia o fracionamento das proteínas presentes no extrato. Um pequeno aumento na retenção é observado em pH 8,0 o que pode estar relacionado à precipitação devido à formação de agregados protéicos, aumentando a retenção observada.

3.2.2 Influência da Força Iônica

Cloreto de sódio foi adicionado ao extrato enzimático da β -galactosidase de forma a se obter a mesma força iônica de uma solução tampão de fosfato de potássio utilizada em sistemas de purificação baseado em sistemas aquosos bifásicos (SAB). Esta avaliação vislumbra a possibilidade de utilização da ultrafiltração para a separação da enzima da solução tampão, após a separação de fases no SAB. A Tabela 3 apresenta o resultado do ensaio realizado com adição de NaCl, pH 6,0 e membrana de 50 KDa.

Tabela 3: Recuperação e Concentração da β -galactosidase com adição de NaCl.

| Membrana | %R | FP | R _P (%) ^a | R _A (%) ^b | F _C (V) ^c | F _C (A) ^d | F _C (P) ^e |
|----------|------|-----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 50 KDa | 41,7 | 0,7 | 96,4 | 96,4 | 11,7 | 4,5 | 6,7 |

^aRetenção calculada com base na proteína total

^bRetenção calculada com base na atividade enzimática

^cfator de concentração calculado com base no volume

^dfator de concentração calculado com base na atividade enzimática

^efator de concentração calculado com base na concentração total de proteínas

Pode-se observar que houve pouca mudança nos resultados, em comparação ao ensaio com baixa força iônica (Tabela 1). Ainda, o aumento da força iônica levou a um declínio no fator de purificação, indicando uma possível desativação enzimática, ou ainda um favorecimento à retenção de frações protéicas não ativas.

Zulkali *et al.* (2005) observou que a rejeição do íon cloreto foi muito dependente da interação pH, pressão e força iônica. Esta rejeição foi mais alta variando de 3,73% para 28,05% em pH 8,0 independente da concentração salina. Devido à polarização de concentração e adsorção da proteína sobre a membrana, houve um acúmulo de cargas negativas na membrana resultando na repulsão dos íons cloreto e atração dos íons positivos de sódio. A carga elétrica potencial negativa na superfície da membrana repeliu as cargas negativas dos íons cloreto e, portanto, aumentou a sua rejeição. A rejeição aumentou com o maior incremento de 18,01% em pH 8,0 força iônica em 5 g/L a partir de uma mudança na pressão de 2 para 4 bar. No entanto, em baixas pressões de funcionamento, a rejeição do íon cloreto aumentou quando a força iônica era menor. Quanto maior a força iônica, maior é a rejeição, o que foi independente do pH e da pressão.

4. CONCLUSÃO

A ultrafiltração dos extratos enzimáticos contendo a enzima β -galactosidase permitiu se obter uma alta concentração da enzima, podendo-se atingir um fator de concentração da atividade enzimática em até cerca de 8,0 vezes utilizando a membrana de acetato de celulose com massa molar de corte de 50 KDa, obtendo-se uma recuperação da enzima de 66,3%. Estes resultados mostram que o processo é eficiente na etapa de concentração do extrato, podendo ser aplicado como uma etapa posterior em uma sequência de purificação da enzima.

As variações no pH e na força iônica exerceram baixa influência sobre a concentração e fracionamento do extrato enzimático, sendo que em alguns casos o desempenho do sistema foi prejudicado por mudanças estas variáveis. Não foi possível realizar a purificação utilizando o processo de ultrafiltração, provavelmente devido a semelhanças entre as proteínas não ativas e a enzima de interesse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995.

BHATTACHARJEE, C.; BHATTACHARJEE, S.; DATTA, S. Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. **Journal of Membrane Science**, v. 275, p. 141–150, 2006.

BRADFORD, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANS, G.; SCHROEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263–272, 2004.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

DEREK, C. J. C.; ZULKALI, M. M. D.; AHMAD A.L. In-situ extracellular protein isolation of *yarrowia lipolytica* through membrane technology: A review. **School of Chemical Engineering**, Engineering Campus, Universiti Sains Malaysia, 2004.

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.

LOPES, F. L. G. SEVERO JR, J. B. SANTANA, J. C. C. SOUZA, R. R. TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, n.1, p.33-38, 2005.

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

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 para extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima β -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, 2008.

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.

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.

SKELTON, R., Membrane filtration applications in food industry, **Filtration & Separation**, p. 28-30, 2000.

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 of Membrane Science**, v. 281, p.103–110, 2006.

ZULKALI, M.M.D.; AHMAD A.L.; DEREK C.J.C. Membrane application in proteomic studies: Preliminary studies on the effect of pH, ionic strength and pressure on protein fractionation. **Desalination**, v. 179, p. 381-390, 2005.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES

4. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os estudos realizados neste trabalho pode-se concluir que:

Para o PEG de massa molar 300 no pH 6,0 não foi possível realizar os ensaios, pois todos os pontos traçados não formaram duas fases. Nos ensaios utilizando PEG 300 pH 7,0 e pH 8,0 e PEG 1500 pH 6,0 e 8,0 a enzima teve preferência pela fase rica em PEG (fase de topo).

Nos sistemas de massas molares 4000, 6000, 8000 e 10000 em sua maioria a enzima concentrou-se na fase de fundo, rica em sal.

A enzima β -galactosidase, em sua maioria, teve preferência de migrar para a fase de fundo rica em sal, sendo esta considerada menos hidrofóbica.

A purificação da enzima β -galactosidase foi atingida utilizando o sistema aquoso bifásico (SAB) constituído por PEG/fosfato, com polímero de massa molar 8000. A melhor condição no sistema foi utilizando 27% PEG e 10% sal, no pH 8,0, em que a recuperação da enzima foi de 175,2% na fase de fundo e fator de purificação de 10,1 vezes.

As variações no pH e na força iônica exerceram baixa influência sobre a concentração e fracionamento do extrato enzimático, sendo que em alguns casos o desempenho do sistema foi prejudicado por estas variáveis. Não foi possível realizar a purificação utilizando o processo de ultrafiltração, provavelmente devido à semelhanças entre as proteínas não ativas e a enzima de interesse.

A ultrafiltração dos extratos enzimáticos contendo a enzima β -galactosidase mostraram que foi possível uma alta concentração da enzima, podendo atingir um fator de concentração da atividade enzimática em até 7,6 vezes utilizando a membrana de Millipore com massa molar de corte de 50 KDa, obtendo-se uma recuperação da enzima de 66,3%. Estes resultados mostram que o processo é eficiente na etapa de concentração do extrato, podendo ser aplicado como uma etapa posterior em uma sequência de purificação da enzima.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros seria interessante verificar a influência de fatores como a massa molar de PEG e valores de pH, mediante as melhores condições obtidas nos resultados apresentados nesta dissertação. Desenvolvendo um planejamento experimental segundo metodologia de superfície de resposta, avaliando formação da interface e determinação das linhas de amarração do sistema aquoso bifásico (SAB). As faixas utilizadas seriam em torno de 8000 para a massa molar de PEG e pH 8,0.

Com relação ao processo de separação por membrana torna-se necessário a busca de membranas e condições de processamento que permitam fazer se atingir a alta concentração aliada a um elevado fator de purificação da enzima. Sugere-se a utilização de módulos de escoamento tangencial, para minimizar a formação de camada gel, realização de ensaios com tampão fosfato de potássio concentrado (fase aquosa que extrai esta enzima em sistemas aquosos bifásicos à base de PEG e fosfato) e utilização de membranas de afinidade visando atingir maiores fatores de purificação.

Outro ponto a ser investigado envolve a associação de processos de purificação que utilizem SAB e membranas.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAYRAK, N.; YANG, S-T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β –galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 371-383, 2002.

ALBERTSSON, P. A. **Partitioning of cell particles and macromolecules**. New York: John Wiley & Sons, 1986.

ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIM, 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.

ANTELO, F. S. **Purificação de Ficocianina de *Spirulina platensis* através de Sistema Aquoso Bifásico e Caracterização Cinética da Desnaturação Térmica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995

ARGUELLO, M.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F. A.; ÁLVAREZ, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes fouled by whey protein. **Journal agriculture food chemical**, v. 50, p. 1951-1958, 2002.

BASSETTI, F. J.; PERES, L.; PETRUS, J. C. C. Desenvolvimento de membranas assimétricas microporosas e aplicação na concentração de soro de queijo. In: **4 Congresso Ibero-americano em Ciência e Tecnologia de Membranas**, 2003, Florianópolis. 4 Congresso Ibero-americano em Ciência e Tecnologia de Membranas, v. 1. p. 17-22, 2003.

BAYRAMOGLU, G.; TUNALI, Y.; ARICA, Y. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catalysis Communications**, v. 8, p. 1094–1101, 2007.

BECERRA, M.; GONZÁLEZ SISO, M. I.; Yeast β -galactosidase in Solid-state Fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 39-44, 1996.

BECERRA, M.; RODRÍGUEZ-BELMONTE, E.; CERDÁN, M. E.; GONZÁLEZ SISO, M. I. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media. **Journal of Biotechnology**, v.109, p. 131 – 137, 2004.

BHATTACHARJEE, C.; BHATTACHARJEE, S.; DATTA, S. Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. **Journal of Membrane Science**, v. 275, p. 141–150, 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.

BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipase from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 57-62, 1999.

BRANS, G.; SCHROEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263–272, 2004.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637—644, 2005.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR, A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 135–140, 2006.

CHARCOSSET, C. Membrane Processes in Biotechnology: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 482–492, 2006.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Pennsylvania, USA: Technomic publishing corporation. 1998.

CHUMPITAZ, L. D. A. **Separação de Proteínas de Soro de Leite de Queijo com Sistema Aquoso Bifásico em Coluna de Discos Rotativos**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

CORTEZ, E. V.; ALMEIDA, M. G. F.; ROBERTO, I. C.; PESSOA JR, A.; VITOLO, M. Liquid-liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.55-60, 2004.

DEREK, C. J. C.; ZULKALI, M. M. D.; AHMAD A.L. In-situ extracellular protein isolation of *yarrowia lipolytica* through membrane technology: A review. **School of Chemical Engineering**, Engineering Campus, Universiti Sains Malaysia, 2004.

DI SERIO, M.; MATURO, C.; DE ALTERIIS, E.; 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.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, Portugal, v. 40, p.1151-1154. 2005.

E-COLLEN, B. E.; LENCKI, R. W. Influence of protein surface morphology on the ultrafiltration flux resistance of bovine serum albumin. **Biotechnology Program** v. 15, p. 732-739, 1999.

FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**, v. 37, p.267–274, 2001.

FURLAN, S. A.; CARVALHO-JONAS, M. F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B.; JONAS, R. Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de microrganismos produtores de β -galactosidase. **Arquivos de Biologia e tecnologia**, Curitiba, v. 38, p. 1261 – 1268, 1995.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnología de los enzimas**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1990.

GAO, L.; KHAI, D. N.; UTIOH, A. C. Pilot scale recovery of protein from a pea whey discharge by ultrafiltration. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 34, p. 149-158, 2001.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 104–108, 2006.

GEKAS, V.; LEIVA, L. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**. P. 2-12, 1985.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Fractionation of BSA and Lysozyme using Ultrafiltration: Effect of pH and Membrane Pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v. 139, p.17-28, 1998.

GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; GONZALEZ, P.; BATISTA-VIERA, F.; BRENA, B. M. Enzymatic synthesis of galactosyl–xylose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p.159–165, 2002.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p.161–172, 2005.

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.

JAMES, B. J.; JING, Y.; CHEN, X. D. Membrane fouling during filtration of milk a microstructural study. **Journal of food chemical engineering**, v. 60, p. 431-437, 2003.

JULIANO, L. N. **Síntese e caracterização de membranas para Clarificação do suco de frutas**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

KIM, Y. S.; PARK, C. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 903-908, 2006.

KÖHLER, K.; VEIDE, A.; ENFORS, S. F. Partitioning of β -galactosidase fusion proteins in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 204-209, 2002.

KULA, M. R. Trends and Future Prospects of Aqueous two phase Extraction. **Bioseparation**. p. 181-189, 1990.

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 1-9, 2006b.

LADERO, M.; FERRERO, R.; VIAN, A.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 505-513, 2005.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA - OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.1 – 9, 2004.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, J.L.; CARRASCOSA, A. V.; PESSELA, B. C. C.; GARCÍA-OCHOA, F. Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. Madri, Spain, v. 30, p. 392-405, 2002.

LIMA, A. S. **Extração Líquido-líquido de Pectinase Microbiana**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

LOPES, F. L. G. SEVERO JR, J. B. SANTANA, J. C. C. SOUZA, R. R. TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, n.1, p.33-38, 2005.

MAHONEY, R. R.; WHITATER, J. R. Stability and Enzymatic Properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 1, p. 327-350, 1997.

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

MANERA, A. P. **Otimização do Meio de Cultura para Produção da Enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e Caracterização Parcial da Enzima**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

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 of Chromatography B**. V 734, p. 15-22, 1999.

MARIOTTI, M.P.; TREVISAN, H.C.; HYAMANAKA, H.. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada**. 2000. Dissertação (Mestrado no Instituto de Química), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2000.

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

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 para extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima β -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, 2008.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. **Extração de β -galactosidase de *kluyveromyces marxianus* CCT 7081 e purificação através de sistema aquoso bifásico**. Graduação (Projeto de Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação de amiloglicosidase**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MULDER, M. Basic principles of membrane technology. **Center for membrane science and technology**, University of twente, Enschede, The Netherlands, p. 564, 2000.

OLIVEIRA, L. A.; NETO, B. B.; PORTO, A. L. F. P.; TAMBOURGI, E. B. Extractive Cultivation of Xylanase by *Penicillium janthinellum* in a Poly(ethylene glycol)/Cashew-Nut Tree Gum Aqueous Two-Phase System. **Biotechnology Program**, v. 20, p. 1880-1884, 2004.

OLIVEIRA, E. H. P. **Preparação de membranas microporosas para tratamento de Efluentes da indústria de alimentos.** 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, Turkey, v. 35, p. 1037 – 1043, 2000.

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

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

PETRUS, J. C. C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para a clarificação de suco de frutas.** 1997. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

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.

PIVARNIK, L. F.; SENEGAL, A. G.; RAND, A. G. Hydrolytic and transgalactosil activities of commercial β -galactosidase in food processing. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 38, p. 33, 1995.

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. 47, p. 716-721, 2006.

PORTO, T. S. **Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas Utilizando PEG/Citrato.** 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

RECH, R. et al. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. 1 ed. v. 3. Pelotas: UFPEL. 218p. 2000.

REIS, F. G.; VIOTTO, L. A.; VIOTTO, W. H. . Influência da pressão e velocidade sobre o fluxo de permeado e rendimento protéico na ultrafiltração de leite acidificado para obtenção de queijo Quark. **In: IV Congresso Ibero-Americano de Ciência e Tecnologia de Membranas**, 2003, Florianópolis. Anais do IV Congresso Ibero-Americano de Ciência e Tecnologia de Membranas, v. 1. p. 224-230, 2003.

RIBEIRO, E. J. ; MARQUEZ, L. D. S.; SOUSA, G. D. B. Estudo da Influência da Aeração na Síntese de β -galactosidase por Fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2006, Santos- SP. **Anais do XVI COBEQ**, 2006.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 3–11, 2004.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. N.; DELGADILLO, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 15–21, 2005.

ROJAS, E. E. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ZUNIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1751–1759, 2004.

SAKSENA, A.; ZYDNEY, A.L. Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins by selective filtration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p 960, 1994.

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. p. 567-572, 2004.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um Novo Sistema Bifásico Aquoso e Aplicação em Extração de Proteínas com Coluna de Discos Perfurados Rotativos**. 2000. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

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.

SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

SILVA, L. H. M. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 324-331, 1999.

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, n° 3, 1997.

SNYNDER, S. M.; COLE, K. D.; SZLAG, D. C. Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 37, p. 268-274, 1992.

SKELTON, R., Membrane filtration applications in food industry, **Filtration & Separation**, p. 28-30, 2000.

SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1-6, 2002.

TEIXEIRA, A. M. D. **Estudo do comportamento da β -Galactosidase no processo de ultrafiltração. 2000.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.

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 of Membrane Science**, v. 281, p.103–110, 2006.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface Hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography**, p. 293-301, 2003.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, p.175-184, 2002.

VEIGA, P. G.; VIOTTO, W. H. Fabricação de queijo petit suisse por ultrafiltração de leite coagulado, efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 267-272, 2001.

WISEMAN, A. **Manual de Biotecnologia de los Enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familial carbohydrate, milk lactose. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541 – 2562, 1995.

ZULKALI, M.M.D.; AHMAD A.L.; DEREK C.J.C. Membrane application in proteomic studies: Preliminary studies on the effect of pH, ionic strength and pressure on protein fractionation. **Desalination**, v. 179, p. 381-390, 2005.

ZUNIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas Usadas no Processo de Purificação de Biomoléculas. **Boletim do Ceppa**, v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.

ANEXO

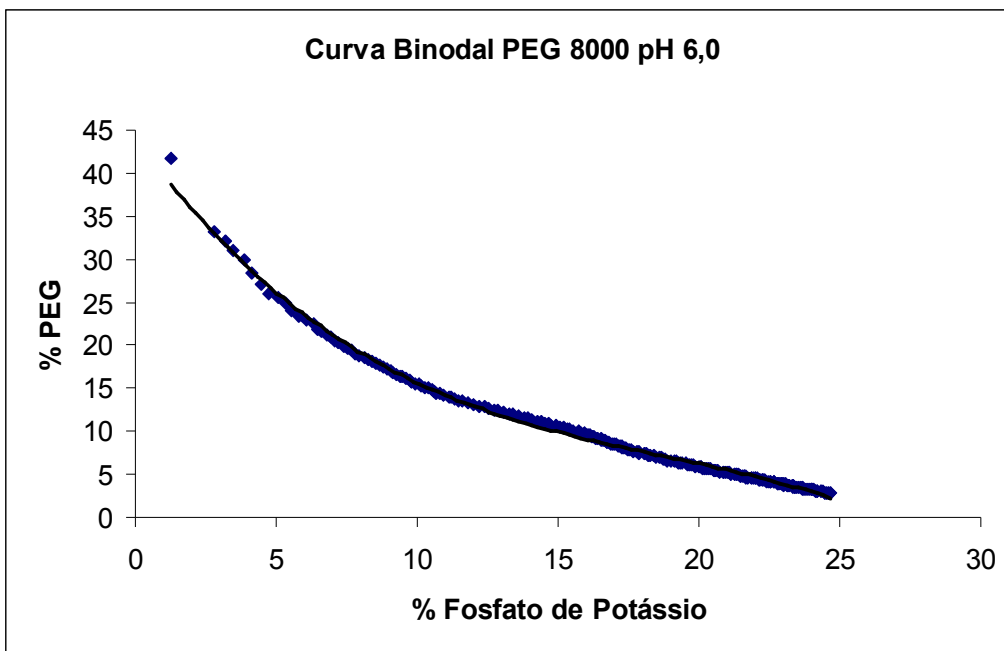


Figura 1: Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.

$$y = -0,0037x^3 + 0,2056x^2 - 4,5498x + 44,227$$

$$R^2 = 0,9967$$

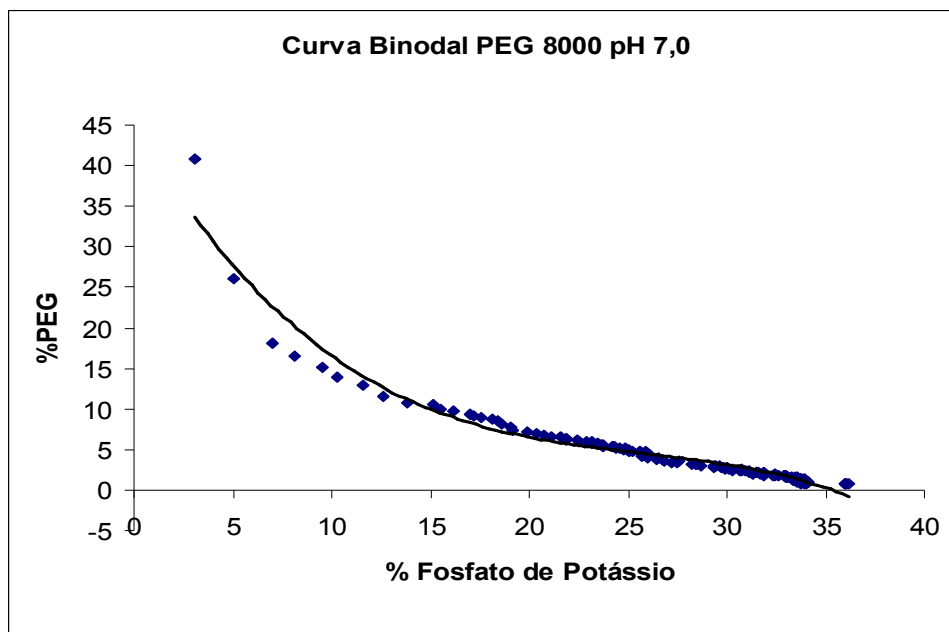


Figura 2: Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.

$$y = -0,002x^3 + 0,1509x^2 - 4,161x + 45,054$$

$$R^2 = 0,9602$$

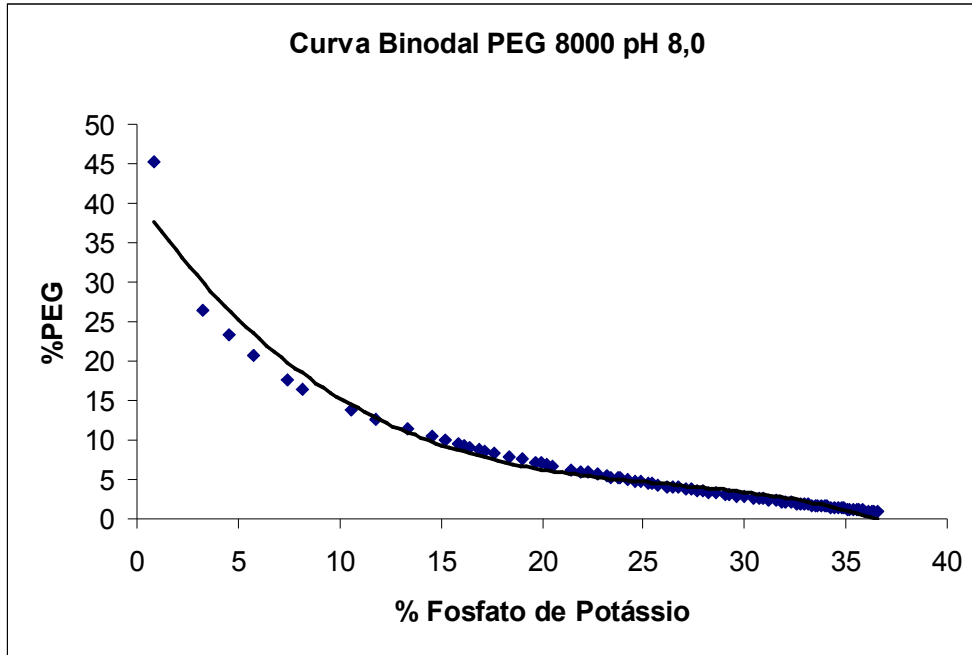


Figura 3: Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 8.

$$y = -0,0017x^3 + 0,1323x^2 - 3,6899x + 40,655$$

$$R^2 = 0,9676$$

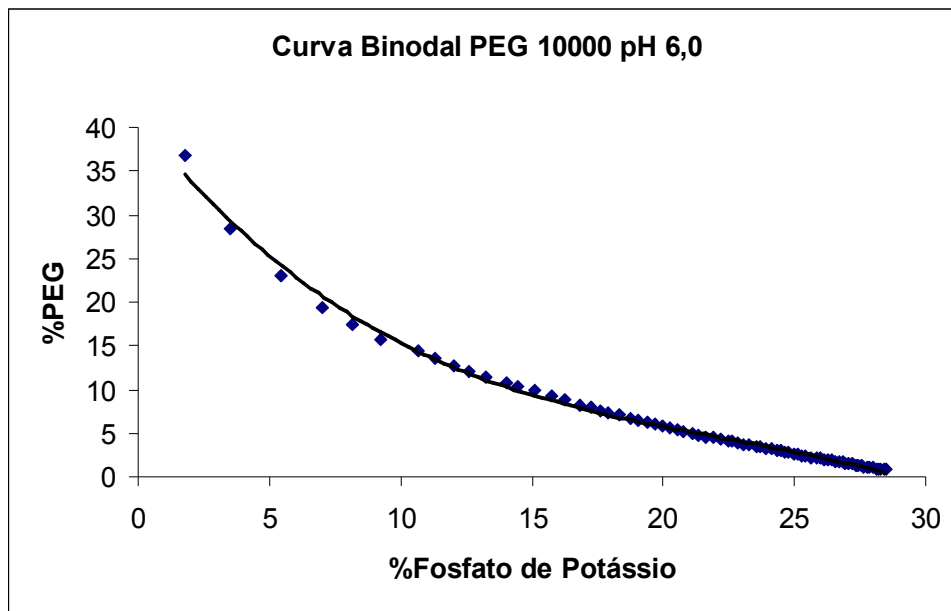


Figura 4: Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.

$$y = -0,0022x^3 + 0,1471x^2 - 3,817x + 40,97$$

$$R^2 = 0,9955$$

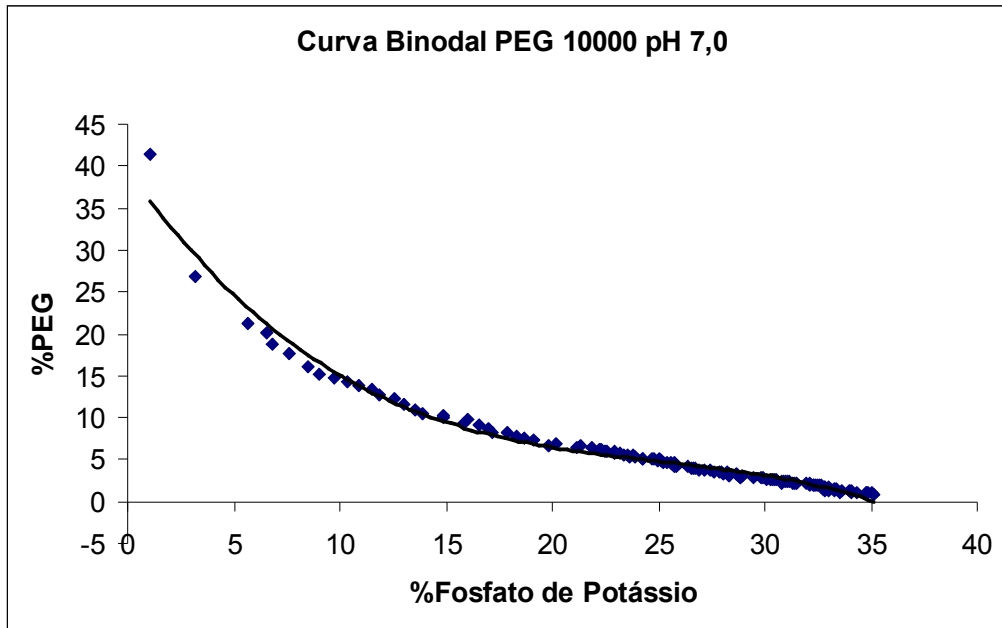


Figura 5: Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.

$$y = -0,0018x^3 + 0,1323x^2 - 3,5914x + 39,502$$

$$R^2 = 0,9826$$

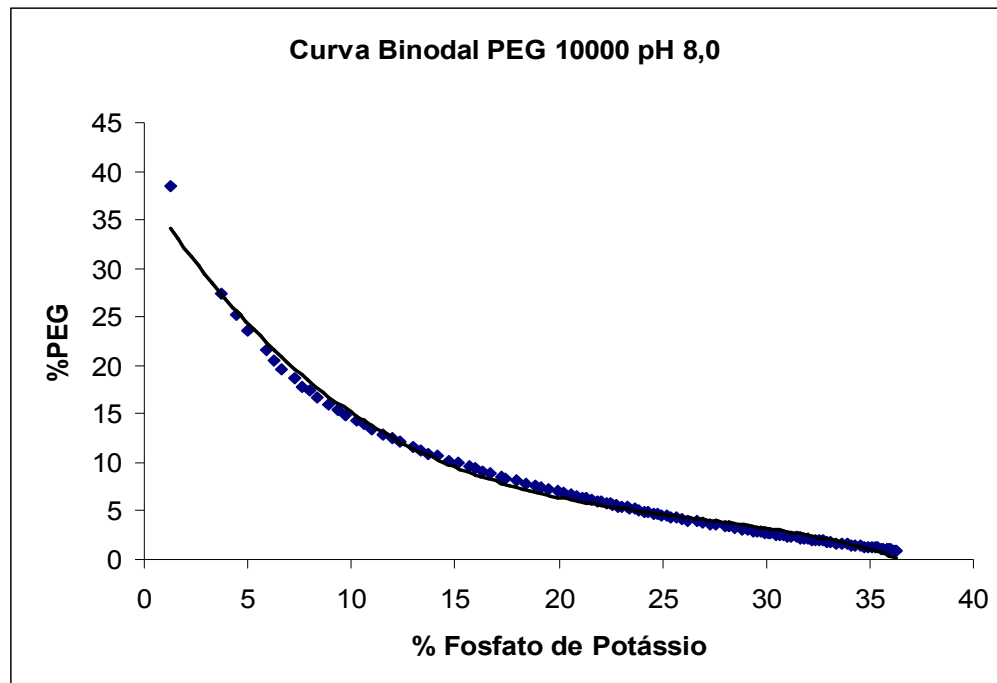


Figura 6: Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 8.

$$y = -0,0014x^3 + 0,1139x^2 - 3,2849x + 38,034$$

$$R^2 = 0,9908$$