

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

THIAGO VERAS CAVALCANTI FIRMINO

**PURIFICAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Penicillium*
islandicum URM5073 MEDIANTE CONCAVALINA-A IMOBILIZADA EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

Recife

2015

THIAGO VÉRAS CAVALCANTI FIRMINO

PURIFICAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Penicillium islandicum* URM5073 MEDIANTE CONCAVALINA-A IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Recife

2015

PURIFICAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Penicillium*
islandicum URM5073 MEDIANTE CONCAVALINA-A IMOBILIZADA EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICA

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Firmino, Thiago Veras Cavalcanti

Purificação da β -Galactosidase produzida por *Penicillium islandicum* URM5073
mediante Concanavalina-A imobilizada em nanopartículas magnética / Thiago Veras
Cavalcanti Firmino. – Recife: O Autor, 2015.

61 f.: il.

Orientadores: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Pabyton Gonçalves
Cadena

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Nanotecnologia 2. Biomolécula 3. Fungos I. Carvalho Júnior, Luiz
Bezerra de (orient.) III. Cadena, Pabyton Gonçalves III. Título.

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-217

THIAGO VÉRAS CAVALCANTI FIRMINO

PURIFICAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Penicillium islandicum* URM5073 MEDIANTE CONCAVALINA-A IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior/UFPE

Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto/UFRPE

Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera/UFPE

À minha rainha, mãe e dona de tudo que sou, Virginia.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Virginia Carla Vêras Cavalcanti, por toda dedicação e amor. Por todas noites que me acordou para estudar, por todo esforço incondicional para me oferecer sempre o melhor. Palavras nunca poderão expressar a gratidão e o orgulho que sinto por ser seu filho.

Às minhas irmãs, Amanda Vêras Cavalcanti Firmino e Priscilla Vêras Cavalcanti Firmino, por todas as brigas de irmãos que tivemos. Obrigado por serem minhas companheiras durante todos esses anos.

Às minhas queridas e amadas avós, Aurilete e Dona Rosa, por todo carinho de vó. Guerreiras, mas completamente amáveis. Obrigado por toda dedicação e amor a nossa família.

À minha sobrinha, Letícia de Espíndola Vêras por ter sido a sirene que me acordava todas manhãs. Por me dar a honra de te ver crescer (Apesar que eu gostaria que tu fosses criança para sempre).

Aos meus amigos comensais, Mário Henrique Mendes de Melo, Danylo Ferreira Cavalcanti, Priscila Moraes da Paixão, Vanessa Aparecida Meida, Bárbara Simone Vieira e Leonardo Prezzi Dornelles (o agregado), por todos risos e momentos que me fizeram sentir parte de algo especial.

Aos meus amigos Júnior Pereira de Lima e Elmiro Francisco de Novaes, um por me incentivar a continuar estudando e o outro por me incentivar e ajudar a descansar. O equilíbrio entre vocês foi fundamental. Obrigado por todo apoio, carinho e parceria.

À Maria Carolina de Albuquerque Wanderley, pela dedicação ao meu trabalho. Sem você, hoje esse trabalho não teria sido concluído. Obrigado por fazer tanto sem pedir nada em troca.

Ao meu grande amigo, José Manoe Duarte Wanderley, pelas incontáveis conversas de bar e de laboratório. Obrigado pelas palavras de incentivo e aconselhamentos.

Às super heroínas Luiza Lima e Gabriela Ayres pela paciência e dedicação à essa dissertação. Contribuíram e compartilharam seus conhecimentos com muita paciência e segurança. Compartilho da sorte do nosso orientador por estar cercado de pessoas tão competentes e prestativas. Muito obrigado.

Às companheiras de laboratório e amigas da vida, Marcela Araújo, Rafaela Ferraz e Milena Sales. Sou muito grato pelos puxões de orelha e os momentos de “choque de realidade”.

À mais que especial Eliete Rodrigues, por toda ajuda, suporte e puxões de orelha. Obrigado por me apoiar do começo ao fim dessa etapa tão importante para mim.

À querida Mariana Cabrera, onde sempre estive disposta em tirar dúvidas, oferecer suporte quando eu estava sozinho, em me aconselhar experimentalmente inúmeras vezes. Um exemplo como profissional ao qual desejo seguir. Meu muito obrigado por ser esse modelo.

À querida Verinha, que sempre me recebia com um sorriso no rosto e um 'bom dia'. Seu carinho e zelo me acolhiam nos momentos de frustração quando os experimentos davam errado.

Ao meu respeitado orientador Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, por toda direção e norteamento, por toda cobrança e paciência, pelos puxões de orelha, por todos momentos que paramos no corredor e pude ouvir histórias e aprendizados de vida. Além de ser um exemplo de profissional é um exemplo de pessoa. Meu sincero agradecimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena. Meu professor desde a graduação, sendo exemplo de competência e inteligência.

À todos professores que passaram pela minha formação. Vocês são verdadeiros heróis.

À FACEPE pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e todo funcionário que trabalha com a finalidade de fazer com que a instituição cresça cada vez mais.

À todos pesquisadores que serviram de base para a formação teórica desse trabalho.

Meu profundo agradecimento a todos vocês.

“Morrendo e aprendendo”

- Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi imobilizar covalentemente concanavalina-A (Con-A) à nanopartículas magnéticas do tipo magnetita-PANI para purificação da β -galactosidase a partir do fungo *Penicillium islandicum* URM5073. As condições de imobilização da Con-A e purificação da β -galactosidase, foram aperfeiçoadas através de planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , cuja análise foi realizada em função de duas respostas: quantidade de lectina imobilizada às nanopartículas e β -galactosidase retida na lectina imobilizada, com variáveis independentes a concentração de proteínas, o pH de solução, quantidade de suporte (mg), tempo de reação com o glutaraldeído, concentração do glutaraldeído e tempo de imobilização. A análise estatística mostrou os efeitos estimados das variáveis sobre o processo de imobilização da concanavalina-A em resposta a quantidade de proteína ligada ao suporte. De acordo com esta análise duas variáveis influenciaram significativamente a imobilização de concanavalina-A em suporte magnético, concentração de proteína e pH da reação. A concentração de proteína mostrou efeito positivo significativo, sugerindo que um aumento no valor deste parâmetro aumenta a imobilização de concanavalina-A às nanopartículas. No entanto, pH mostrou efeito negativo significativo, sugerindo que uma redução no valor do parâmetro aumenta a quantidade de proteína fixada ao suporte. A análise de amostras a partir da purificação de β -galactosidase do extrato bruto de *Penicillium islandicum*, a enzima comercial de *Aspergillus oryzae* e a β -galactosidase comercial contaminada com caseína e albumina foi realizada usando os dados obtidos a partir da dosagem de proteínas pelo método de dosagem de Lowry e realizada uma eletroforese SDS-PAGE. Esta metodologia indicou que a enzima purificada revelou uma redução de bandas de proteínas, sendo a β -galactosidase indicada com uma massa molecular aproximadamente de 100 kDa. Uma patente será depositada com base nos resultados obtidos da imobilização de Con-A em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na purificação de β -galactosidase.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Concanavalina-A. Imobilização. β -galactosidase. *Penicillium islandicum* URM5073. Purificação.

ABSTRACT

The aim of work was to immobilize concanavalin-A (Con-A) covalently to magnetic nanoparticles of magnetite-PANI type for purification of β -galactosidase produced by the fungus *Penicillium islandicum* URM5073. The conditions of Con A immobilization and β -galactosidase purification, were optimized by factorial design 2^{6-2} , whose analysis was performed according to two dependent variables: amount of lectin immobilized on nanoparticles and β -galactosidase retained in lectin. The Pareto chart analysis showed the estimated effects of variables on the process of Con-A immobilization in response to amount of protein bound to support. According this analysis, two significantly variables influence the immobilization of concanavalin-A on magnetic nanoparticle, the protein concentration and pH reaction. The protein concentration showed a significant positive effect, suggesting that an increase in the value of this parameter increases the immobilization of concanavalin-A to the nanoparticles. However, pH showed significant adverse effects, suggesting that a reduction in the value of the parameter increases the amount of protein attached to the support. The analysis of samples from the purification of β -galactosidase crude extract fermented by *Penicillium islandicum*, commercial *Aspergillus oryzae* enzyme and β -galactosidase contaminated commercial casein and albumin was performed using the data obtained from the protein content Lowry dosage method and used for SDS-PAGE electrophoresis. This method indicated that the purified enzyme showed a reduction of protein bands, with the β -galactosidase indicated with a molecular mass of approximately 100 kDa. A patent shall be paid based on the results of Con-A immobilized on magnetic nanoparticles and its application in β -galactosidase purification.

Palavras-chave: Magnetic nanoparticles. Concanavalina-A. Immobilization. β -galactosidase. *Penicillium islandicum* URM5073. Purification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Representação do tetrâmero da β -galactosidase. As tonalidades mais claras e mais escuras de uma determinada cor são usadas para distinguir o mesmo domínio em diferentes subunidades (ADALBERTO, 2005).....25

APÊNDICE A - ARTIGO

Figure 1 Results of 2^{6-2} factorial design (A) Pareto chart for the effects of variables Concanavalin-A immobilization (B) Pareto chart for the effects of variables β -galactosidase retained on lectin immobilized.....42

Figure 2. Crude extract (■), commercial β -galactosidase (●) and commercial β -galactosidase contaminated (▲) purification profile using Con A immobilized on nanoparticles coated with PANI. Elution was carried out with NaCl (0.1 M and 1 M) and 0.3 M glucose.....43

Figure 3. SDS-PAGE (A) Crude extract (B) Commercial β -galactosidase (C) Commercial β -galactosidase contaminated (D) Crude extract purified (E) Commercial β -galactosidase purified (F) Commercial β -galactosidase contaminated purified.....43

ANEXO A - PATENTE

Figura 1: Magnetita funcionalizada com polianilina e concanavalina-A imobilizada covalente (1) sendo atraída por um ímã (2).....59

Figura 2: Gel de eletroforese corado com nitrato de prata. Proteínas padrão – A, Extrato fermentado – B, Solução purificada – C.....60

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Estados de oxidação da Polianilina. Fonte: (FAEZ et al., 2000).....19

Tabela 2: Características bioquímicas de β -galactosidases fermentadas por microrganismos. Fonte: (MORTOZA, 2012).....24

APÊNDICE A - ARTIGO

Table 1 presents the independent variables and levels evaluated under are given. For statistical analyzes was used the software STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc. 2007). P-values < 0.05 were considered statistically significant.....38

Table 2 Matrix of the 2^{6-2} factorial design.....40

Table 3 β -galactosidase specific activity.....44

ANEXO A - PATENTE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

Color. - Colorido

coord. - Coordenador

DVD - Digital Video Disc

ed. - Edição

Ed. - Editor

f. - Folha

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

il. - Ilustrador

ISBN - International Standard Book Number

P&b - Preto e branco

p. - Página

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

IBICT - Instituto Brasileiro de Informações Científicas e Tecnológicas

trad. - Tradutor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 SUPORTES EMPREGADOS EM IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	17
2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNETICAS DE FERRO	18
2.3 LECTINAS.....	20
2.4 ENZIMAS.....	20
2.5 β -GALACTOSIDASE	22
2.5.1 Estrutura da β -galactosidase	25
2.5.2 Purificação de β -galactosidase	26
3 OBJETIVOS	27
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	28
APÊNDICE A – ARTIGO: PURIFICATION OF β-GALACTOSIDASE BY PENICILLIUM ISLANDICUM URM5073 THROUGH CONCAVALIN-A IMMOBILIZED ON MAGNETIC NANOPARTICLES	33
ANEXO A – PATENTE: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	50
4 CONCLUSÃO	61

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos inovadores de purificação de biomoléculas é um grande desafio para pesquisadores e indústria. Tal fato requer o aprimoramento dos processos existentes, com o objetivo de reduzir os custos para a indústria e consumidores. A aplicação industrial de β -galactosidase tem estimulado diversos pesquisadores a desenvolverem técnicas mais rápidas, eficientes e com menores custos para sua purificação (ESTELA; FRANCO, 1999; KISHORE; KAYASTHA, 2012; SAAD, 2004). Estudos relatam diversas enzimas produzidas por diferentes espécies de fungos e outros microrganismos com ação de interesse biológico que já foram purificadas e caracterizadas. Com a melhoria no conhecimento de purificação de biomoléculas, novas possibilidades de processos industriais e aplicações na indústria vem surgindo (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Diversas técnicas de imobilização tem indicado ser uma ferramenta importante para a biotecnologia, pois proporcionam a biomolécula a capacidade de ser separada do meio de atuação, possibilitando assim a reutilização e produtos livres de contaminação (NERI et al., 2011). Lectinas são biomoléculas com elevado potencial biotecnológico, estimulando assim a busca por suportes para imobilização dessa proteína. A aplicação de suportes contendo lectinas imobilizadas podem ser aplicados para diversas finalidades como o isolamento de carboidratos e glicoproteínas de interesse biotecnológico, detecção de padrões de glicosilação de proteínas, ou até mesmo o estudo estrutural de glicoconjugados (ALVES; PAIVA, 2002).

Matrizes com finalidade de imobilização compostas por óxidos de ferro a qual apresentam estrutura “core/shell” estão entre os mais utilizados como suportes com propriedades magnéticas (DRBOHLAVOVA et al., 2009). “Core” trata-se do núcleo magnético da matriz e o desse núcleo é o que denomina “shell”. Magnetita é um dos materiais com tais propriedades que apresenta grande visibilidade pelas suas bioaplicações (TUCEK et al., 2006). As mais diversas metodologias foram desenvolvidas para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro, sendo a co-precipitação o procedimento mais simples e barato, a qual envolve a

precipitação simultânea de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso básico (KANG et al., 1996; QU et al., 1999).

O objetivo inicial deste trabalho foi o estudo da síntese de derivado imobilizado com propriedades magnéticas da lectina Concanavalina-A para ser aplicada no processo de purificação da β -galactosidase fermentada por *Penicillium islandicum* URM5073. Entretanto, outra possível aplicação para este derivado imobilizado também é direcionada com a purificação de outras glicoproteínas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUPORTE EMPREGADOS EM IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Para a obtenção de uma imobilização eficiente é imprescindível conhecer antecipadamente as características da biomolécula, da matriz e das possíveis interações entre eles. Se a interação da enzima com o suporte não for estável o bastante, pode vir a ocorrer, por exemplo, perda da biomolécula para o meio ao longo do processo. Ou ainda, se a afinidade da enzima com o suporte for maior do que com o substrato a eficiência do processo estará comprometida (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

O processo de imobilização de biomoléculas, principalmente proteínas, em matrizes insolúveis em água, comumente agrega maior estabilidade a molécula que em sua forma natural nativa. Diversas técnicas de imobilização tem indicado ser uma ferramenta importante para a biotecnologia, pois proporcionam a biomolécula a capacidade de ser separado do meio de atuação, possibilitando assim a reutilização e produtos livres de contaminação (NERI et al., 2011)

Os suportes sólidos podem ser classificados de diversas formas, tais como orgânicos e inorgânicos, e ainda levando em consideração a área superficial e tamanho de poros, pois são características que afetam consideravelmente a capacidade de ligação da biomolécula ao suporte (KLEIN, 2010)

Suportes não-porosos: De forma geral os tipos de suportes não-porosos apresentam mais desvantagens do que vantagens por baixa área superficial, portanto, limitando consideravelmente a área de imobilização. Para contornar essa limitação, pode-se trabalhar com partículas muito finas, entretanto confere outra desvantagem, por ser difícil sua separação do sistema e de não poder trabalhar em sistemas contínuos do tipo coluna, uma vez que não suportam altas pressões sem se compactar, em leitos fluidizados, pois está limitada a velocidade de fluxo (CAO, 2005; KLEIN, 2010).

Suportes porosos: Diferentemente dos não-porosos, apresentam uma grande área superficial por unidade de peso, aumentando a eficiência de

imobilização. A principal desvantagem é que a maior área disponível é a interna e por isso aumenta os problemas de difusão. Para superar tais problemas, existem suportes de poros controlado de forma que é possível selecionar o suporte mais adequado de acordo com o tamanho da enzima, substrato e produto. De modo geral, os poros de determinado suporte devem ser da mesma ordem de grandeza da enzima ou maior, para que a mobilidade da enzima não seja significativamente diminuída (CAO, 2005; KATCHALSKI-KATZIR, 1993)

2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO

Magnetita (Fe_3O_4) é um dos minérios de ferro responsável pelas propriedades magnéticas das rochas, porém alguns organismos desenvolvem esse mineral para auxiliar na orientação geográfica. É um material ferrimagnético contendo ferro com estado de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} e sua estrutura é do tipo espinélio inverso (CORNELL; SCHWERTMANN, 2006)

A estrutura da magnetita Fe_3O_4 é formada por 32 íons de O^{2-} regularmente organizados formando uma célula unitária cúbica compacta de face centrada. Na estrutura espinélio inversa os 8 sítios tetraédricos são ocupados por Fe^{3+} e os 16 sítios octaédricos são ocupados por íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (CORNELL; SCHWERTMANN, 2006)

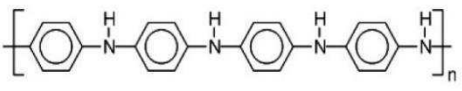
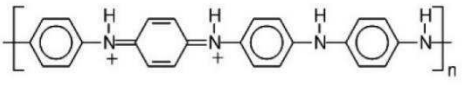
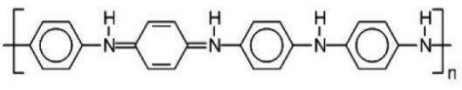
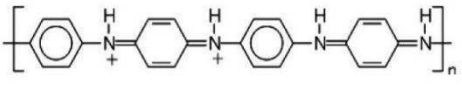
A principal diferença do Fe_3O_4 em relação aos demais óxidos de ferro é a presença de ferro com diferentes valências Fe^{2+} e Fe^{3+} . O Fe_3O_4 geralmente apresenta vacâncias, não apresentando estequiometria, e sua rigorosa formulação $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$ é reduzida para Fe_3O_4 . O óxido é ferrimagnético à temperatura ambiente e paramagnético acima de 577°C . Os dois íons de ferro Fe^{2+} Fe^{3+} ocupando os sítios octaédrico e tetraédrico formam a base de duas redes magnéticas interpenetradas (O'HANDLEY, 2000)

Diversos métodos têm sido utilizados para a produção de nanopartículas magnéticas, como o método de sonicação, pirólise e sol-gel, técnica hidrotermal, decomposição térmica redutiva e liga mecânica. No entanto, o método de co-precipitação é o mais difundido e de baixo custo, devido à sua simplicidade e eficiência química para a preparação de vários materiais sólidos (JARAMILLO-TABARES; ISAZA; DE TORRESI, 2012)

A presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH, sobre a superfície de nanopartículas magnéticas pode permitir ligações a compostos funcionais (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). O tratamento, por exemplo, com aminopropiltrietoxissilano –APTS, conduz a um revestimento de silicato que ajuda a estabilizar as nanopartículas magnéticas contra oxidação pelo ar. E os grupos amina são importantes para evitar a agregação das nanopartículas (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; YUAN et al., 2009)

Também é possível funcionalizar as nanopartículas magnéticas utilizando o polímero polianilina (PANI). A polianilina apresenta características como condutividade, eletrocromicas e trocas iônicas, elevada estabilidade e é obtida a partir da anilina, monômero de baixo custo (AMADO et al., 2008). Diferentes formas de PANI podem ser distinguidas de acordo com os estados de oxidação e de dopagem do polímero (tabela 1), dos quais a forma esmeraldina, 50% oxidada, é a mais estável, que reage com ácidos protônicos resultando na forma condutora da polianilina, sal de esmeraldina (FAEZ et al., 2000).

Tabela 1: Estados de oxidação da Polianilina.

Estado de oxidação	Estrutura	Cor*	Característica
Leucoesmeraldina		amarela 310	isolante completamente reduzida
Sal de esmeraldina		verde 320, 420, 800	condutora parcialmente oxidada
Base esmeraldina		azul 320, 620	isolante parcialmente oxidada
Pernigranilina		púrpura 320, 530	isolante completamente oxidada

* Os valores numéricos referem-se ao comprimento de onda (em nanômetros) onde a absorção é máxima.

Fonte: (FAEZ et al., 2000)

2.3 LECTINAS

Do grego *legere*, lectina determina uma classe de proteínas, de origem não imunológica, que são capazes de se ligarem especificamente não covalentemente e reversivelmente a carboidratos (Kishore; Eggleton; Reid, 1997). Essas ligações podem ocorrer por meio de pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas ou ligações hidrofóbicas. Elas são expressas de forma ubíqua na natureza, estando presentes em bactérias, plantas e mamíferos (SHARON; LIS, 2004)

A primeira descrição de hemaglutininas foi feita por Stillmark (1988), em sua tese de doutorado. Em 1936, Summer e Howell relataram que uma proteína, denominada Concanavalin-A (Con-A), isolada duas décadas antes de forma pura por Summer, tinha capacidade de aglutinar eritrócitos e leveduras, e de precipitar glicogênio. Eles também demonstraram que essa capacidade era interrompida na presença de sacarose, demonstrando então pela primeira vez a especificidade dessas moléculas. Porém, só em 1954, Boyd sugeriu o termo lectina para estas proteínas, que foi generalizada para agrupar todas as aglutininas açúcar específicas de origem não imune, independente da origem (GUO et al., 2008)

Nas últimas décadas, o interesse pelo estudo das lectinas vem aumentando, pois elas têm sido importantes ferramentas para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007; SADIK; YAN, 2007) e na análise de superfícies celulares a fim de avaliar as mudanças que ocorrem na expressão dos carboidratos, durante a embriogênese, crescimento e doença (DE MELO-JUNIOR et al., 2011; LEAL et al., 2012; SOBRAL et al., 2010)

2.4 ENZIMAS

Enzimas, tais como proteases, carboidrases, lipases, lisozimas e oxidoredutases são proteínas globulares que são amplamente utilizadas na indústria alimentar devido à sua excelente atividade catalítica (CAO et al., 2012). São produzidas por processos metabólicos de organismos vivos e apresentam a função de catalisar reações bioquímicas necessárias para a sobrevivência dos mesmos (OLEMPSKA-BEER et al., 2006).

A grande vantagem da aplicação de enzimas nas indústrias é a sua elevada especificidade de reação catalítica com determinado substrato, com a obtenção de produtos bem conhecidos (WHITAKER, 1993). A atividade catalítica enzimática ocorre por meio da formação do complexo enzima-substrato que incide de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, e futura dissociação, com a liberação do produto e da enzima em sua forma nativa (ARTIGIANI; TRIBST, 2012).

Enzimas são produzidas em todos os organismos vivos, entretanto, apenas 8% da produção de enzimas comerciais provêm da extração de animais e 4% de plantas, sendo os 88% restantes obtidas a partir de fermentação por microrganismos (SOARES; TÁVORA, 2012). A diferença pela preferência da utilização de enzimas fermentadas por microrganismos é explicada pelos seguintes fatores (OLEMPSKA-BEER et al., 2006; SOARES; TÁVORA, 2012):

1. Baixo custo de produção;
2. Maior facilidade no controle do processo;
3. Utilização de matérias-primas de composição constante;
4. Atividade constante, não sendo afetada pelos efeitos sazonais do clima e disponibilidade de alimentos (como é o caso das enzimas animais e vegetais);
5. Opções de enzimas com estabilidades variadas em diferentes condições no processo de fermentação (pH, temperatura, concentração de substrato).

As enzimas são aplicadas industrialmente no processo de produção de diversos alimentos como leites, queijos, gorduras, produtos de panificação, cerveja e outros alimentos fermentados, sucos e outros produtos à base de frutas, rações, farinhas e gelatinas (FERNANDES, 2010; PANKE; WUBBOLTS, 2002; SCHMID et al., 2001). Além disso, podem ser utilizadas na fabricação de papel, de couro e no tratamento de águas residuais (HAKI; RAKSHIT, 2003), nas áreas médica, farmacêutica, e nas indústrias têxtil e de detergentes (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). Em relação ao mercado mundial a demanda de venda enzimas deverá ter um aumento de 6,3% anual com perspectiva de movimentar 7 bilhões de dólares em 2017 (FREEDONIA, 2014). Exemplos de enzimas comerciais importantes e com grande aplicação na área de alimentos são: proteases, α -amilase, amiloglicosidase, glicose oxidase e β -galactosidase.

Enzimas aplicadas nas indústrias são uma alternativa de substituição em algumas reações químicas e apresentam as vantagens de serem específicas, não oferecerem toxicidade, elevada eficiência catalítica e baixo custo energético, utilizarem condições mais brandas (pH, temperatura) e serem de maior facilidade de controle (FERNANDES, 2010; GROSOVÁ, 2003). Em contrapartida, a aplicação de enzimas em escala industrial apresenta dois principais obstáculos:

1. Elevado custo (Valor esse agregado muitas vezes pelo processo de purificação do biocatalisador)
2. Baixa estabilidade em condições de processos que utilizam altas temperaturas, altas concentrações salinas, variação de pH, presença de surfactante e alta concentração de substrato.

2.5 β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) conhecida como lactase ou β -D-galactosídeo galactohidrolase, pertence ao grupo das enzimas hidrolíticas. Seu papel fisiológico é a hidrólise de β -galactosídeos redutores de oligossacarídeos, polissacarídeos ramificados como galactomananas e da fração polissacarídica de glicoproteínas (HUSAIN, 2010; PRIETO et al., 2014).

O interesse pelo uso da β -galactosidase existe por motivos de suas funções biológicas, bem como o interesse pelo seu uso rotineiro em diagnóstico molecular, como marcador gênico (METTENLEITER; RAUH, 1990), como modelo de estudos de catálise enzimática (WEI et al., 2013) e de evolução molecular (FIGUEIREDO; LASHERMES; ARAGÃO, 2011), sendo também sua elevada aplicação na tecnologia de alimentos como a industrialização de laticínios e seus derivados (VIEIRA et al., 2013) e o tratamento de efluentes (ROSENBERG, 2006).

A enzima β -galactosidase é o produto da expressão do gene LacZ em *Escherichia coli*, podendo ser purificada de diversas fontes vegetais e microbianas, todas com elevada homologia nas sequências primárias (JUERS; MATTHEWS; HUBER, 2012; PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012). Enzimas de fonte microbiana representam cerca de 88% das enzimas comercializadas, devido à conformidade de cultivo e aplicação em escala industrial (BUDRIENE et al., 2005; SOARES; TÁVORA, 2012). As principais enzimas industriais são

obtidas a partir de *Aspergillus sp.* e *Kluyveromyces sp.* (HUSAIN, 2010; ZHOU; CHEN, 2001a).

Segundo ZHOU e CHEN (2001) o mecanismo da hidrólise da lactose foi descrita pela primeira vez por Wallenfels et al. (1960), que utilizou a β -galactosidase proveniente de *Escherichia coli*.

Em condições específicas de processamento, β -galactosidases são capazes de catalisar reações de transgalactosilação para formação de galactooligossacarídeos (GOS), carboidratos considerados prebióticos e que apresentam propriedades tecnológicas e nutricionais de grande importância (KLEIN et al., 2013; PALAI; BHATTACHARYA, 2013).

β -galactosidase pode ser extraída através de diferentes fontes como os microrganismos, plantas e animais, cada uma apresentando propriedades diferentes de acordo com sua origem (BUDRIENE et al., 2005). A escolha da fonte da β -galactosidase é de grande importância, pois determinará suas propriedades e suas aplicações (GROSOVÁ, 2003). A obtenção de enzimas de fonte microbiana possui diversas vantagens frente às demais fontes, como a facilidade de manuseio, alta taxa de multiplicação e rendimentos elevados (HUSAIN, 2010). A Tabela 2 resume as principais fontes microbianas de β -galactosidase e suas respectivas propriedades.

As leveduras são fontes de β -galactosidase importantes no ponto de vista industrial. Apresentam ótimas atividades em pH neutro, facilitando sua aplicação na hidrólise de lactose em leites e seus derivados, sendo amplamente aplicadas para a indústria de alimentos (HUSAIN, 2010).

β -galactosidase fúngicas são comumente aplicadas para a hidrólise do soro ácido por apresentarem ótimas atividades em pH inferior a 6,0, porém apresentam uma maior sensibilidade à inibição ocasionada pelos produtos da reação, principalmente galactose (FREITAS et al., 2011).

O uso de β -galactosidase na hidrólise da lactose do leite e em seus derivados pode proporcionar diversos benefícios, como aliviar os sintomas de intolerantes à lactose, promover tecnologias de processos industriais minimizando ou eliminando problemas relacionados com a baixa solubilidade de baixo teor de açúcar da lactose. Além disso, a hidrólise da lactose agrega valor ao

soro de queijo, o qual o descarte inadequado ocasiona graves problemas ambientais (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010)

Tabela 2: Características bioquímicas de β -galactosidases fermentadas por microrganismos.

Fontes	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molar (kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 - 4,0	55 – 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 - 7,6	35	135
<i>Echerichia coli</i>	7,2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 - 65	
<i>Bacillus sp.</i>	6,8	65	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 - 45	
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 - 7,1	55 – 57	530
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 - 7,5	55	500
<i>Mucor pusillus</i>	4,5 - 6,0	60	
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 - 5,5	80	570

Fonte: (MORTOZA, 2012)

Existem duas abordagens para a aplicação industrial da β -galactosidase: O uso em solução da enzima livre ou imobilizada em suportes. Apesar da aplicação da enzima na forma livre seja tecnicamente simples, o custo do processo se torna elevado pela limitação na reutilização da biomolécula (FISCHER et al., 2013)

A aplicação enzimática para a hidrólise da lactose é um importante processo biotecnológico, estendendo seus benefícios e vantagens em três principais eixos: meio-ambiente, saúde e tecnologia de alimentos (DOMINGUES; LIMA; TEIXEIRA, 2005; GROSOVÁ, 2003; GROSOVÁ et al., 2008)

2.5.1 Estrutura da β -galactosidase

A β -galactosidase de *Escherichia coli* é uma das mais conhecidas em nível de caracterização estrutural cristalina e molecular, mecanismo de reação e controle genético, contudo, não é recomendável para o uso em processos na indústria de alimentos devido sua fonte (JUERS; MATTHEWS; HUBER, 2012)

A estrutura cristalina da β -galactosidase sugere um tetrâmero com simetria pontual 222 com dimensões de 175x135x90Å ao longo dos eixos de ordem 2. Consiste de quatro subunidades idênticas do tipo α_4 (Figura 1), os monômeros são compostos de cinco domínios e 50 resíduos adicionais no N-terminal. A participação desse segmento aminoterminal no estabelecimento da interface entre duas subunidades está de acordo com a observação de que cada monômero ativo é formado por elementos de duas subunidades diferentes. Esse fenômeno é conhecido como α -complementação (ADALBERTO, 2005).

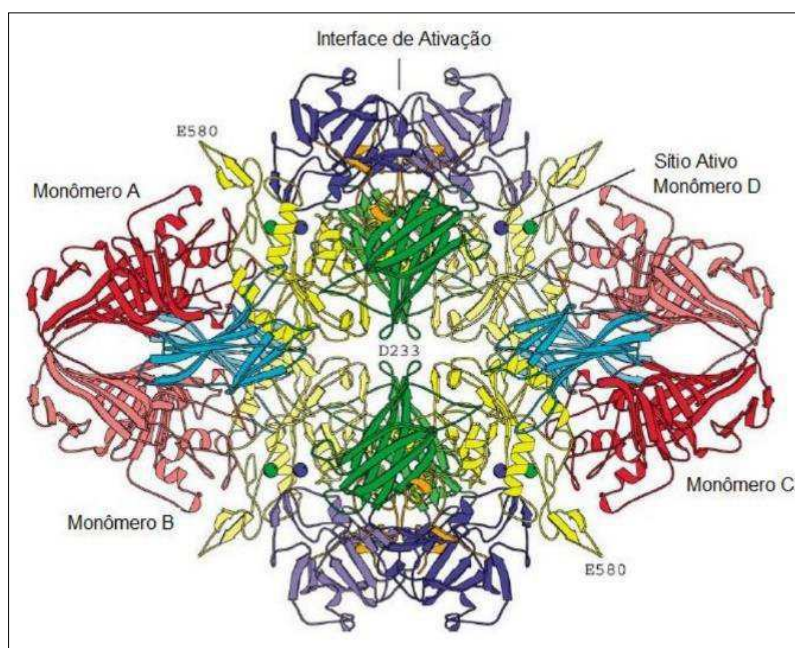


Figura 1: Representação do tetrâmero da β -galactosidase. As tonalidades mais claras e mais escuras de uma determinada cor são usadas para distinguir o mesmo domínio em diferentes subunidades. Os cátions de metal em cada um dos sítios ativos são mostrados como esferas, Na^+ verde e Mg^{++} azul. Fonte: (ADALBERTO, 2005).

O primeiro domínio corresponde a um barril de folhas β adelgado. O segundo e quarto domínios apresentam uma conformação fibronectina-III típica e responsável pelo reconhecimento e pelo estabelecimento da interface com o monômero vizinho. No terceiro domínio encontra-se o sítio catalítico e o metal divalente coordenado (KONG et al., 1992).

2.5.2 Purificação de β -galactosidase

O estímulo dado pela aplicação tecnológica da β -galactosidase levou vários laboratórios a estudarem e desenvolverem diversas estratégias para sua purificação. Enzimas de uso comercial necessitam alto grau de pureza. Enzimas quiméricas objetivando uma purificação mais rápida, eficiente e com menores custos, são disponíveis (ESTELA; FRANCO, 1999; KISHORE; KAYASTHA, 2012; SAAD, 2004).

Liu et al. (2012) estabeleceram a metodologia de purificação em uma única etapa a qual procede-se por fusão com elastina e polipetídeos. A técnica de ciclos térmicos e centrifugação foi repetida até alcançar a purificação da proteína de 95% determinada por SDS-PAGE.

A cromatografia de um novo tipo de enzima exige exaustivo esforço para selecionar as melhores colunas para interações entre as matrizes das fases estacionárias e a proteína. Após essas determinações é que são possíveis as construções de protocolos para a obtenção da enzima pura (ADALBERTO, 2005; SOARES; TÁVORA, 2012).

3 OBJETIVOS

Geral

Imobilizar covalentemente concanavalina-A a nanopartículas magnéticas para purificação da β -galactosidase de *Penicillium islandicum* URM5073.

Específicos

- Imobilizar covalentemente concanavalina-A em magnetita-PANI;
- Estudar os fatores que influenciam a imobilização da concanavalina-A em magnetita-PANI;
- Desenvolver metodologia para purificação de β -galactosidase de *Penicillium islandicum* URM5073 utilizando concanavalina-A imobilizada covalentemente a magnetita-PANI;
- Testar metodologia de purificação com β -galactosidase de fontes alternativas;

REFERÊNCIAS

ADALBERTO, P. Produção, Isolamento e Caracterização de β -galactosidases de *Trichoderma reesei*: Interação de Íons Metálicos na Atividade Enzimática. **Araraquara: Universidade Estadual Paulista**, 2005.

ALVES, C. Z. G. P.; PAIVA, M. Isolamento, caracterização parcial e imobilização da lectina de pericarpo de *Punica granatum* L. em dracon magnetizado. 2002.

AMADO, F. D. R. et al. Estudo da obtenção através de síntese eletroquímica de poliaminonaftalenos e poliaminoantracenos. **Polímeros**, v. 18, p. 244–248, 2008.

ARTIGIANI, A.; TRIBST, L. Effects of high pressure homogenization in the activity and stability of commercial enzymes “ efeito da homogeneização à alta pressão na atividade e estabilidade de enzimas comerciais .” 2012.

BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens* . Properties and immobilization. v. 3, n. 1, p. 95–105, 2005.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 2, p. 217–26, abr. 2005.

CAO, M. et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 27, n. 1, p. 47–56, 2012.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.

DE MELO-JUNIOR, M. R. et al. Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 6, p. 403–409, jun. 2011.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1151–1154, mar. 2005.

ESTELA, M.; FRANCO, T. T. PURIFICATION OF MICROBIAL β - GALACTOSIDASE FROM *KLUYVEROMYCES FRAGILIS* BY BIOAFFINITY PARTITIONING. n. 9, 1999.

FAEZ, R. et al. Polímeros Condutores. **Química nova na escola**, v. 11, p. 13–18, 2000.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme research**, v. 2010, p. 862537, 2010.

FIGUEIREDO, S. A.; LASHERMES, P.; ARAGÃO, F. J. L. Molecular characterization and functional analysis of the β -galactosidase gene during *Coffea arabica* (L.) fruit development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 8, p. 2691–703, maio 2011.

FISCHER, J. et al. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 178–186, jan. 2013.

FREITAS, F. F. et al. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33–38, dez. 2011.

GROSOVÁ, Z. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Journal Food Science**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2003.

GROSOVÁ, Z. et al. Entrapment of beta-galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 4, p. 763–7, abr. 2008.

GUO, H. B. et al. Loss of expression of N-acetylglucosaminyltransferase Va results in altered gene expression of glycosyltransferases and galectins. **FEBS Letters**, v. 582, n. 4, p. 527–535, 2008.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17–34, 2003.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41–62, mar. 2010.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019–1032, 2008.

JARAMILLO-TABARES, B. E.; ISAZA, F. J.; DE TORRESI, S. I. C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, n. 2-3, p. 529–533, 2012.

JUERS, D. H.; MATTHEWS, B. W.; HUBER, R. E. LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 21, n. 12, p. 1792–807, dez. 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. November, p. 471–478, 1993.

KISHORE, D.; KAYASTHA, A. M. A β -galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) seeds: its purification, biochemical properties and industrial applications. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1113–22, 15 set. 2012.

KLEIN, M. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. 2010.

KLEIN, M. P. et al. High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–70, 5 jun. 2013.

KONG, X. P. et al. Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. **Cell**, v. 69, p. 425–437, 1992.

LEAL, A. F. G. et al. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical mycology**, v. 50, n. 7, p. 756–759, out. 2012.

METTENLEITER, T.; RAUH, I. A glycoprotein gX- β -galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants. **Journal of virological methods**, v. 30, 1990.

MONZO, A.; BONN, G.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 423–432, 2007.

MORTOZA, A. Produção e purificação de beta-galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo. 2012.

NERI, D. F. M. et al. Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 3, p. 172–178, mar. 2011.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 71–92, jan. 2013.

O'HANDLEY, R. C. **Modern magnetic materials: principles and applications**. [s.l.] Wiley New York, 2000. v. 830622677

OLEMPSKA-BEER, Z. S. et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144–158, 2006.

PALAI, T.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 668–73, jun. 2013.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme research**, v. 2010, p. 473137, jan. 2010.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M. G. Enzyme technology and bioprocess engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 111–116, 2002.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A. et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Journal of structural biology**, v. 177, n. 2, p. 392–401, fev. 2012.

PRIETO, L. M. et al. Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1–4, dez. 2014.

ROSENBERG, Z. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 2, p. 47–54, 2006.

SAAD, R. R. Purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus japonicus*. v. 54, n. 3, p. 299–306, 2004.

SADIK, O. A.; YAN, F. Electrochemical biosensors for monitoring the recognition of glycoprotein-lectin interactions. **Analytica chimica acta**, v. 588, n. 2, p. 292–296, abr. 2007.

SCHMID, A et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. January, p. 258–268, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, nov. 2004.

SOARES, I.; TÁVORA, Z. Enzymes in the Food Industry. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**, v. 184, p. 1366–1367, 2012.

SOBRAL, A. P. V et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral science**, v. 52, n. 1, p. 49–54, 2010.

VIEIRA, D. C. et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54–64, dez. 2013.

WEI, W. et al. Synthesis and characterisation of galactosyl glycerol by β -galactosidase catalysed reverse hydrolysis of galactose and glycerol. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3085–92, 1 dez. 2013.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. [s.l.] CRC Press, 1993. v. 61

YU, S.-Q.; LIU, Y.-H. Expression and one-step purification of a β -galactosidase by fusion with elastin-like polypeptides. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1108–1114, jul. 2012.

YUAN, P. et al. Montmorillonite-supported magnetite nanoparticles for the removal of hexavalent chromium [Cr(VI)] from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 821–829, 2009.

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

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

APÊNDICE A - ARTIGO

PURIFICATION OF β -GALACTOSIDASE BY *PENICILLIUM ISLANDICUM* URM5073 THROUGH CONCAVALIN-A IMMOBILIZED ON MAGNETIC NANOPARTICLES

Thiago V C FIRMINO, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Maria Carolina A Wandderley, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Mariana P Cabrera, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Pabyton G Cadena, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Luiz B C Junior, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil Phone: +55 81 21268484, Fax: +55 81 21268485, e-mail: lbcj@hotmail.com.br

Keywords: concanavalin-A, magnetic nanoparticles, β -galactosidase, purification, *penicillium islandicum*

1. Introduction

A challenge in the biotechnology industry is the purification of a desired protein from a fermentation broth containing a wide variety of biomolecules (Naganagouda and Mulimani 2008). Purification of this enzyme has been carried out by a variety of methods including traditional methods such as salting out, acid fractionation, aqueous two-phase partitioning, ammonium sulphate precipitation and different chromatographic assays (Choonia and Lele 2013). These methods are time consuming, involve expensive reagents and need various equipment (Duman and Kaya 2013).

Large-scale purification of β -galactosidases is still recognized as an economical and technical bottleneck in their industrial production. Although affinity chromatography is considered powerful techniques for purifying recombinant proteins, its limitations in industrial scale purification is still quite severe. Hence, a simple, rapid and cost-effective purification procedure is needed to overcome these problems (Yu and Liu 2012). Thereby, this work has aimed to immobilize covalently concanavalin-A (Con A) onto nanoparticles magnetic to purification β -galactosidase of *Penicillium islandicum* URM5073.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism culture and β -galactosidases fermentation

The *Penicillium islandicum* URM5073 was obtained from the culture collection of Mycoteca University Recife Mycology (URM), Department of Mycology of Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil. The strain was maintained at 4°C on agar Czapek until inoculum tube spores production.

Inoculum spores were produced in tube containing malt extract agar medium consisting of 0.5% (w/v) malt extract, 0.1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) glucose, and 1.5% (w/v) agar. Inoculum spores were produced in agar plates containing a culture of cells grown for 5 days at 30°C and suspended in a 3 mL of 0.9% (w/v) NaCl with 0.01% (v/v) Tween 80 solution previously sterilized at 121°C for 20 min. All the fermentations were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the culture medium inoculated with 10^6 spores mL^{-1} . The modified Czapek culture medium with lactose 1% (w/v) containing KH_2PO_4 0,2% g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,12 g L^{-1} ; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0,03 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g L^{-1} ; CaCl_2 0,03 g L^{-1} ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,156 mg L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,14 mg L^{-1} ; CoCl_2 0,14 mg L^{-1} ; peptone 0,5%. The pH was adjusted to 4.7 by addition of HCL 0,1 M. The cultivation carried in a shaker at 120 rpm for 6 days at 30°C. The medium culture was filtered and the supernatant used as enzymatic crude extract for purification.

2.2. β -Galactosidase activity assay

β -galactosidase activity was measured using o-NPG (o-nitrophenil- β -D-galactopyranoside); Sigma-Aldrich Co., Brazil; as an artificial substrate for determination of enzyme activity, a system of 1 mL containing 500 μL of 10 mM o-NPG prepared in buffer citrate-phosphate pH 4.5 and 500 μL of extract containing β -Galactosidase, incubated for 10 minutes at 37°C. After the reaction time 500 μL of mixture was taken aback and added 500 μL of 0.1 M sodium tetraborate. Absorbance was registered at 420 nm. One β -galactosidase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of o-nitrophenol (o-NP) per min under reaction condition. The enzyme activity was

determined according to Dwevedi and Kayadtha method using o-NP (Sigma-Aldrich Co. (Brazil)) as standard. The protein concentration was determined according to Lowry et al. 1951 using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co. (Brazil)) as standard.

2.3. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and coating process

Solutions of 1.1 M FeCl₃ .6H₂O (5 mL) and of 0.6 M FeCl₂ .4H₂O (5 mL) were added to 50 mL of distilled water, under magnetic agitation, and 5.0 M NaOH was added dropwise up to pH 10 when black particles precipitate were produced. The mixture was heated at 50°C for 30 min with vigorous stirring. The magnetic nanoparticles were thoroughly washed with distilled water until pH was neutral. The material was dried up and kept at 25°C.

The oxidative polymerization of aniline was carried out in the presence of 0,5g magnetic nanoparticles by treated with 0.1 M KMnO₄ (50mL) solution for 1 hour at 25°C and washed with distilled water, after that immersed into 0.5 M aniline solution prepared in 1 M HNO₃. The oxidative chemical polymerization of aniline was allowed to occur for 1 hour at 4°C and after that the magnetic nanoparticles coated with polyaniline (mPANI) were successively washed with distilled water, 0.1 M citric acid and rewashed with distilled water, and finally the material was dried up at 50°C overnight and kept at 25°C.

2.4. Hemagglutination assay

The hemagglutination activity was performed in order to assess the ability of the lectin to recognize carbohydrates. Lectin sample solutions (50 µL) were serially diluted in 0.15M NaCl, in microtiter U-plates and incubated with of a 2.5%

(v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes (50 μ L). The titer, defined as the lowest sample dilution which showed hemagglutination, was established after 45 minutes incubation according to (Correia and Coelho 1995)

2.5. Determination of the better conditions for Concanavalin-A immobilization

To determinate of the best condition for Con A immobilization onto magnetic nanoparticle were selected the variables that can influence employing a 2^{6-2} fractional factorial statistical ANOVA design with a total of 16 runs, employed to verify the effects and interactions of the measure of support, glutaraldehyde concentration (%), time of reaction with glutaraldehyde (hours), lectin protein concentration (μ g), potential hydrogen and the protein covalent coupling (hours). The response was the lectin protein immobilized. Magnetite nanoparticles were treated with glutaraldehyde under continuous homogenization at 25°C. After activation magnetite nanoparticles were successively washed with distilled water 5 times and 5 times with PBS 0.01M pH 7.2 buffer. After the process, Con A was subjected to the immobilization on magnetic support. The supernatant was collected and support were washed with 1M NaCl to occur desorption of the adsorbed lectins on support. Thus, it was made a glycine incubation 0.1 M for 30 minutes to deactivate the free glutaraldehyde lectin. The difference between the offered and that estimated in the washing solutions estimated the immobilized protein.

Table 1 presents the independent variables and levels evaluated under are given. For statistical analyzes was used the software STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc. 2007). P-values < 0.05 were considered statistically significant.

LEVES	-1	1
Support (mg)	50	150
Glutaraldehyde concentration (%)	1,5	3,5
Reaction with glutaraldehyde (h)	1	3
Protein concentration (ug)	100	300
pH	6	8
Protein covalent coupling (h)	1	3

2.6. Determination of the better conditions for β -galactosidase purification

To determinate of the best conditions for β -galactosidase purification onto magnetic nanoparticle were selected the variables that can influence employing a 2^{6-2} fractional factorial statistical ANOVA design with a total of 16 runs, employed to verify the effects and interactions of the measure of support, glutaraldehyde concentration (%), time of reaction with glutaraldehyde (hours), lectin protein concentration (μg), potential hydrogen (pH) and the protein covalent coupling (hours). The response was the β -galactosidase (from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich)) retained on lectin.

2.7. β -galactosidase purification

To evaluate the efficiency of the purification method with Con A immobilized onto a magnetic support was used three solutions containing β -galactosidase: enzyme from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich), the fermented crude extract by

Penicillium islandicum and the commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) contaminated with casein (Sigma-Aldrich) and albumin (Sigma-Aldrich). The solutions containing β -galactosidase were incubated with conjugated to lectina-magnetite Polianiline (mPANI) for 3 hours. After each incubation period the supernatants were collected and the samples were subjected to three washes with 0.1 M NaCl were then made fifteen washes with 0.3 M glucose solution for separating the affinity between the immobilized glycoprotein and lectin. To complete the process were carried out five washes with 1 M NaCl. All supernatants were assayed for protein by the method of Lowry et al. 1951. The experiment was conducted in triplicate.

2.8. Electrophoretic analysis

Electrophoresis of six samples solution containing β -galactosidase was performed according to the method described by Laemmli (1970). Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was conducted 15% acrylamide gel slabs. The proteins were stained with Coomassie brilliant blue G-250 in SDS–PAGE. The molecular weight standard used was the broad molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis NuPAGE® NOVEX®. The electrophoresis followed under the following conditions: 15 mA constant current for 150 min.

3. Results

3.1. Concanalavin-A immobilization

The Con A immobilization was studied using a 2^{6-2} factorial design for analysis of the main variables that affects the process. The table 2 shows the effect of the

independent parameters (amount of support, glutaraldehyde concentration, reaction with glutaraldehyde, protein concentration, pH and protein covalent coupling) on response (immobilized Con A).

Table 2 Matrix of the 2^{6-2} factorial design

RUN	Support (mg)	Glutaraldehyde concentration (%)	Reaction with glutaraldehyde (h)	Protein concentration (ug)	pH	Protein covalent coupling (h)	Immobilized protein ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	-	-	-	-	-	-	178,1
2	+	-	-	-	+	-	173,3
3	-	+	-	-	+	+	111,4
4	+	+	-	-	-	+	155,2
5	-	-	+	-	+	+	78,1
6	+	-	+	-	-	+	110,5
7	-	+	+	-	-	-	119,0
8	+	+	+	-	+	-	3,8
9	-	-	-	+	-	+	289,5
10	+	-	-	+	+	+	295,2
11	-	+	-	+	+	-	144,8
12	+	+	-	+	-	-	490,5
13	-	-	+	+	+	-	140,0
14	+	-	+	+	-	-	455,2
15	-	+	+	+	-	+	235,2
16	+	+	+	+	+	+	71,4

The maximum immobilization response within the set range of variables were determined: amount of support 150 mg, glutaraldehyde concentration 3.5%,

protein concentration $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, glutaraldehyde reaction time 1 h, pH 6 and protein covalent coupling 1 h.

The responses of the factorial design was the lectin immobilized and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) retained on lectin. The Pareto chart (Figura 1A) represents the estimated effects of variables on response. The length of each bar is proportional to the standardized effect. The vertical dashed line determines which effects are statistically significant and bars extending beyond this line correspond to the effects statistically significant at a confidence level of 95%. According to Pareto chart two variables have statistically significant effect on response: protein concentration (positive effect) and pH (negative effect). This suggest that an increase in amount of protein value and pH reduction would improve immobilization process.

The maximum immobilization response within the set range of variables were determined: amount of support 150 mg, glutaraldehyde concentration 3.5%, protein concentration $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, glutaraldehyde reaction time 1 h, pH 6 and protein covalent coupling 1 h.

The responses of the factorial design was the lectin immobilized and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) retained on lectin. The Pareto chart (Figura 1A) represents the estimated effects of variables on response. The length of each bar is proportional to the standardized effect. The vertical dashed line determines which effects are statistically significant and bars extending beyond this line correspond to the effects statistically significant at a confidence level of 95%. According to Pareto chart two variables have statistically significant effect on response: protein concentration (positive effect) and pH

(negative effect). This suggest that an increase in amount of protein value and pH reduction would improve immobilization process.

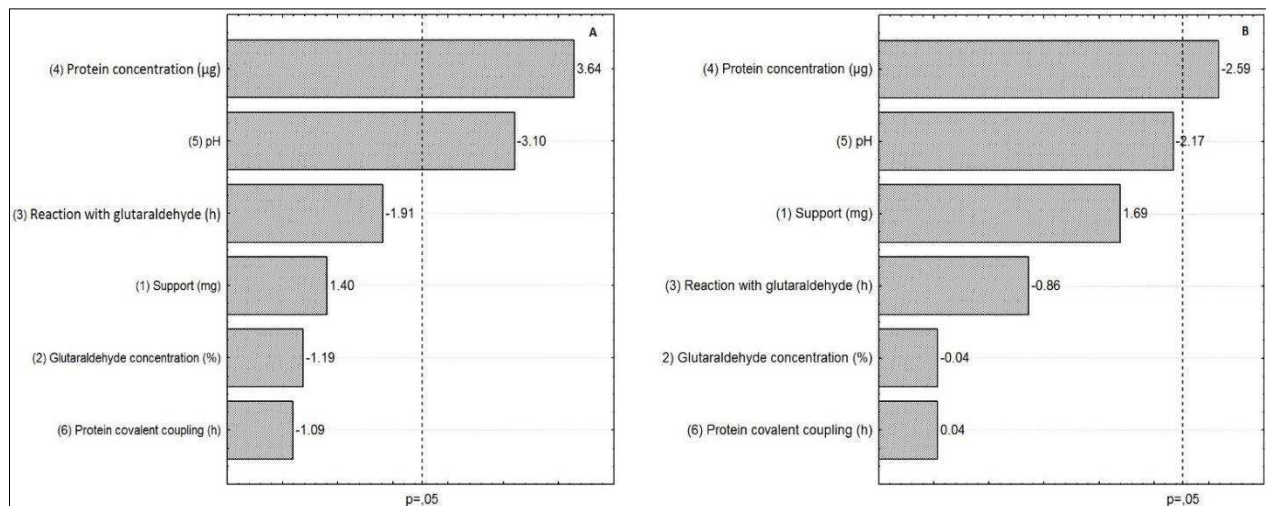


Figure 1 Results of 2^{6-2} factorial design (A) Pareto chart for the effects of variables Concanavalin-A immobilization (B) Pareto chart for the effects of variables β -galactosidase retained on lectin immobilized.

3.2. β -galactosidase purification

The figure 2 shows the amount of glycoprotein recovered during the purification of β -galactosidase produced by *Penicillium islandicum*, commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and β -galactosidase contaminated with commercial casein and albumin. It can be observed that all elution profiles showed protein peak around 6th fraction, when the 0.3 M glucose was added to the medium.

As seen in figure 3A, electrophoresis of crude extract and commercial β -galactosidase have more bands than purified enzyme. These bands presented molecular mass of 6 to 100 Kda, approximately. The crude extract proteins eluted from nanoparticles nanoparticles coated with PANI containing immobilized Con

A migrated in SDS-PAGE and revealed a single protein band with an apparent molecular mass of 100 KDa (Figure 3D).

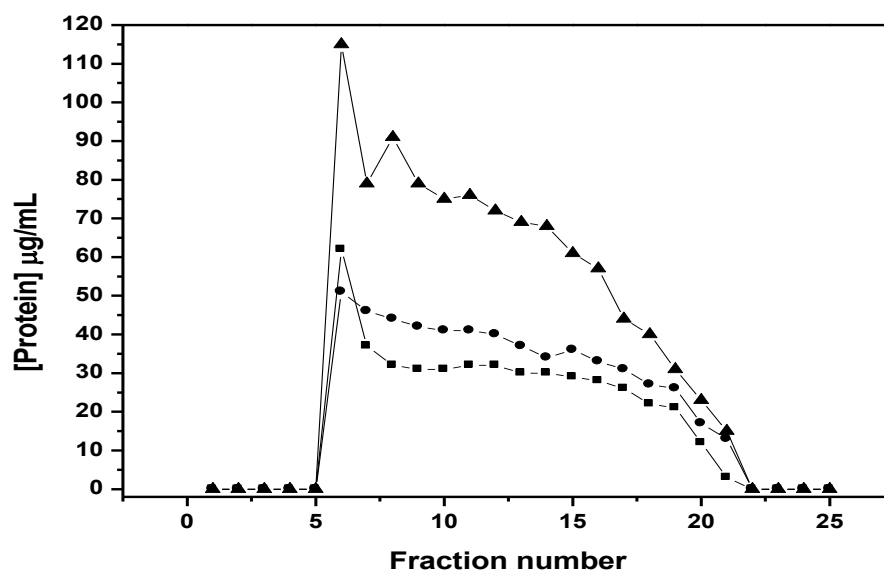


Figure 2. Crude extract (■), commercial β-galactosidase (●) and commercial β-galactosidase contaminated (▲) purification profile using Con A immobilized on nanoparticles coated with PANI. Elution was carried out with NaCl (0.1 M and 1 M) and 0.3 M glucose.

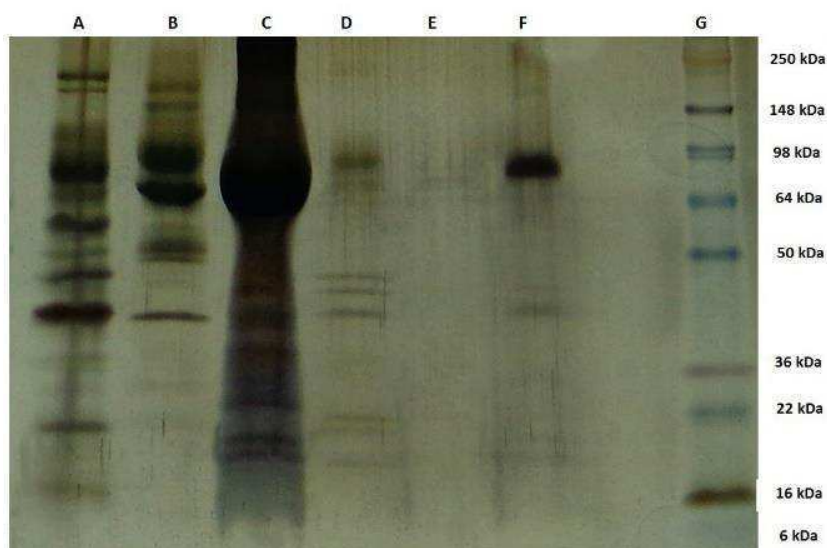


Figure 3. SDS-PAGE (A) Crude extract (B) Commercial β-galactosidase (C) Commercial β-galactosidase contaminated (D) Crude extract purified (E) Commercial β-galactosidase purified (F) Commercial β-galactosidase contaminated purified

The table 2 illustrates the efficiency of the purification process. β -galactosidase fermented by *Penicillium islandicum* URM5073 presented a specific activity of 0.536 U mg⁻¹ in its crude extract and after the purification process the activity improved to 3.234 U mg⁻¹. After removal of excipientes and of contaminating proteins (albumin and casein) , the specific activity of comercial enzyme from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) was also increased from 5.910 U mg⁻¹ to 13.793 U mg⁻¹ and from 0,002 U mg⁻¹ to 33,723 U mg⁻¹, respectively.

Table 3 β -galactosidase specific activity^a

^a Available data were converted to $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

4. Discussion

Samples	Enzyme specific activity (U mg ⁻¹)
crude extract	0.536
crude extract purified	3.234
commercial β -galactosidase	5.910
commercial β -galactosidase purified	13.793
commercial β -galactosidase contaminated	0.002
commercial β -galactosidase contaminated purified	11.02

The major industrial application of β -galactosidase is in production of milk and whey with low lactose content. For cheese industry the presence of lactose it is an issue because the low solubility of this disaccharide and its disposal as a potential pollution agent (Grosová et al. 2008). The use of β -galactosidase is the process most suitable for the hydrolysis of the lactose, but the final product cost becomes high (Gänzle et al. 2008). Thereby, many researchers study the

development of new techniques to simplify the purification process and thus reduce costs for industry (Duman and Kaya 2013).

In this work β -galactosidase fermented by *Penicillium islandicum* URM5073 has specific activity of 0.536 U mg⁻¹ in its crude extract and after the purification process the activity was increased to 3,234 U mg⁻¹. For comparative purposes, β -galactosidase produced by *Penicillium citrinum* obtained from 0.03 activity U mg⁻¹, and various purification processes demonstrated that the enzyme showed 58% carbohydrate content, suggesting that it was a glycoprotein (Watanabe and Kibesaki 1979). β -galactosidase produced by *Penicillium canescens* presented specific activity 40 U mg⁻¹ after purification using lactose as substrate (Budriene et al. 2005).

On the other hand, the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) had a specific activity of 5,910 U mg⁻¹ and after purification process by removing the excipients, the activity was 13.793 U mg⁻¹. Commercial enzyme was purified using Con A immobilized on magnetic nanoparticles to assess the efficiency of the method. Further the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) was contaminated with albumin and casein. The specific activity of contaminated commercial enzyme was 0.002 U mg⁻¹. However, after the purification methodology the specific activity increased to 33.723 U mg⁻¹.

The use of Con A covalently immobilized onto magnetic support become possible to purification β -galactosidase in one or two steps, obtaining good recovery and increased specific activity of the enzyme. However, there are not studies about the β -galactosidase purification using Concanavalin-A covalently

immobilized onto magnetic supports. In this work we study the best immobilization conditions of Con A by covalent binding to magnetic nanoparticles. The best assay of Concanavalin-A immobilization process indicated by the Pareto chart demonstrated that protein concentration has a positive significant effect, suggesting that an increase in the value of this parameter would improve Con A immobilization. However, pH study showed significant negative effect, suggesting that a reduction of this parameter would improve the immobilization process.

Our research group has been working and published studies involving magnetic particles (Angeli and Paz 2009; Maciel et al. 2012; Cabrera et al. 2013). The use of magnetic particles as a matrix for immobilizing biomolecules offers properties such as water-insolubility and easy and fast recovery by applying an external magnetic field (Cabrera et al. 2013). Some studies in the literature indicate the use of lectins immobilized on chromatography column for various purposes, such as Con A Sepharose insulation invertase of *Aspergillus niger* (L'Hocine et al. 2000), extracted from plants xiloglicano transferase (Tabuchi et al. 2001), mannose lectin extracted from the recognizer *Oreochromis niloticus* (da Silva et al. 2012). Wheat Germ Agglutinin (WGA) was immobilized on agarose for use in affinity chromatography of human plasma glycoproteins recovery (Mortezai et al. 2012). Studies report various applications of magnetic particles, among them purification of biomolecules (Angeli and Paz 2009), enzyme immobilization (Cadena et al. 2010; Soria et al. 2012), electrochemical biosensor development (Matysiak et al. 2015) among others.

5. Conclusion

Magnetic nanoparticles proved to be effective for the immobilization of con-A. The maximum immobilization response within the set range of variables were determined: amount of support 150 mg, glutaraldehyde concentration 3.5%, protein concentration 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, glutaraldehyde reaction time 1 h, pH 6 and protein covalent coupling 1 h. Con-A immobilized on magnetic nanoparticles was efficient for β -galactosidase purification. The purified enzymes presented increase of specific activity after the process. This work stands out for innovation in purification methodology of a glycoprotein using Con-A immobilized on magnetic nanoparticles.

6. Reference

- Angeli R, Paz N da (2009) Ferromagnetic levan composite: an affinity matrix to purify lectin. *BioMed Res ...* 2009:179106. doi: 10.1155/2009/179106
- Budriene S, Gorochovceva N, Romaskevicius T, Yugova L V, Miezeleiene A, Dienys G (2005) β - Galactosidase from *Penicillium canescens* . Properties and immobilization. 3:95–105.
- Cabrera M, Maciel JC, Quispe-Marcato J, Pandey B, Neri DFM, Soria F, Baggio-Saitovitch E, de Carvalho LB (2013) Magnetic composites from minerals: study of the iron phases in clay and diatomite using Mössbauer spectroscopy, magnetic measurements and XRD. *Hyperfine Interact* 224:197–204. doi: 10.1007/s10751-013-0858-x
- Cadena PG, Jeronimo R a S, Melo JM, Silva R a, Lima Filho JL, Pimentel MCB (2010) Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresour Technol* 101:1595–602. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.044
- Choonia HS, Lele SS (2013) Three phase partitioning of β -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate. *Sep Purif Technol* 110:44–50. doi: 10.1016/j.seppur.2013.02.033
- Correia MTS, Coelho LCB (1995) Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Appl Biochem Biotechnol* 55:261–273. doi: 10.1007/BF02786865
- Da Silva CDC, Coriolano MC, da Silva Lino MA, de Melo CML, de Souza Bezerra R, de Carvalho EVMM, Dos Santos AJG, Pereira VRA, Coelho LCB (2012) Purification and characterization

- of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (tilapia fish): cytokine production in mice splenocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 166:424–35. doi: 10.1007/s12010-011-9438-1
- Duman Y, Kaya E (2013) Purification, recovery, and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) β -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein Expr Purif* 91:155–160. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.003
- Freitas FF, Marquez LDS, Ribeiro GP, Brandão GC, Cardoso VL, Ribeiro EJ (2011) A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochem Eng J* 58-59:33–38. doi: 10.1016/j.bej.2011.08.011
- Gänzle MG, Haase G, Jelen P (2008) Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int Dairy J* 18:685–694. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.003
- Grosová Z, Rosenberg M, Rebroš M (2003) Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. 26:1–14.
- Grosová Z, Rosenberg M, Rebroš M, Sipocz M, Sedláčková B (2008) Entrapment of beta-galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnol Lett* 30:763–7. doi: 10.1007/s10529-007-9606-0
- Husain Q (2010) Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* 30:41–62. doi: 10.3109/07388550903330497
- Juajun O, Nguyen T-H, Maischberger T, Iqbal S, Haltrich D, Yamabhai M (2011) Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:645–654. doi: 10.1007/s00253-010-2862-2
- Kim C, Ji E-S, Oh D-K (2003) Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 25:1769–1774. doi: 10.1023/A:1026092029785
- L'Hocine L, Wang Z, Jiang B, Xu S (2000) Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J Biotechnol* 81:73–84. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00277-7
- Maciel JC, Andrad PL, Neri DFM, Carvalho LB, Cardoso C a., Calazans GMT, Albino Aguiar J, Silva MPC (2012) Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *J Magn Magn Mater* 324:1312–1316. doi: 10.1016/j.jmmm.2011.11.017
- Matysiak E, Donten M, Kowalczyk A, Bystrzejewski M, Grudzinski IP, Nowicka AM (2015) A novel type of electrochemical sensor based on ferromagnetic carbon-encapsulated iron nanoparticles for direct determination of hemoglobin in blood samples. *Biosens Bioelectron* 64:554–9. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.079

- Mortezai N, Wagener C, Buck F (2012) Combining lectin affinity chromatography and immunodepletion - A novel method for the enrichment of disease-specific glycoproteins in human plasma. *Methods* 56:254–9. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.12.004
- Naganagouda K, Mulimani VH (2008) Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Process Biochem* 43:1293–1299. doi: 10.1016/j.procbio.2008.07.016
- Prieto LM, Ricordi RG, Kuhn RC, Foletto EL, Mazutti M a., Burkert CA V. (2014) Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon. *Biocatal Agric Biotechnol* 1–4. doi: 10.1016/j.bcab.2013.12.008
- Sheridan PP, Brenchley JE (2000) Characterization of a salt-tolerant family 42 β -galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. *Appl Environ Microbiol* 66:2438–2444. doi: 10.1128/AEM.66.6.2438-2444.2000
- Soria F, Ellenrieder G, Oliveira GB, Cabrera M, Carvalho Jr LB (2012) α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1127–1134.
- Tabuchi A, Mori H, Kamisaka S, Hoson T (2001) A New Type of Endo-Xyloglucan Transferase Devoted to Xyloglucan Hydrolysis in the Cell Wall of Azuki Bean Epicotyls. 42:154–161.
- Todorova-Balvay D (2006) An efficient two step purification and molecular characterization of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *J Mol ...* 299–304. doi: 10.1002/jmr
- Watanabe Y, Kibesaki Y (1979) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Penicillium citrinum*. *Agric ...* 43:943–950.
- Yu S-Q, Liu Y-H (2012) Expression and one-step purification of a β -galactosidase by fusion with elastin-like polypeptides. *Process Biochem* 47:1108–1114. doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.003

ANEXO A - PATENTE

RELATÓRIO DE PEDIDO DE PATENTE A SER DEPOSITADO NO INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI.

TIPO: PATENTE DE INVENÇÃO

DEPOSITANTE:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO,
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO.

INVENTORES:

THIAGO VÉRAS CAVALCANTI FIRMINO (ESTUDANTE DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPE)
PABYTON GONÇALVES CADENA (PROFESSOR DA UFRPE)
LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR (PROFESSOR DA UFPE)

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um processo de síntese e imobilização covalente de concanavalina-A em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com polianilina e ativada com glutaraldeído. Adicionalmente, a concanavalina-A imobilizada na nanopartícula magnética pode ser utilizada como ferramenta para purificação de glicoproteínas, como, por exemplo, a enzima β -galactosidase.

Antecedentes da Invenção

[002] O processo de imobilização de biomoléculas, principalmente proteínas, em matrizes insolúveis em água, agrega maior estabilidade à molécula que sua forma natural. Diversas técnicas de imobilização como a adsorção, o enclausuramento e a ligação covalente têm se mostrado uma ferramenta importante para a biotecnologia, pois proporciona à biomolécula a capacidade de ser separada do meio de reação, possibilitando assim, a reutilização da biomolécula e produção de produtos livres de contaminação (NERI et al., 2011). Dentre as matrizes insolúveis em água, as nanopartículas magnéticas, devido ao tamanho diminuto, apresentam maior área superficial o que pode favorecer reações químicas. Adicionalmente, o fato de serem magnetizadas permite uma manipulação por campo magnético o que pode melhorar a recuperação do derivado imobilizado.

[003] Diversos métodos têm sido utilizados para a produção de nanopartículas magnéticas, como o método de sonicação, pirólise e sol-gel, técnica hidrotermal, decomposição térmica redutiva e liga mecânica. A presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH, sobre a superfície de nanopartículas magnéticas pode permitir a ligação

de compostos funcionais. Adicionalmente, o método de co-precipitação é o mais difundido e de baixo custo, devido à sua simplicidade e eficiência química para a preparação de vários materiais sólidos (JARAMILLO-TABARES et al., 2012).

[004] Várias biomoléculas podem ser imobilizadas em nanopartículas magnéticas, dentre estas, as lectinas permitem uma ligação reversível com a molécula a ser purificada permitindo a posterior separação do derivado imobilizado e da molécula purificada. As lectinas são uma classe de proteínas, de origem não imunológica, que são capazes de se ligar não covalentemente e reversivelmente a carboidratos. Essas ligações podem ser por meio de pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas ou ligações hidrofóbicas. As lectinas são comuns na natureza, estando presente desde bactérias até mamíferos. As lectinas podem ser usadas como ferramentas na detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, sendo renomeada de tradutoras da expressão de carboidratos.

[005] Documentos de patentes descrevem processos de produção de nanopartículas conforme descrito a seguir:

[006] Muitos documentos de patente descrevem a produção de nanopartículas como em BR 11 2014 027834 2, BR 11 2014 023859 6, BR 11 2014 016562 9, BR 11 2014 014730 2, BR 11 2014 009753 4, BR 11 2014 006596 9, BR 10 2012 022036 9, BR 10 2012 021728 7, BR 11 2013 021731 6. Estes documentos diferem da presente invenção por não utilizarem nanopartículas magnetizadas.

[007] Outros como a patente BR 10 2012 029535 0 A2 descreve uma metodologia para estabilizar nanopartícula de prata, gerada por qualquer método, sem a necessidade de agente de transferência de fase. Ou a patente CN102360909 (A) que descreve um método de preparação de nanopartículas magnéticas de fluoretos. Os documentos diferem da presente invenção por não apresentarem funcionalização com glutaraldeído para a imobilização de biomoléculas.

[008] Em relação à literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando os ensinamentos descritos neste relatório descritivo. Portanto a invenção possui novidade frente ao estado da técnica.

Descrição da Invenção

[009] Para os fins desta invenção, concanavalina-A é um lectina, sendo assim uma proteína de origem não imunológica que se liga reversivelmente a carboidratos. Para os fins desta invenção, glicoproteínas são proteínas que apresentam carboidratos ligados covalentemente às suas estruturas peptídica.

[010] Para os fins desta invenção, “suporte” é qualquer material sólido onde uma enzima pode ser ligada (confinada – imobilizada). “Derivado imobilizado” é o produto formado pela biomolécula ligada ao suporte.

[011] Para os fins desta invenção, nanopartículas magnéticas é um minério de ferro (Fe_3O_4) contendo a presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH, sobre sua superfície que permite ligações a compostos funcionais, proporcionando então a possibilidade de uso como um suporte para imobilização de biomoléculas.

[012] Os inventores desta invenção têm identificado um processo para a purificação de glicoproteínas com aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas e comerciais. Na presente invenção, são consideradas concanavalina-A imobilizada covalentemente a nanopartículas magnéticas possuindo a capacidade de purificar glicoproteínas.

Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras de 1 e 2 .

[013] Figura 1: Magnetita funcionalizada com polianilina e concanavalina-A imobilizada covalente (1) sendo atraída por um ímã (2).

[014] Figura 2: Gel de eletroforese corado com nitrato de prata. Proteínas padrão – A, Extrato fermentado – B, Solução purificada – C.

[015] Na primeira modalidade preferida é descrito o processo de produção de nanopartículas magnéticas. As soluções de FeCl_3 e FeCl_2 , preferencialmente na proporção em mol de 1,1:0,6 foram adicionadas a água, sob agitação magnética, seguido de alcalinização com NaOH preferencialmente a 5,0 M até pH 10 quando as nanopartículas começaram a precipitar. A mistura foi aquecida preferencialmente a 50 °C durante 30 min com agitação vigorosa. As nanopartículas magnéticas foram cuidadosamente lavadas com água até a neutralização do pH. O material foi então seco. As nanopartículas magnéticas foram tratadas com uma solução de KMnO_4 preferencialmente a 0,1 M durante 1 hora a 25 °C e lavadas com água. Depois disso imersas em uma solução de 0,5 M de anilina preparada em 1 M de HNO_3 . Preferencialmente, a reação deve ocorrer durante 1 hora a 4 °C e após isso, as nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina foram preferencialmente lavadas sucessivamente com água, ácido cítrico 0,1 M e relavadas com água. O material foi seco a 50 °C e mantido a 25 °C.

[016] Na segunda modalidade preferida é descrito o método de imobilização covalente de uma lectina, preferencialmente a concanavalina-A no suporte magnético revestido com polianilina pelo seguinte método: a magnetita funcionalizada com polianilina foi submetida à ativação com glutaraldeído preferencialmente a 2,5% durante, preferencialmente por 1 hora a baixa temperatura, preferencialmente a 4 °C sob homogeneização constante. Posteriormente aplicou-se um campo magnético e a solução de glutaraldeído foi desprezada, realizando então lavagens com água e lavagens com tampão PBS preferencialmente a 0,01 M pH 7,2. Após o processo de lavagem, concanavalina-A foi incubada, preferencialmente por 1 hora, ao suporte magnético revestido e ativado para que ocorresse a imobilização da biomolécula. O derivado imobilizado foi submetido a lavagens com NaCl 1 M. Posteriormente o derivado imobilizado foi incubado com solução de glicina 0,1 M para a inativação do glutaraldeído livre.

Exemplo

Purificação de β -Galactosidase

[017] A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) conhecida como lactase ou β -D-galactosídeo galactohidrolase, pertence ao grupo das enzimas hidrolíticas. Seu papel fisiológico é a hidrólise de β -galactosídeos redutores de oligossacarídeos, polissacarídeos ramificados como galactomananas e da fração polissacarídica de glicoproteínas (PRIETO et al., 2014). β -galactosidasas podem ser obtidas através de diferentes fontes como os microorganismos, plantas e animais, portando propriedades distintas de acordo com sua origem (BUDRIENE et al., 2005). A escolha da fonte da β -galactosidase é de relevante importância, pois é dessa escolha que depende suas propriedades e consequentemente de suas aplicações (GROSOVÁ, 2003). O estímulo pela aplicação tecnológica rotineira da enzima acarretou vários laboratórios a busca de técnicas e estratégias para sua purificação. Para enzimas de uso comercial o grau de pureza é um fator de elevada importância.

[018] Para a purificação da β -galactosidase fermentada pelo *Penicillium islandicum* URM5073, 2 mL do extrato fermentado foi incubado por três horas com as nanopartículas magnéticas contendo concanavalina-A imobilizada sob homogeneização suave à 4 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e o conjugado glicoproteína-lectina-magnetita-PANI foi submetido a três lavagens de 2 mL com 0,1 M de NaCl, em seguida, foram feitas quinze lavagens, cada uma contendo 2 mL de solução 0.3 M de glicose para separar a afinidade entre a glicoproteína e a lectina imobilizada. Para completar o processo foram realizados cinco lavagens de 2 mL com 1 M de NaCl. Todos os sobrenadantes foram realizados dosagem para proteína pelo método de Lowry et al. (1951).

[019] Para a determinação da atividade enzimática, 500 μ L de do fermentado fúngico foram incubados com 500 μ L de solução de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 37 °C. Após 10 minutos uma alíquota de 500 μ L foi retirada e a ela adicionada 500 μ L

de solução de tetraborato de sódio 10 mM. Uma unidade enzimática foi determinada como a quantidade necessária para produzir 1 μmol do produto (o-nitrofenol) por minuto de reação nas condições ensaiadas.

[020] Para determinação da eficiência do método de purificação foi realizado uma eletroforese. A eletroforese do extrato fermentado por *Penicillium islandicum* URM5073 e da solução purificada foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). SDS-PAGE foi realizada com um gel de corrida de 15% e de concentração de 4%. As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie G-250.

[021] A atividade específica é a relação da atividade enzimática sob a quantidade de proteína da amostra. Como resultado da purificação, a atividade específica da β -galactosidase no fermentado fúngico foi de 0,53 U/mg, alcançando após a purificação, a atividade de 3,23 U/mg.

[022] A eletroforese revela o peso molecular das proteínas de cada amostra. β -galactosidase apresentou peso molecular aproximado de 100 kDa.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS caracterizado pelo suporte ser uma nanopartícula magnética (Fe_3O_4) funcionalizada com glutaraldeído;
2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, segundo reivindicação 1, caracterizado pela biomolécula a ser imobilizada ser uma lectina;
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS, segundo reivindicação 1, caracterizado pelo derivado imobilizado ligar-se reversivelmente a glicoproteínas que podem ser purificadas.

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTENDO PROTEÍNAS IMOBILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. A presente invenção refere-se a um processo de produção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com polianilina e ativada com glutaraldeído para a imobilização de lectinas. Estas lectinas são proteínas com a capacidade de ligar-se reversivelmente a glicoproteínas permitindo a purificação destas últimas. Adicionalmente, a presente invenção também descreve um método de purificação de β -galactosidade de fonte microbiana utilizando as nanopartículas magnéticas.

Figura 1

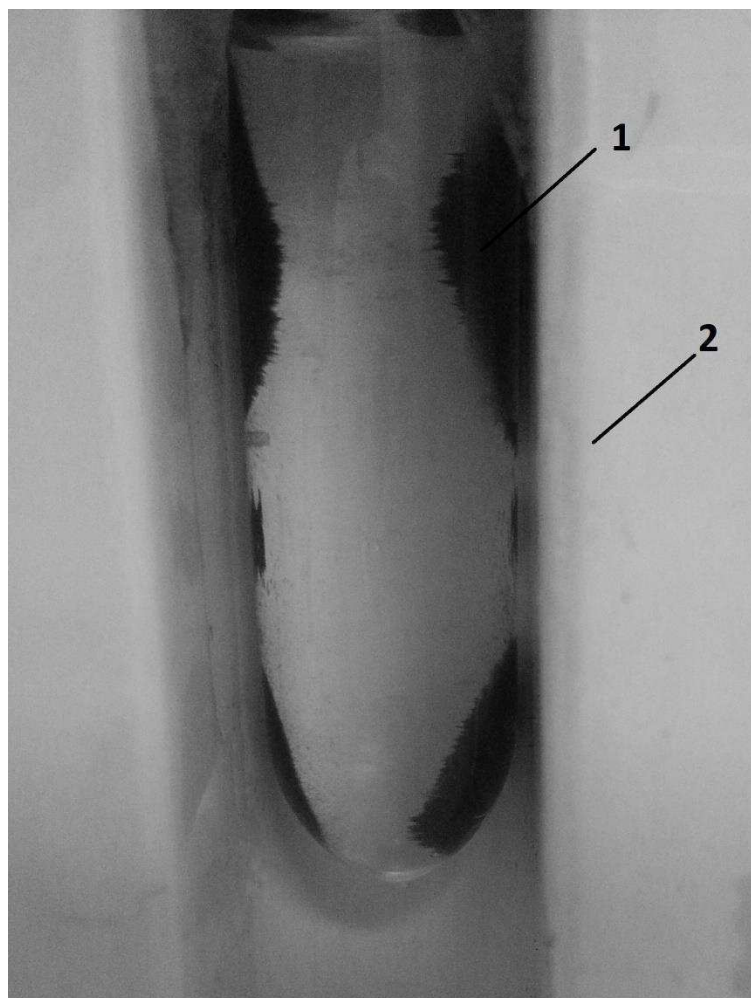
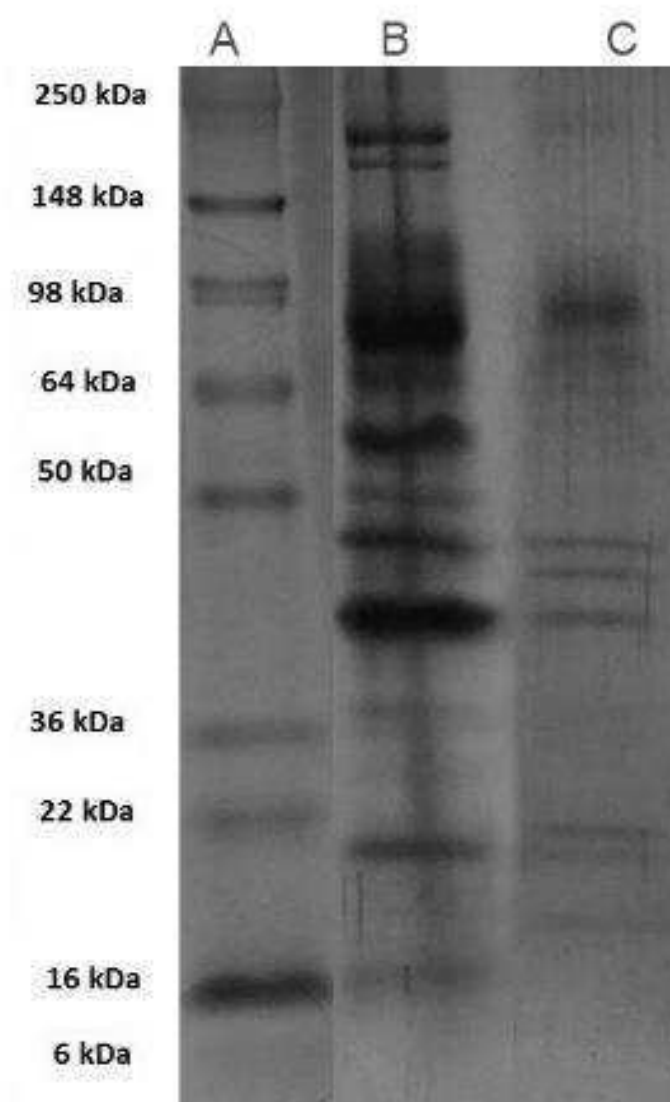


Figura 2

CONCLUSÃO

- As nanopartículas magnéticas provaram ser uma matriz eficaz para imobilização de Concanavalina-A;
- Concanavalina-A imobilizadas em nanopartículas magnéticas provou ser uma metodologia eficaz para purificação de β -galactosidase
- Dentre as variáveis independentes estudadas, foi determinado que a concentração de Concanavalina-A e o pH de solução foram fatores que influenciam o processo de imobilização da biomolécula na matriz;
- Concanavalina-A imobilizada em nanopartículas magnéticas tornou-se uma alternativa na purificação de β -galactosidase;
- Esse trabalho destaca-se pela inovação na metodologia de purificação de glicoproteínas utilizando matriz com propriedades magnéticas