

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *KLUYVEROMYCES* MARXIANUS

Luciane Padilha Mena

Acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa
lucianemena@hotmail.com

Tábita Veiga

Acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa
tata.v.d.r@hotmail.com

Caroline Costa Moraes

Professora do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa
caroline.moraes@unipampa.edu.br

Ana Paula Manera

Professora do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa
ana.manera@unipampa.edu.br

Resumo. A β -galactosidase é uma importante enzima aplicada na indústria de alimentos na hidrólise da lactose. Quando produzida por leveduras, é uma enzima intracelular e ideal para tratamento de produtos como o leite, sendo a permeabilização celular uma das técnicas para a obtenção de enzimas intracelulares. O objetivo desse trabalho foi testar diferentes solventes orgânicos em concentrações variadas para a permeabilizar células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em relação à atividade da β -galactosidase. Foram testados seis agentes permeabilizantes: álcool metílico, acetona, etanol, isopropanol, acetato de etila e hexano. As concentrações testadas variaram de 20 a 100% (p/v). A atividade das células não permeabilizadas foi próxima à zero indicando que os agentes testados possuem capacidade de permeabilização das células. O álcool metílico 35% (p/v) foi definido como o melhor agente, dentre os testados, em virtude do seu baixo custo e boa permeabilização das células.

Palavras-chave: β -galactosidase.
Permeabilização. Solventes.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase, mais comumente conhecida como lactase, é uma importante enzima utilizada na indústria de alimentos na hidrólise da lactose de leite e soro de queijo e na produção de galactooligossacarídeos (PANESAR et al., 2006, YANG & SILVA, 1995).

A lactose, o principal carboidrato presente no leite, é um dissacarídeo de baixa solubilidade que não é digerível por uma grande parcela da população mundial (PANESAR et al., 2006). Por isso, o tratamento do leite e de produtos lácteos com a enzima β -galactosidase tem ganhado destaque, uma vez que reduz o teor de lactose nesses produtos, tornando-os passíveis de serem consumidos por pessoas que apresentam intolerância à esse carboidrato.

Dentre os micro-organismos produtores de β -galactosidase, as leveduras tem se destacado por apresentarem maior atividade para valores de pH entre 6,0 e 7,0, sendo ideal para tratamentos de produtos como o leite que possuem pH próximo ao neutro (KONDO et al., 2000; HUSAIN, 2010).

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, além de ser aceita como um micro-organismo seguro, oferece grandes vantagens em relação aos outros micro-organismos, como bom rendimento no crescimento e maior atividade da β -galactosidase (KAUR et al., 2009).

Quando produzida por *Kluyveromyces marxianus*, a β -galactosidase é uma enzima intracelular. A permeabilização celular é uma técnica que permite acesso aos componentes intracelulares, sem que haja a ruptura da célula. Nesta técnica a estrutura celular é alterada, tornando-se porosa, permitindo a passagem de pequenas moléculas (PANESAR et al., 2007).

Solventes orgânicos tem sido utilizados como agentes permeabilizantes devido ao seu baixo custo e aos bons resultados obtidos.

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes solventes orgânicos na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em relação à atividade da β -galactosidase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A enzima foi produzida por fermentação submersa em meio complexo composto por lactose, a 30°C, 150 rpm por 48 h (MANERA et al., 2008). O meio de fermentação foi inoculado com 10% de inóculo feito com o mesmo meio, incubado por 24 h a 30°C e 150 rpm.

Foram testados seis solventes orgânicos, isoladamente, preparados em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. As concentrações testadas variaram de 20 a 100% (p/v) para a acetona, o álcool metílico, o etanol, o isopropanol. O hexano e o acetato de etila, devido a sua alta apolaridade, foram testados apenas na concentração de 100%.

As células do caldo fermentado (15 mg de peso seco) foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 min a 5°C e lavadas duas vezes com água destilada. As células foram ressuspendidas em 2 mL do agente permeabilizante. A suspensão foi mantida durante 5 min a 25°C, então

centrifugada para a retirada do agente permeabilizante. As células permeabilizadas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 e utilizadas para determinação da atividade enzimática. Realizou-se também a atividade das células sem permeabilizar.

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*NPG) como substrato, segundo metodologia descrita por Inchaurredo et al. (1994).

A determinação da atividade enzimática foi feita através da leitura da absorvância em espectrofotômetro a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de *o*NPG por minuto, sob as condições do ensaio.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Para a análise estatística utilizou-se o programa STATISTICA 7.0. Foi realizada a análise de variância ($p < 0,05$) e o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a atividade enzimática para cada agente permeabilizante em suas respectivas concentrações estão apresentados na Fig.1. Na concentração de 0%, tem-se a atividade das células não permeabilizadas.

Observa-se um aumento da atividade enzimática com o aumento da concentração até um valor crítico, onde ocorre o máximo valor da atividade. Após essa concentração, a atividade decresce novamente.

Panesar et al. (2007) afirmam que em concentrações mais elevadas, as diminuições na atividade da enzima podem ser atribuídas à lise celular ou a liberação da enzima a partir das células. Já, em concentrações menores o baixo valor da atividade enzimática deve-se à quantidade insuficiente de agente para uma permeabilização eficaz das células.

A atividade das células não permeabilizadas foi próxima a zero (0,22

U/mg de biomassa) indicando que os agentes permeabilizantes testados possuem capacidade de permeabilização das células da levedura.

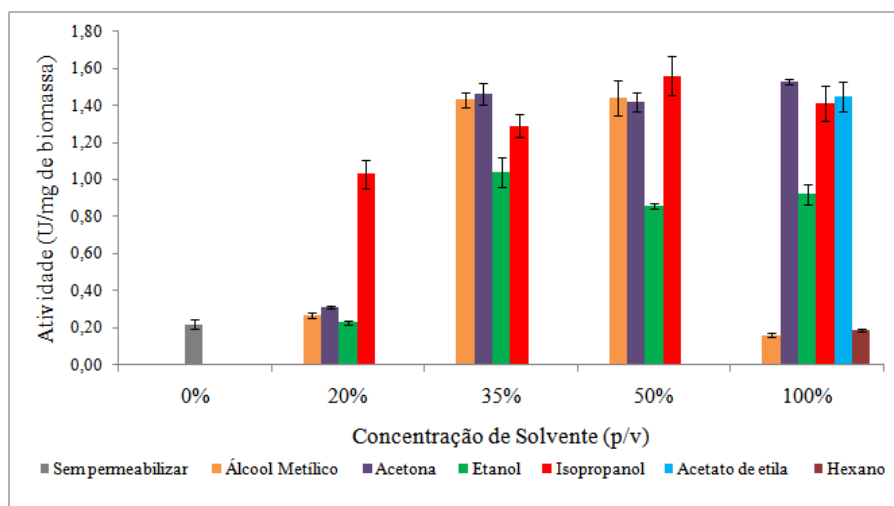


Figura 1 – Efeito dos solventes na permeabilização das células de *Kluveromyces marxianus* CCT 7082

As máximas atividades enzimáticas estão apresentadas na Fig. 2 e foram obtidas na concentração de 35% para o álcool metílico (1,43 U/mg de biomassa) e o etanol (1,04 U/mg de biomassa), na concentração de 50% para o isopropanol (1,56 U/mg de biomassa) e em 100% para a acetona (1,53 U/mg de biomassa). O acetato de etila apresentou atividade enzimática de 1,45 U/mg de biomassa, enquanto o hexano apresentou atividade próxima a das células

não permeabilizadas (0,19 U/mg de biomassa) indicando que esse agente provocou a desnaturação da enzima. Foi realizada a análise de variância e o teste de Tukey entre os melhores resultados de cada agente de modo a identificar qual o melhor tratamento dentre os testados.

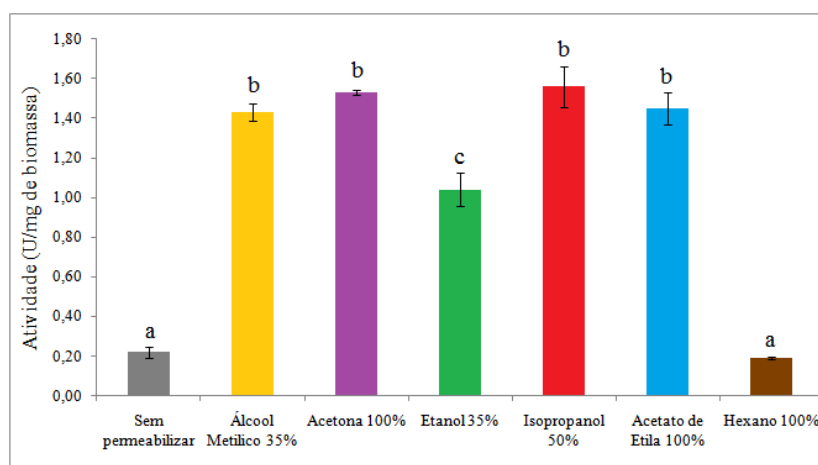


Figura 2 – Atividade enzimática máxima para cada solvente. O Teste de Tukey está representado pelas letras. Letras iguais denotam que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Os melhores resultados foram obtidos para o álcool metílico 35%, a acetona 100%, o isopropanol 50% e o acetato de etila 100%, onde não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Todos os agentes químicos testados são permitidos, na concentração utilizada, para uso em alimentos, segundo a ANVISA. Sendo assim, definiu-se o álcool metílico 35% como sendo o melhor agente permeabilizante dentre os testados, tendo em vista que o seu preço é o menor no mercado atualmente.

4. CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos, foi possível constatar que o álcool metílico 35% (p/v), o isopropanol 50% (p/v), a acetona 100% e o acetato de etila 100% foram os melhores agentes permeabilizantes dentre os testados para permeabilizar as células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em relação à atividade da β -galactosidase.

Devido ao seu menor custo, o álcool metílico 35% (p/v) foi definido como sendo o melhor agente permeabilizante.

Agradecimentos

Ao Programa de Bolsas de Desenvolvimento Acadêmico da Universidade Federal do Pampa (PBDA), pela bolsa de iniciação científica.

5. REFERÊNCIAS

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. India, V. 30, n. 1, p. 41-62, out 2010.

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**. Argentina, V. 29, n. 1, p. 47-54, 1994.

KAUR, G., PANESAR, P. S., BERA, M. B., KUMAR, H. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. India, V. 32, n. 1, p. 63-67, jan 2009.

KONDO, A., LIU, Y. FURUTA, M., FUJITA, Y., MATSUMOTO, T., FUKUDA, H. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**. Japan. V. 27, n. 10, p. 806-811, dez 2000.

MANERA, A. P., ORES, J. C., RIBEIRO, V.A., BURKET, C. A. V., KALIL. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**. Rio Grande. V. 46, n. 1, p. 66-72, jan 2008.

PANESAR, S. P., PANESAR, R., SINGH, R. S., BERA, M. B. Permeabilization of Yeast Cells with Organic Solvents for β -galactosidase Activity. **Research Journal of Microbiology**. India, V. 2, n. 1, p. 34-41, jan 2007.

PANESAR, S. P., PANESAR, R., SINGH, R. S., KENNEDY, J. F., KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. United Kingdom, n. 81, p. 530-539, jan 2006.

YANG, S. T., SILVA, E. M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. **Journal of Dairy Science**. Ohio, V. 78, n. 11, p. 2541-2562, dez 1995.