

# DIFERENTES TÉCNICAS DE RUPTURA CELULAR PARA EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* CCT 7081.

**Fabiana de Medeiros, Cristiane Lisboa, Daniela Martins, Fernanda Alves, Carlos André Burkert, Susana Kalil\***

*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Química, Curso de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.  
E-mail: susana.kalil@vetorial.net*

## RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose pela  $\beta$ -galactosidase é um dos processos biotecnológicos mais antigos conhecidos pela humanidade. A importância desta enzima é ressaltada pela sua atuação na produção de derivados lácteos destinados a pessoas intolerantes à lactose. Quando esta enzima é produzida por células de *Kluyveromyces* ela é intracelular, sendo necessário a ruptura da célula para promover seu isolamento. Este trabalho tem como objetivo estudar a extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081 através de diferentes técnicas de ruptura. A biomassa foi obtida por fermentação submersa, em meio à base de lactose, com pH 5,5, 180 rpm à 30°C por 48 horas. As técnicas de ruptura utilizadas foram: variação de carga de pérolas de vidro em agitador do tipo *vórtex* com tempo fixo, variação de tempo em agitador do tipo *vórtex* e sonicador com carga fixa de pérolas. No primeiro ensaio foram utilizadas cargas que variaram de 0,4454 a 1,1004g perólas/mL células em suspensão por 10 min. A atividade cresceu com o aumento da carga de pérolas de vidro, atingindo valores constantes para as duas últimas cargas. No ensaio de ruptura em agitador magnético do tipo *vórtex* e sonicador, foi utilizada a carga de 1,1004g perólas/mL células em suspensão, utilizando tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos. O tempo de 30 minutos foi considerado o melhor para ruptura em agitador magnético, e o tempo de 40 minutos para ruptura em sonicador, pois proporcionaram a melhor extração, quantificada pela atividade enzimática.

Palavras-chave: atividade enzimática, fermentação.

## 1 INTRODUÇÃO

A lactose, chamada de açúcar do leite é um dissacarídeo que tem como características principais baixa solubilidade em água, de 15 a 20 % a 20°C, baixo poder adoçante e o fato de um grande número de pessoas ser intolerante a este carboidrato (GÉKAS & LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997). O aperfeiçoamento dos processos de separação e purificação de  $\beta$ -galactosidase de origem microbiana são interessantes para reduzir o custo das etapas de preparação da enzima, desde a extração, purificação e concentração, que são geralmente responsáveis por até 40% do custo total de produção (KULA, 1990).

A extração da enzima é necessária para se obtê-la em suspensão. Quando a enzima é intracelular torna-se necessária a ruptura da célula para o isolamento da proteína. Uma ampla variedade de técnicas de ruptura pode ser usada em meio laboratorial, dentre elas a ruptura química (álcali, tratamentos detergentes) e mecânica (tratamento com ondas ultra-sônicas, uso de pressão na célula através de pérolas de vidro e outras). Os métodos de ruptura podem ser classificados entre aqueles que produzem vazamento celular em resposta à aplicação de forças de cisalhamento e aqueles que produzem digestão das células pela ação de produtos químicos ou por enzimas endógenas e exógenas (NUMANOGLU & SUNGUR, 2004).

Este trabalho tem como objetivo estudar a extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, utilizando diferentes técnicas mecânicas de ruptura celular.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Material e Métodos**

#### **2.1.1 Fermentação**

O extrato enzimático foi obtido por fermentação submersa em meio à base de lactose, com pH 5,5, 180 rpm à 30°C por 48 horas. A fermentação foi iniciada com uma concentração de células de levedura igual a  $1 \times 10^7$  células/mL (SANTIAGO *et al.*, 2004).

#### **2.1.2 Determinação de Biomassa**

A concentração de biomassa foi estimada por absorvância ( $\lambda$  620 nm) medida e convertida em peso de célula seca usando um fator de conversão obtido do gráfico plotado como absorvância versus peso de célula seca. Essa concentração foi usada para calcular o volume de caldo necessário para obter a concentração de 2,62 mg/mL de células em suspensão (NUMANOGLU & SUNGUR, 2004).

#### **2.1.3 Ensaios de Ruptura**

O caldo fermentado foi distribuído em tubos e centrifugado sob refrigeração, a 6000rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3. Esse caldo foi utilizado nos ensaios de ruptura. Para o estudo da influência da carga de pérolas de vidro utilizadas para romper as células, foram testadas cargas de 0,4454; 0,5240; 0,6026; 0,6812; 0,7860; 0,9956 e 1,1004g perólas/mL células em suspensão, por um tempo de 10 min em agitador magnético do tipo *vórtex*. A melhor carga foi utilizada para estudar o tempo de ruptura em agitador do tipo *vórtex* e sonificador, nos tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos. As amostras foram mantidas em banho de gelo. Após a etapa de ruptura, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante foi analisado quanto à atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os dados tratados através de análise de variância e Teste de Tukey.

#### **2.1.4 Determinação da Atividade Enzimática**

A atividade enzimática foi determinada usando o método baseado na hidrólise do o-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo (ONPG), realizada a 37°C por 15 min. A atividade enzimática foi medida pela leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Uma unidade de  $\beta$ -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto (FOOD CHEMICAL CODEX, 1981)

### **2.2 Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos para os experimentos são mostrados nas tabelas 1 a 3. Nos valores de atividade enzimática média, letras iguais indicam que não há diferença significativa, letras distintas indicam diferença significativa entre as atividades, a 95% de confiança.

Tabela 1: Resultados de atividade enzimática para o estudo da variação da carga de pérolas de vidro na ruptura de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081 em agitador magnético do tipo vórtex.

Tratamento	Carga de pérolas (g/mL células suspensão)	Média da Atividade Enzimática (U/g)	Desvio Padrão
A	0,4454	53,759 <sup>a</sup>	1,12
B	0,5240	55,965 <sup>a,b</sup>	6,89
C	0,6026	71,597 <sup>c</sup>	2,14
D	0,6812	70,666 <sup>c</sup>	5,71
E	0,7860	68,412 <sup>b,c</sup>	9,14
F	0,9956	87,145 <sup>d</sup>	4,59
G	1,1004	89,780 <sup>d</sup>	1,31

Nota-se que a ruptura das células da levedura foi mais efetiva à medida que a relação carga de pérolas-volume de células em suspensão foi aumentada, refletida pela medida da atividade enzimática. Através do teste de diferença de médias, foi possível verificar que ao nível de significância de 95%, não existe diferença significativa entre os tratamentos F e G. Então, a carga de 1,1004g/mL de células em suspensão foi utilizada nos ensaios para estudo do tempo de ruptura. Os resultados para estes ensaios estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Resultados de atividade enzimática para o estudo da variação do tempo de ruptura de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081 em agitador magnético do tipo vórtex.

Tratamento	Tempo de Ruptura (minutos)	Média Atividade Enzimática (U/g)	Desvio Padrão
A	10	426,86 <sup>a</sup>	13,32
B	20	447,94 <sup>b</sup>	1,89
C	30	484,20 <sup>c</sup>	2,19
D	40	462,02 <sup>b</sup>	5,47

Os tratamentos B e D apresentaram-se iguais estatisticamente, já os tratamentos A e C foram diferentes, sendo este último o que proporcionou o melhor resultado em atividade enzimática. A diminuição na atividade enzimática com o aumento no tempo de ruptura pode ser explicada pela provável desnaturação da enzima. A ruptura em vórtex pode ser aplicada em grande escala, através de um moinho de bolas, o equipamento consiste de uma câmara de trituração refrigerada (vertical ou horizontal) com uma haste longitudinal rotatória no centro. A esta haste são presos agitadores de diferentes formatos que são responsáveis por transmitir energia cinética a pequenas contas contidas na câmara, forçando-as a colidirem umas com as outras promovendo o rompimento das células.

Tabela 3: Resultados de atividade enzimática para o estudo da variação do tempo de ruptura de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081 em aparelho sonicador.

Tratamento	Tempo de Ruptura (minutos)	Média Atividade Enzimática (U/g)	Desvio Padrão
A	10	329,60 <sup>a</sup>	24,79
B	20	450,55 <sup>b</sup>	17,66
C	30	475,57 <sup>b</sup>	19,75
D	40	536,15 <sup>c</sup>	10,62

Os tratamentos B e C foram considerados iguais estatisticamente, Os tratamentos A e D são diferentes de todos os demais, porém o tratamento D produziu um rompimento mais efetivo, refletido numa elevada atividade enzimática, portanto o tempo de 40 minutos foi considerado o melhor para romper as células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, em aparelho sonicador. Apesar de este método ser efetivo para extração da enzima  $\beta$ -galactosidase, não pode ser aplicado em grande escala, sendo considerado uma metodologia analítica, para ser usada em nível de laboratório.

### 3 CONCLUSÃO

A condição considerada mais favorável à extração de  $\beta$ -galactosidase foi o uso da relação 1,1004g de pérolas de vidro/ml de células em suspensão, através da ruptura por 30 minutos em agitador magnético do tipo *vórtex* ou por 40 minutos em aparelho sonicador.

### 4 REFERÊNCIAS

- FOOD CHEMICAL CODEX. Washington: Nat. Acad. Press, 3. ed. p. 491. 1981.
- GEKAS, V. & LEIVA, L. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**. P. 2-12, 1985.
- HOLSINGER, V. H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v. 3, p. 1-38, 1997.
- KULA, M-R. Trends and future of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**. Dusseldorf, v.1. p. 181-189. 1990;
- NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**. V. 39, p. 703-709, 2004.
- SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, p. 567-572, 2004.