

Permeabilização Celular de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 com Etanol por Metodologia de Superfície e Resposta

Luiz Rodrigo Ito Morioka¹, Cibely Maria Gonçalves¹, Mayara Karoline Lucatto¹, Hélio Hiroshi Sugimoto¹.

¹ Universidade Norte do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Caixa Postal 401, CEP 86041 – 140. Londrina – PR, Rua Marselha, 591.
E-mail: lrodrigo@yahoo.com.br.

RESUMO

*O trabalho tem como objetivo verificar a condição ótima para a extração da enzima β -galactosidase através da permeabilização celular com etanol utilizando a técnica de delineamento experimental associado à Metodologia de Superfície de Respostas. Foram avaliadas três variáveis independentes (concentração de etanol, temperatura e tempo de reação) em função da resposta (atividade enzimática). A permeabilização celular foi melhorada com o aumento da concentração de etanol. Essa abordagem permitiu identificar uma faixa ideal das variáveis independentes em que a atividade da β -galactosidase foi otimizada. De acordo com os resultados a máxima permeabilização de 11,93 μmol oNP/min foi obtido tratando as células com 23,4 % de etanol a 10 °C por 20 minutos. A metodologia proposta apresentou ser eficaz e adequado para a permeabilização celular de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 em escala laboratorial com potencial para futuras aplicações, principalmente no setor de alimentos.*

Palavras-chave: β -galactosidase, atividade enzimática, levedura, soro de queijo.

INTRODUÇÃO

Saccharomyces fragilis é caracterizado como uma levedura homotático, hemiascomiceto e produtora de diversas enzimas dentre elas a β -galactosidase (DAGBAGLI; GOKSUNGUR, 2008). Uma característica da *S. fragilis* é a capacidade de assimilar a lactose e utilizar este açúcar como única fonte de carbono por meio da produção de β -galactosidase. Assim o soro de queijo, fonte de lactose, pode ser usado como meio de cultura para a obtenção da enzima (MARCEL; PASSOS, 2011).

A β -galactosidase produzida por esta levedura é intracelular, sendo necessária a utilização de técnicas para a extração (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; PANESAR et al., 2007). A permeabilização da parede celular é uma alternativa na qual permite o acesso à composto intracelular. Este método consiste no emprego de agentes que removem a camada fosfolipídica tornando a parede celular porosa, permitindo a passagem de pequenas moléculas (PANESAR, 2008). A permeabilização da parede celular é influenciada por diversos fatores que necessitam ser adequadas. Neste trabalho o delineamento central composto (DCC) foi usado para identificar as condições ótimas para a permeabilização celular de *S. fragilis* IZ 275 utilizando diferentes concentrações de etanol, temperatura e tempo de reação.

MATERIAL E MÉTODOS

Soro de queijo

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br

O soro de queijo em pó (CONFEPAR®) na formulação integral foi dissolvida em água destilada na concentração de 5% (p/v). A desproteíntização foi realizada com a adição de solução de ácido láctico (85 %) até atingir o ponto isoelétrico, pH 4,6, em seguida foi aquecido por 30 minutos a 90°C. A fração protéica precipitada foi removida por filtração e o pH ajustado para 5,0. A pasteurização do soro de queijo desproteíntizado foi a 65 °C por 30 minutos.

Microrganismo e Condição de cultivo

A *Saccharomyces fragilis* IZ 275 foi cultivada durante 48 horas em frasco Erlenmeyer com 100 mL de meio com 5 % (p/v) de soro de queijo desproteíntizado, pH 5,0 e 5 % (v/v) de inóculo no $DO_{670nm} = 0,5$, a 35 °C e 150 rpm. No final da fermentação a cultura foi centrifugada durante 15 minutos a 6000 rpm para obter a biomassa que foi utilizada para as análises posteriores.

Atividade da β -Galactosidase

A atividade da β -Galactosidase das células permeabilizadas foi determinada conforme descrito por Inchaurredo, Yautorno e Voget, 1994. A atividade da β -galactosidase foi determinado utilizando o substrato colorimétrico ONPG (orto-nitrofenil- β -galactosídeo). Uma amostra de 50 μ L da suspensão celular permeabilizada foi misturada com 2 mL de ONPG (1,25 mM) em tampão e incubado por 5 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carbonato de sódio (1 M). O ONPG liberado foi medido em espectrofotômetro em A_{420nm} . Uma unidade de atividade da β -galactosidase é definido como a hidrólise de 1 μ mol de ONPG por minuto.

Delineamento estatístico

O experimento foi realizado conforme delineamento central compost (DCC) com três variáveis com cinco níveis cada (-1,682, -1, 0, 1, +1,682), Tabela 1. As variáveis testadas foram: concentração de etanol (%) – X_1 , temperatura (°C) – X_2 e tempo (min) – X_3 , tendo como resposta a atividade da enzima β -galactosidase.

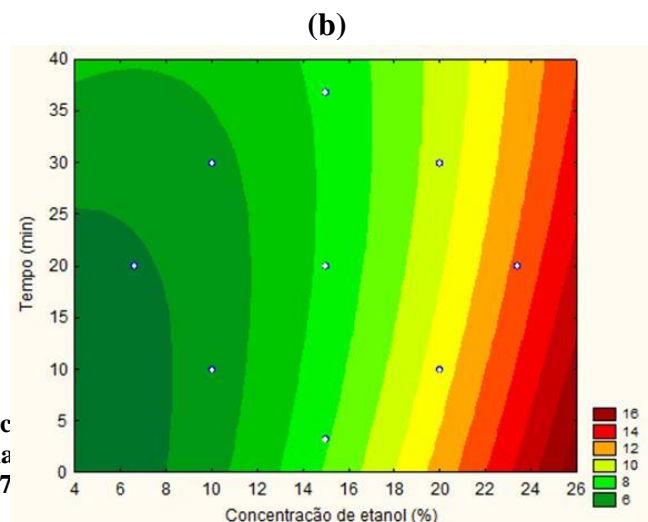
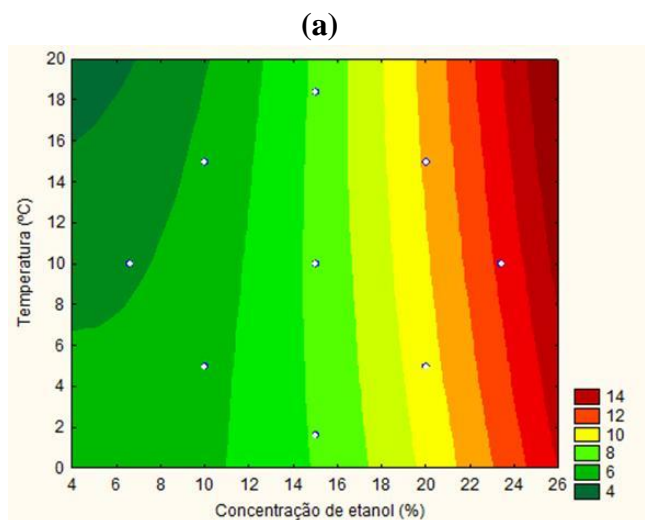
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades enzimáticas obtidas através do delineamento variaram de 4,48 até 11,93 μ mol oNP/min. A maior atividade de 11,93 μ mol oNP/min foi obtida na corrida 10. A condição desta corrida foi: concentração de etanol (23,4 %), temperatura (10 °C) e tempo (20 min). De acordo com os resultados obtidos, o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,93596 que significa 93,596 % da variação da resposta é explicada pelo modelo, sendo este valor aceitável para sistemas biológicos. A falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,520750$), indicando que o modelo proposto para o experimento pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 1. Matriz do delineamento central composto para atividade da β -galactosidase.

Corrida	Concentração (X ₁)	Temperatura (X ₂)	Tempo (X ₃)	Atividade da β -Galactosidase (μ mol oNP/min)
1	-1	-1	-1	6,25
2	-1	-1	1	5,53
3	-1	1	-1	5,07
4	-1	1	1	6,53
5	1	-1	-1	10,23
6	1	-1	1	9,23
7	1	1	-1	11,11
8	1	1	1	10,19
9	-1,682	0	0	4,48
10	1,682	0	0	11,93
11	0	1,682	0	7,21
12	0	1,682	0	6,40
13	0	0	-1,682	7,65
14	0	0	1,682	6,81
15	0	0	0	6,38
16	0	0	0	7,43
17	0	0	0	7,34
18	0	0	0	7,82
19	0	0	0	8,08
20	0	0	0	6,42

A concentração de etanol apresentou efeito linear positivo significativo ($p = 0,000089$) a 95% de confiança; a concentração de etanol (efeito quadrático), a temperatura (efeito linear) e o tempo (efeito quadrático) apresentaram um efeito positivo, ou seja, ao passar do nível -1 (menor concentração) para o nível +1 (maior concentração), houve incremento na atividade enzimática, já a temperatura (efeito quadrático) e o tempo (efeito linear) apresentaram efeito negativo, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1, houve diminuição da atividade. As interações 1L / 2L e 2L / 3L apresentaram um efeito linear positivo não significativo, já a interação 1L / 3L apresentou um efeito linear negativo não significativo.



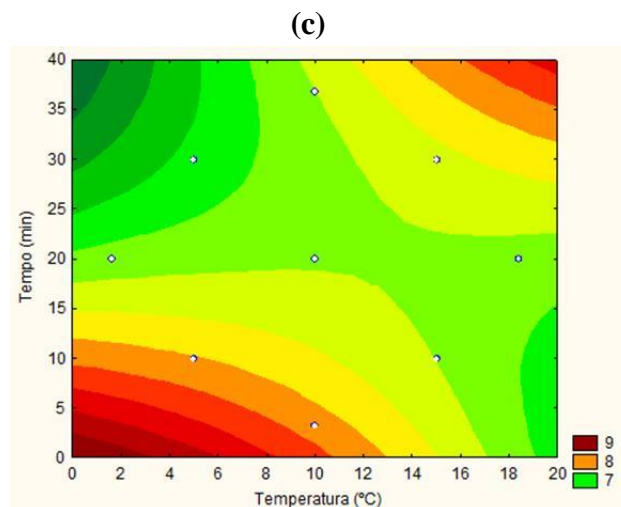


Figura 2. Superfícies de respostas para a atividade de β -galactosidase em função: (a) temperatura e concentração de etanol; (b) tempo e concentração de etanol; (c) tempo e temperatura.

Pode-se observar na Figura 2(a) que as concentrações de etanol entre 20 e 23,4 % e temperatura entre 5 e 18 °C conduzem a valores de atividade enzimática superiores a 11,11 μmol oNP/min. Trawczyńska & Wójcik (2014), observaram que o efeito da concentração de álcool isopropil (53,7 %), temperatura (15,6 °C) e tempo (40 minutos) de tratamento sobre a permeabilização de células de levedura influenciaram diretamente sobre a atividade enzimática. A Figura 2(b) indica que concentrações de etanol entre 20 e 23,4 % e tempo na faixa de 3,2 a 20 minutos propiciam altos valores de atividade enzimática. Pela Figura 2(c) observa-se que as maiores atividades são obtidas ao empregar temperaturas entre 2 e 10 °C e tempo entre 3,2 e 20 minutos.

Agência de Fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Capes.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados a máxima permeabilização de 11,93 μmol oNP/min foi obtido tratando as células com 23,4 % de etanol a 10 °C por 20 minutos. A metodologia proposta apresentou ser eficaz e adequado para a permeabilização celular de *S. fragilis* IZ 275.

REFERÊNCIAS

- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11 – 12, 2008.
- MARCEL, J. R. P.; PASSOS, F. M. L. Solvent extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* yields a stable highly active enzyme preparation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 323 – 336, 2011.
- PANESAR, P. S. Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 91 – 96, 2008.
- PANESAR, P. S. et al. Permeabilization of Yeast Cells with Organic Solvents for β -galactosidase Activity. **Research Journal of Microbiology**. India, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2007.
- TRAWCZYŃSKA I., WÓJCIK, M. Application of Response Surface Methodology for optimization of permeabilization process of baker's yeast. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 16, n. 2, p. 31 – 35, 2014.
- Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br