

Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method

Extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico

Títulos abreviados:

Extraction of β -galactosidase by ultrasonic method

Extração de β -galactosidase por método ultrassônico

Ailton Cesar Lemes^{1*}, Gabriel Teixeira Álvares¹, Susana Juliano Kalil¹

ABSTRACT

The β -galactosidase is an intracellular enzyme obtained from the yeast *Kluyveromyces marxianus* and its role is hydrolyse lactose and therefore, is important in the dairy industry. However, for their effective use is necessary to better understand the extraction methods available. The ultrasonic disruption method has been applied as a separation step of intracellular products on laboratory scale and consists of ultrasonic waves dissipation in the solution through cavitation bubbles and produce velocity gradient that creates a force capable of breaking the cells. The aim of this study was to evaluate the rupture ultrasonic extraction of the enzyme β -galactosidase obtained from the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 compared with abrasion method using glass beads. The method using ultrasonic ruptor (150 W) with an intermediate tip (70% power) was effective for cell disruption of yeast, showing high enzyme activity and yield, similar values to the extraction method using abrasive glass beads.

Keywords: cell disruption, enzyme, ultrasound, abrasion.

RESUMO

A enzima intracelular β -galactosidase, obtida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus*, é utilizada na hidrólise da lactose e importante na indústria de produtos lácteos. No entanto, para sua efetiva utilização, faz-se necessário entender melhor os métodos de extração disponíveis. O método de ruptura ultrassônica tem sido aplicado como etapa de separação de produtos intracelulares em escala laboratorial e consiste na dissipação de ondas ultrassônicas na solução através de bolhas de cavitação que produzem um gradiente de velocidade, criando uma força capaz de romper as células. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ruptura ultrassônica para extração da enzima β -galactosidase, obtida da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em comparação com método de abrasão com pérolas de vidros. O método, utilizando ruptor ultrassônico (20 kHz) com ponteira intermediária (70% de potência), mostrou-se eficiente para ruptura das células da levedura, pois apresentou altos valores de atividade enzimática e rendimento, similares ao método de extração por abrasão, utilizando pérolas de vidro.

Palavras-chave: ruptura celular, enzima, ultrassom, abrasão.

¹ Universidade Federal do Rio Grande - RS

* Autor para correspondência ailtonelemes@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma enzima que cataliza a hidrólise da lactose, sendo importante na indústria de produtos lácteos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). Pode ser produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, que é reconhecida e considerada como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos (CABALLERO et al., 1995). No entanto, a produção da enzima ocorre intracelularmente e, assim como qualquer outro produto intracelular, requer uma etapa de ruptura das células para sua liberação, etapa esta crucial nos processos de *downstream*, pois qualquer dano causado ao produto que ocorra nesta fase inicial, pode comprometer e invalidar todos os processos subsequentes (NEVES, 2003).

Dentre os métodos de ruptura destacam-se o rompimento mecânico com esferas de vidro e o rompimento por ultrassom (GURPILHARES; PESSOA-JR; ROBERTO, 2003), métodos eficientes que são utilizados durante o estabelecimento de processos de *downstream*, e ainda, no acompanhamento da produção de determinado bioproduto em escala laboratorial.

O rompimento manual com pérolas de vidro é um método mecânico que não necessita de grande aparato operacional. Utiliza basicamente pérolas de vidro e o procedimento consta da adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado, obtendo-se a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (MEDEIROS et al., 2008).

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e também como método potencial para acompanhamento de cultivos microbianos. A maior parte das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células (BOSSIO, HARRY E KINNEY, 2008) e liberar a enzima.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o método de ruptura ultrassônico para utilização em escala laboratorial em comparação ao método que utiliza abrasão com pérolas de vidro para extração da enzima β -galactosidase obtida intracelularmente a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da enzima

A enzima β -galactosidase foi produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, selecionada como a maior produtora da enzima (MANERA et al., 2008) e mantida em ágar extrato de malte e levedura. O inóculo foi preparado utilizando o meio de cultura, conforme descrito por Pinheiro et al. (2003), e mantido a 30°C, 180 rpm por 24 horas. A enzima foi obtida por fermentação submersa utilizando meio de cultura otimizado por Manera et al. (2008), mantido a 30°C, 180 rpm por 96h.

Extração da enzima por abrasão com pérolas de vidro e método ultrassônico

Os processos de extração foram realizados a partir de uma suspensão celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 (MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012) com concentração equivalente a 40 mg de célula seca por mL.

O processo de abrasão foi realizado em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro, 1,1 g de pérola de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min, com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células (MEDEIROS et al., 2008).

A ruptura pelo método ultrassônico foi realizada através de um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250) com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, onde 40 mL da suspensão celular mantida sob constante refrigeração foi submetida às ondas ultrassônicas constantes por até 30 minutos, utilizando uma micro ponteira (Mp) (40% de potência) e uma ponteira intermediária (Pi) (70% de potência), ambas de titânio.

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular, obtida a partir dos diferentes processos de ruptura, foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 4°C, 10 min). Os mecanismos de ação dos métodos empregados estão apresentados na Figura 1.

A eficiência dos métodos de ruptura foi avaliada através da determinação da atividade enzimática e proteína total. Além disso, foi determinada a atividade específica, estabelecida pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteína (mg/mL) e o rendimento do processo, relação da

atividade enzimática total (U) e biomassa utilizada no processo de extração (g). As análises foram realizadas através da retirada de alíquotas a cada 2 minutos durante o processo de extração por ultrassom utilizando a micro ponteira, a cada 1 minuto para a ponteira intermediária e no tempo fixo de 40 minutos para o processo de abrasão, conforme estabelecido por Medeiros et al. (2008).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C e pH 6,6.

Determinação da proteína total

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da ruptura pelo método ultrassônico estão apresentados na Figura 2 que mostra a atividade de β -galactosidase (A), proteína total (B) e atividade específica (C) ao longo do tempo, utilizando as duas diferentes ponteiros (Pi e Mp) no processo de extração.

A utilização da ponteira intermediária no ruptor ultrassônico, que fornece uma potência de 105 W, alcançou valores de atividade enzimática equivalentes aos obtidos pelo método de ruptura por abrasão. Isto é confirmado pelo fato de que neste processo a atividade enzimática foi apenas 10% menor do que em relação ao método por abrasão, que foi de 39,1 U/mL com atividade específica de 8,8 U/mg.

Já a micro ponteira, que fornece uma potência menor, (60 W), resultou em valores bem inferiores de atividade enzimática, até 50% menor em relação ao método de extração que utiliza pérola de vidro e 45% em relação à ponteira intermediária, de maior potência.

Figura 1 – Mecanismo de ruptura celular pelo método ultrassônico (A) e pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (B).

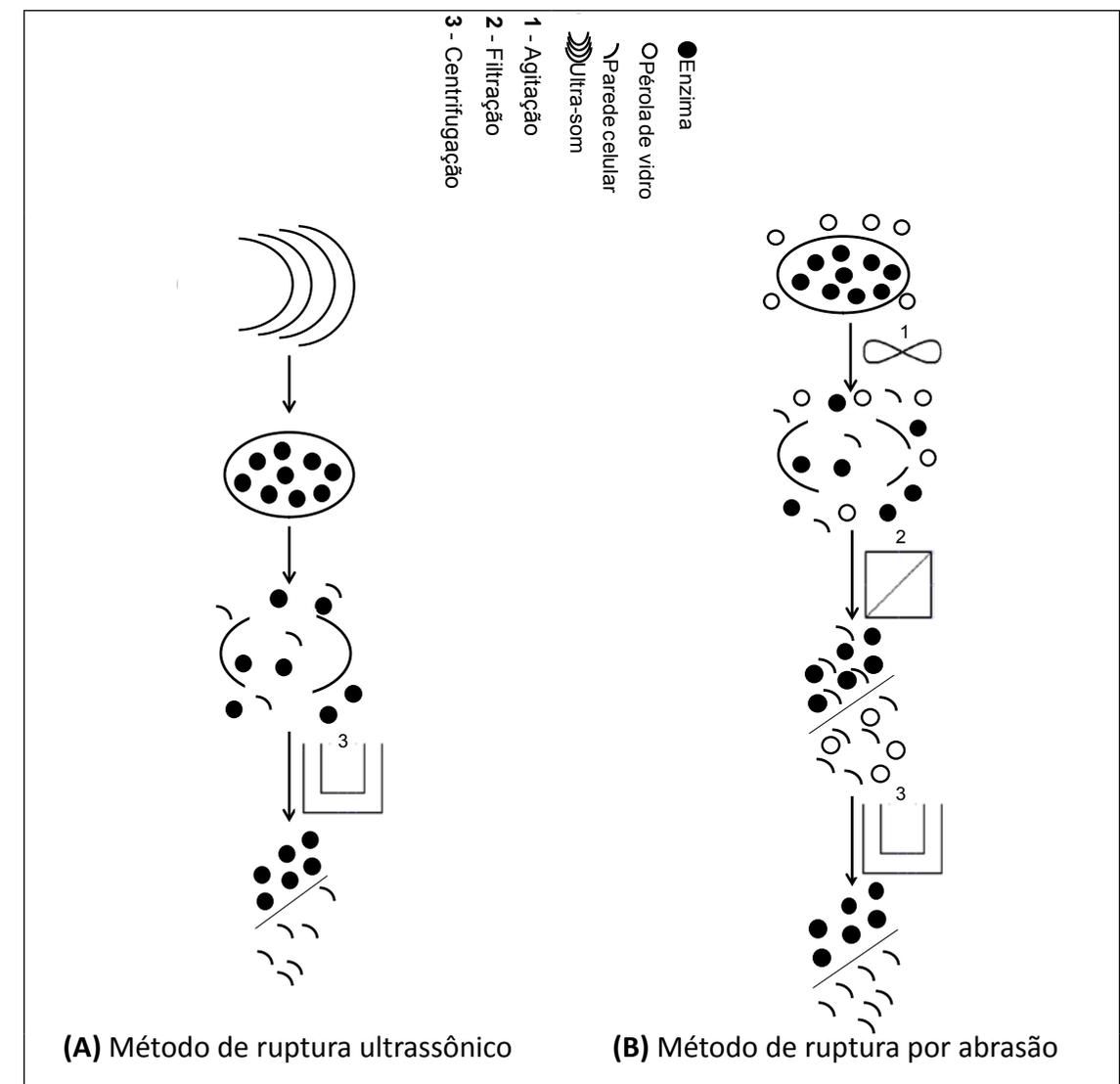
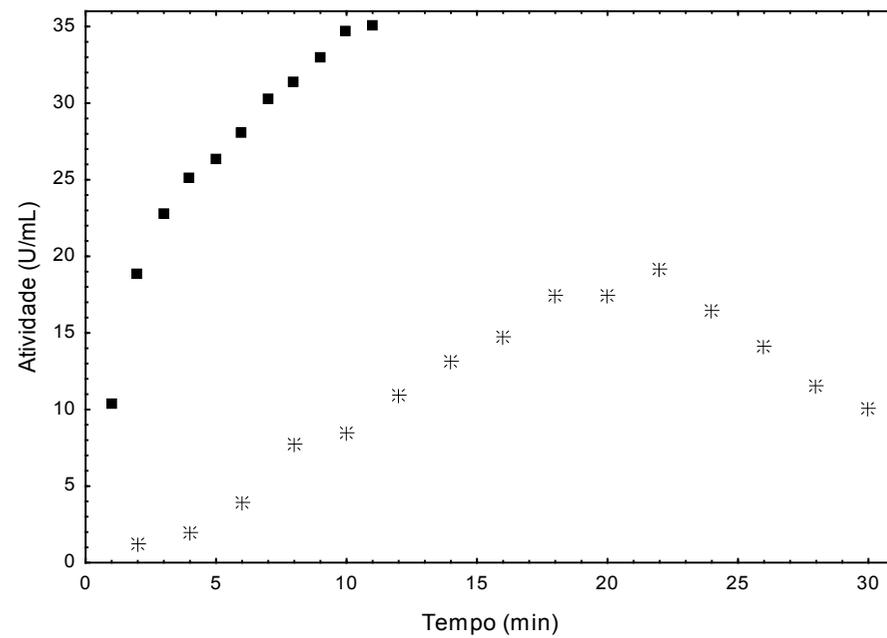
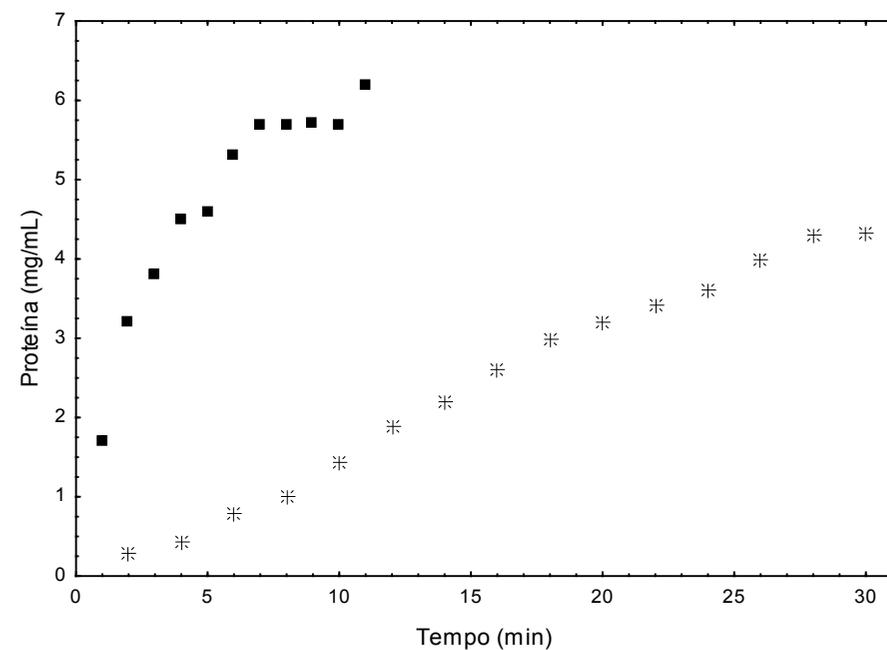


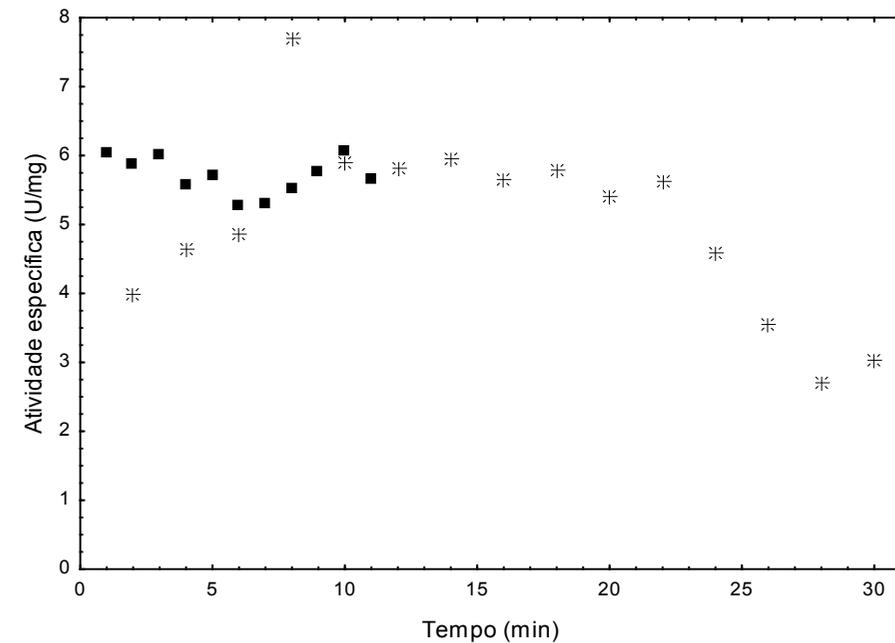
Figura 2 – Atividade enzimática (A), proteína total (B) e atividade específica (C).
 (●) Ponteira intermediária; ✱ Micro ponteira).



(A)



(B)



(C)

A utilização das diferentes ponteiros no processo que utiliza ultrassom foi positivamente favorável na eficiência da extração enzimática, principalmente no comparativo entre o grau de ruptura celular da levedura, que aumentou com o incremento da potência e das ondas ultrassônicas dissipadas no meio contendo as células. A ponteira intermediária mostrou-se mais eficiente na ruptura celular para liberação da enzima e das demais proteínas (Figura 2A e 2B). No entanto, a micro ponteira proporcionou em alguns pontos maiores atividades específicas devido à menor liberação de proteínas do interior da célula da levedura, resultando em certo momento do processo em uma maior atividade específica (Figura 2C). Ou seja, a ponteira que fornece menor potência foi, em um ponto específico do processo (8 minutos), capaz de liberar menor quantidade de proteína do interior da célula, aumentando a atividade específica da enzima alvo. Além disso, o menor aquecimento conferido, já que por limitação técnica fornece uma potência menor ao meio, pode ter reduzido o grau de desnaturação enzimática, resultado da menor dissipação de ondas ultrassônicas e consequente redução da dissipação de calor. Ainda em relação à atividade específica é possível verificar que esta se manteve praticamente constante durante o processo, quando se utilizou a ponteira intermediária, resultado da liberação simultânea

da enzima e demais proteínas do interior da célula da levedura. Já o ensaio com a microponteira apresentou uma queda drástica da atividade específica, ocasionada pela desnaturação enzimática após 22 minutos de processo e da ininterrupta liberação de proteínas para o meio contendo a enzima.

No presente estudo, o rendimento do processo com ultrassom foi superior quando se utilizou a ponteira intermediária, 876 U/g, quase duas vezes superior ao rendimento proporcionado pela utilização da microponteira, 480 U/g (Tabela 1). Já o rendimento, utilizando método de abrasão com pérolas de vidro, foi de 977,5 U/g, demonstrando que o processo ultrassônico apresenta-se como uma alternativa analítica eficiente para extração da enzima produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. O rendimento do processo que por muitas vezes é negligenciado deve ser levado em consideração, pois em muitos casos, pode inviabilizar e limitar o desenvolvimento e implementação de novas metodologias.

Diversos trabalhos publicados reportam a utilização eficiente do ruptor ultrassônico para os mais variados bioprodutos obtidos a partir de microorganismos. Medeiros et al. (2008) estudaram a extração da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, utilizando sistema de sonicação em combinação com o processo de abrasão com pérolas de vidro em uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro por mL de suspensão celular (diâmetro entre 0,95 - 1,05 mm), por um período de 40 min, o que proporcionou um rendimento do processo de extração de 550,4 U/g. O método combinado foi eficiente para a extração da enzima em escala laboratorial.

Gerde et al. (2012) utilizaram o método de extração ultrassônico para extração de lipídeos do interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, o qual se mostrou eficiente. Em ambos os tipos de algas, a extração de material intracelular aumentou com o aumento do tempo e da energia dissipada. No entanto, foi constatado que as condições operacionais devem ser bem estabelecidas e controlados, pois o processo sem controle pode resultar na formação de radicais livres que prejudicam a qualidade do óleo extraído neste processo.

Michelon et al. (2012) estudaram a extração de carotenóides de *Phaffia rhodozyma*, utilizando diversos métodos de extração, entre eles, a utilização de ultrassom. Este processo em conjunto com o congelamento da biomassa proporcionou uma extração de 88,3 μ g/g de carotenóides.

Fonseca et al. (2011) também realizaram a extração de astaxantina de

Phaffia rhodozyma NRRL-Y 17268, utilizando ondas de ultrassom. O método mostrou-se eficaz na ruptura da parede celular da levedura quando utilizado em conjunto com a secagem como pré-tratamento, alcançando atividade específica de astaxantina de 2198,4 μ g/g. Além disso, o método foi apontado como alternativa potencial em relação a outros métodos para determinação analítica.

Tabela 1 – Atividade, proteína, atividade específica e rendimento do processo de extração com a utilização de método ultrassônico.

Método de ruptura	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (U/g)
Ultrassom (Micro ponteira) *	19,2	4,3	7,7	480,0
Ultrassom (Ponteira intermediária) *	35,04	6,2	6,0	876,0
Abrasão** (Pérola de vidro e vórtex)	39,1	4,4	8,8	977,5

* valores máximos obtidos no acompanhamento do processo de extração utilizando ultrassom.

** valores no tempo de 40 minutos.

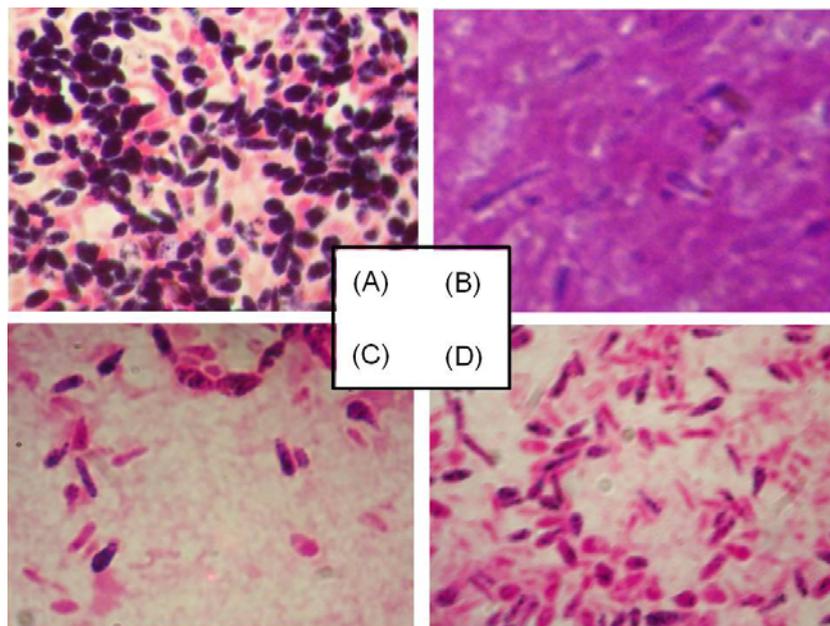
A ruptura das células da levedura foi verificada através da visualização por microscópica óptica, utilizando corante (combinação de cristal violeta/fucsina) e ampliação de 1000 vezes. Pela microscopia apresentada na Figura 3, é possível verificar que o método de extração, utilizando abrasão com pérolas de vidro (3B), resultou em maior ruptura das células em relação à célula da levedura sem tratamento (3A), confirmado pela maior atividade enzimática, seguido pelo método de ruptura, utilizando ponteira intermediária (3C) e, por último, a microponteira, que explica também a menor atividade enzimática.

Apesar dos ótimos resultados apresentadas por este método de extração, a temperatura, durante o processo, deve ser controlada, já que a dissipação das ondas na suspensão celular gera calor e pode resultar na desnaturação da enzima e consequente perda da eficiência do processo.

Se por um lado o aumento da temperatura deva ser observado com cautela e possa parecer um fator negativo à utilização deste método de extração, por outro temos que considerar e destacar as vantagens, já que o método mostrou-

se potencialmente eficiente para escala laboratorial, pois, além de resultar em atividade enzimática similar à técnica por abrasão, é uma técnica muito menos laboriosa, por não necessitar de trabalho manual constante. Além disso, a utilização da técnica de extração com ultrassom apresenta como vantagem o menor consumo de solvente, quando comparada aos métodos de extração com solventes, e a não exigência de equipamentos de alto custo (MELLO, LOBO E YABE, 2009) que, na maioria das vezes, inviabiliza a obtenção de determinado bioproduto.

Figura 3 – Células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 sem nenhum pré-tratamento (A); (B) Células após ruptura por abrasão; (C) Células após ruptura ultrassônica utilizando ponteira intermediária (D); células após ruptura ultrassônica utilizando micro ponteira.



Outra vantagem é que ao final do processo é necessário realizar apenas uma centrifugação para retirada do material celular disperso na solução aquosa, enquanto que no processo por abrasão é necessária uma etapa de filtração adicional para retirada do material abrasivo e posterior centrifugação para separar o material celular (Figura 1). Por mais simples que pareça a etapa adicional, qualquer alteração do processo pode prejudicar e até mesmo inviabilizá-lo, em razão de perdas do composto de interesse e aumento do custo de obtenção.

Assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos processos de extração

dos compostos de interesse devem ser constantemente abordados de modo a reduzir tempo de extração e, principalmente, aumentar o rendimento do processo.

Desta forma, concluímos que o método de extração, utilizando ruptor ultrassônico (frequência de 20KHz e potência máxima de 150 W) com ponteira intermediária (70% de potência), mostrou-se eficiente para utilização em escala laboratorial no processo de extração de β -galactosidase do interior das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, pois apresentou valores de atividade enzimática e rendimentos similares ao método de extração por abrasão que utiliza pérolas de vidro.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro das entidades: CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

- BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GBMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. **Food Research International**, v. 28, p. 37-41, 1995.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.
- GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.
- GURPILHARES, D. B.; PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C. Obtenção de glicose-6-Fosfato desidrogenase a partir de Células de *Candida guilliermondii* cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. 2003, Florianópolis: Simpósio Nacional de Fermentações, p. 1-7.
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 66-72, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of b-Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering Technology**, n. 35, v. 5, p. 911-918, 2012.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Optimization of ultrasonic extraction and analyses methodology by HPLC for determination of diuron and its metabolites in soil cultivation of sugar cane. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

NEVES, L.C.M. **Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de S.cerevisiae W303-181**. Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Fermentações), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and b-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

Received 19 October 2012

Accepted 26 March 2013