

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSILTRANSFERASE DE *Kluyveromyces marxianus* ISOLADA DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

**Ivelise Santiago Oliveira<sup>1</sup>; Sandra Aparecida Assis<sup>2</sup>; Elinalva Maciel Paulo<sup>3</sup>;  
Patrícia Morais Lopes Pereira<sup>4</sup>, Geise Camila de Araújo Ribeiro<sup>5</sup>**

Bolsista PROBIC/UEFS Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana<sup>1</sup>

[ivelisesantiago@hotmail.com](mailto:ivelisesantiago@hotmail.com)

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana<sup>2</sup>

[sandrinaassis@yahoo.com.br](mailto:sandrinaassis@yahoo.com.br)

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana<sup>3</sup>

[elinalvamaciel@yahoo.com.br](mailto:elinalvamaciel@yahoo.com.br)

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana<sup>4</sup>

[pml.pereira@hotmail.com](mailto:pml.pereira@hotmail.com)

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana<sup>5</sup>

[gkmila\\_ribeiro@yahoo.com.br](mailto:gkmila_ribeiro@yahoo.com.br)

PALAVRAS-CHAVE: Glicosiltransferase, atividade enzimática, semi-árido baiano

### INTRODUÇÃO

A pesquisa de enzimas de interesse industrial, principalmente produzidas por microrganismos sempre despertou grande interesse por parte dos pesquisadores. Como exemplo tem-se as glicosiltransferases, que são enzimas que catalisam a transferência de um monossacarídeo para um açúcar ativado (doador) geralmente por uma molécula de fosfato para um receptor (geralmente álcool ou uma amina). Este grupo de enzimas possui diferentes aplicações, seja no setor alimentício, farmacêutico e clínico. A sua obtenção é relativamente fácil, já que são produzidas por muitos microrganismos, como as leveduras que utilizam carboidratos, substrato este largamente encontrado na natureza (REIS, 2009).

O Semi-árido baiano apresenta em seu nicho diferentes linhagens de leveduras ainda não estudadas com tal finalidade. Portanto, é de grande interesse o isolamento de leveduras produtoras desse grupo de enzimas, bem como realização de experimentos relacionados à sua cinética de produção. Diante do exposto, este trabalho objetivou a obtenção de uma glicosiltransferase isolada de leveduras do semi-árido baiano e conhecer a cinética da sua produção, determinando a atividade enzimática durante toda a fase de crescimento celular da levedura selecionada.

### MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de levedura *kluyveromyces marxianus* (CCMB 322) foi obtida da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e foi mantidas em meio ágar YM (extrato de levedura 3% (p/v), extrato de malte 3% (p/v), peptona 5% (p/v), glicose 10% (p/v) e ágar 20% (p/v); pH 6,2). A levedura crescida no meio ágar YM foi diluída em solução salina estéril e 10% (v/v) do crescimento diluído inoculado em frascos contendo o meio mineral (extrato de levedura, 1 g; glicose, 10 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.5g; MgSO<sub>4</sub>, 0.25g; CaCl<sub>2</sub>, 0.25 g; H<sub>2</sub>O 1 L, pH 5.0) para a fermentação. A fermentação foi realizada utilizando-se uma incubadora do tipo shaker, sob agitação de 150 rpm, 28° C, por 48 h obtido conforme Oliveira (2007). O fermentado foi

então centrifugado (10000 rpm, 10 min, a 4° C) e o sobrenadante foi armazenado em tampão acetato 0,05M, pH 5,5.

#### Atividade enzimática do extrato enzimático

Em cada extrato foi realizada a atividade enzimática, através do método ácido 3-5-dinitrosalicílico - DNS (Miller, 1959), onde 150 µl da amostra juntamente com 150 µl de solução de sacarose a 10% (preparada em solução tampão acetato, pH 5,2) foi aquecida por 30 min em banho-maria a 40° C. Após aquecimento processou-se outra reação adicionando-se na mistura 300µl do reagente DNS, aquecendo-se novamente em banho-maria a 95°C, por 15 minutos. As misturas foram resfriadas e diluídas com três mL de água destilada, sendo imediatamente realizada a leitura em espectrofotômetro (540 nm). Esta leitura, através da curva padrão de glicose ajustada, nos permite quantificar o açúcar redutor liberado na cultura pela ação da enzima.

Após isso prosseguiu-se com a determinação da cinética de crescimento celular da levedura produtora da enzima e com a determinação da atividade enzimática durante toda a fase de crescimento celular.

#### Curva de crescimento celular

A cultura ativada da levedura selecionada foi inoculada em meio contendo a seguinte composição: sacarose 2%, extrato de levedura 0,1%, peptona 0,5%. pH 5,2. O meio foi incubado a 30° C com agitação de 150 rpm por 36h, sendo recolhida a cada 4 horas alíquotas para a leitura do crescimento celular por turbidimetria em espectrofotômetro (640 nm). Foi realizada também uma contagem em meio de cultura sólido YM (levedura-malte, pH 6,2) na alíquota que apresentou densidade ótica 0,0353, para posteriormente fazer a correlação entre o crescimento celular direto (contagem em meio sólido) com o crescimento celular indireto (turbidimetria). Através desta curva foi determinado a cinética do crescimento celular e a cinética da atividade enzimática.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### Cinética do crescimento exponencial

A figura 1 ilustra a curva de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Como o inoculo já continha células ativadas, a fase de latência não foi observada, estando às células desde o tempo zero de incubação na fase exponencial e em 12h já entrando na fase estacionária.

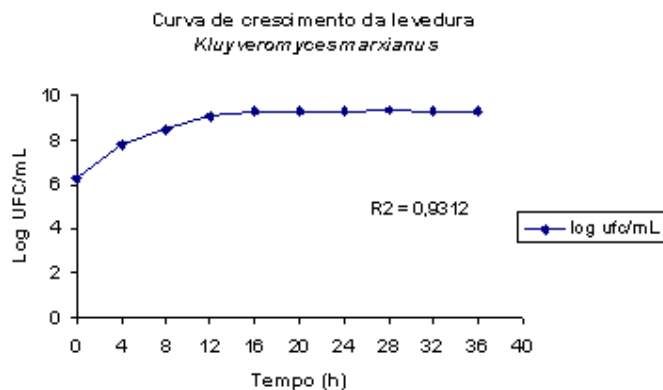


Figura 1. Curva de crescimento celular ( $R^2 = 0,9312$ ) da levedura *Kluyveromyces marxianus*

Com os dados da fase exponencial da curva de crescimento aplicou-se fórmulas específicas para os cálculos do tempo de geração e taxa específica de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*, encontrando-se os valores 2h e  $21 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

#### Cinética da atividade enzimática:

Os dados de atividade enzimática obtidos durante a curva de crescimento (figura 2), mostram que em 16 horas de incubação já apresenta uma expressiva atividade enzimática, atingindo o pico em 32 horas, indicando que a atividade da enzima produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ocorre na fase estacionária,

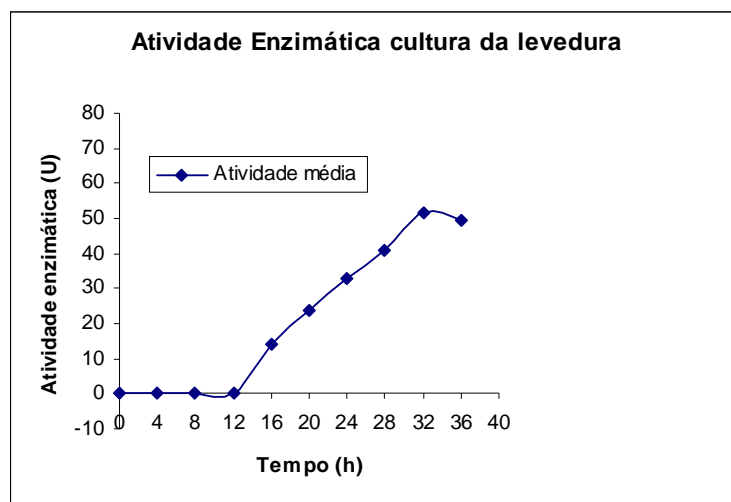


Figura 2. Atividades enzimáticas determinadas durante a curva de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Experimentos realizados por BOFO e colaboradores (2005) relacionados à produção da enzima invertase (um tipo de glicosiltransferase) em leveduras encontrou-se uma atividade enzimática de 50.6 U/mg de células (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763), corroborando com o resultado encontrado pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, que teve uma atividade enzimática máxima de 51,52 U/mL. Estes autores encontraram ainda no trabalho citado uma atividade enzimática de 110,0 U/mg para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX, apresentando esta última um valor bem mais expressivo do que a levedura em estudo.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se inferir que o extrato enzimático identificado como 322 produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* possui uma boa atividade enzimática, atingindo o ápice dessa atividade em 32h de incubação, que coincide com a fase estacionária da curva de crescimento. Esta levedura possui um tempo de geração curto (2h) e uma alta taxa específica de crescimento ( $21 \text{ min}^{-1}$ ), características estas, desejáveis para a sua utilização na produção de células ou produtos microbianos de interesse industrial.

## REFERÊNCIAS

- BOFO, et al. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. *Braz. J. Food Technol.*, 5° SIPAL, 2005.
- MILLER, G. L. "Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428, 1959.
- REIS, GIANN BRAUNE. *Simulação e Controle do Processo de Produção de Levedura*. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Carlos. São Carlos: UFSCar, 2009.
- OLIVEIRA, R. Q. *Bioprospecção de micro-organismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do semi-árido baiano*. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.