

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO, COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SACARASE E ISOMALTASE VISANDO UTILIZÁ-LAS COMO COADJUVANTE NA TERAPIA DA INTOLERÂNCIA A SACAROSE-ISOMALTOSE

Patrícia Morais Lopes Pereira¹; Elinalva Maciel Paulo²; Sandra Aparecida Assis³.

Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC-CNPq¹

pml.pereira@hotmail.com

Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas²

elinalvamaciel@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Saúde³

sandrinhaassis@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: leveduras, sacarase-isomaltase, intolerância a sacarose.

INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares de ampla distribuição ambiental (PLAFF e STARMER, 1987) isoladas facilmente de alimentos vegetais como frutas e legumes. A região do semi-árido baiano encontra uma vasta diversidade de micro-organismos ainda não explorados com grande expectativa de prospecção biotecnológica. As leveduras se situam neste cenário, por serem produtoras de diferentes tipos de metabólitos como enzimas, corantes e biopolímeros. (JAYANI et al., 2005).

A sacarase-isomaltase é uma enzima que metaboliza a sacarose e certas partes do amido. A sua deficiência no organismo causa a Intolerância à sacarose-isomaltose que constitui uma anomalia congênita, cuja transmissão se dá através de caráter autossômico recessivo que constitui a segunda deficiência primária de dissacarídeos mais frequente na espécie humana com prevalência entre 0,1 e 0,5%. A apresentação clínica é variável e ocorre, provavelmente, devido aos diversos tipos de defeitos tendo início após a introdução desses açúcares na dieta da criança. A diarreia é o sinal mais frequente e pode ser intermitente, volumosa, líquida, acompanhada de distensão abdominal e eventualmente vômitos. Há diminuição ou parada no ganho de peso e dermatite perianal é constante. Se o paciente não tiver o tratamento adequado pode ser fatal (BOZANO et al, 1990). Não existe cura para esta doença, mas a mesma pode ser controlada através da introdução da enzima sacarase na dieta, que pode ser capaz de exercer efeito na hidrólise da sacarose em intestino de portadores dessa deficiência, evitando-se os efeitos da má-absorção e da diarreia.

As leveduras normalmente sintetizam a sacarase e raramente a isomaltase, ambas as enzimas catalisam a hidrólise e fermentação da α -1,6-glucosídeos (tais como sacarose e isomaltose, respectivamente) (TESTE, et al, 2010). A utilização de leveduras com perfil metabólico para a produção destas duas enzimas atua como coadjuvante no tratamento da intolerância a sacarose, exercendo efeito probiótico de grande eficácia. Assim, é de grande interesse a seleção de leveduras produtoras destas enzimas, visando a sua utilização futura como probiótico para controlar e/ou minimizar os efeitos maléficos causados pela deficiência da sacarose-isomaltose em indivíduos portadores desta anomalia.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados cinco extratos enzimáticos purificados (identificados como 300, 306, 322, 327 e 33D1) produzidos por leveduras isoladas da região do semi-árido baiano.

Em cada extrato foi realizada a atividade enzimática, através do método 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 3 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.

O extrato 322 foi selecionado para dar prosseguimento ao estudo 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.

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 40h, 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 à cinética do crescimento celular e a cinética da atividade enzimática.

A atividade enzimática foi realizada em todas as alíquotas coletadas durante o período da incubação (40h) utilizando o método de Miller (1959).

Foi realizado um planejamento experimental pelo Método de Superfície de Resposta (MSR). Para tal foram utilizados 10 ensaios (em erlenmyer com capacidade de 100mL, contendo 80 mL de meio de cultura em cada um deles). Em cada erlenmeyer foi adicionado 1mL da solução de salina contendo a levedura. Os meios inoculados foram colocados no agitador orbital a temperatura de 28°C e 180 rpm de agitação constante por 40 horas. Após esse período foi realizada a centrifugação dos meios para a obtenção dos extratos enzimáticos, sob rotação de 2800 rpm durante 15 minutos. Realizou-se a determinação enzimática de cada extrato bruto obtido através do método de Miller (1959). O extrato enzimático de maior atividade enzimática foi selecionado para prosseguir com a otimização das condições da reação enzimática (temperatura e pH), utilizando o mesmo modelo do planejamento experimental anterior.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A determinação da atividade enzimática pode ser feita através da dosagem da glicose, pois no meio alcalino do reagente DNS utilizado para revelar o produto formado, a frutose é convertida em glicose. A glicose (açúcar redutor) reduz o DNS fornecendo um produto de cor característica, cuja formação pode ser acompanhada a 540nm (por isso as absorbâncias são lidas sob este comprimento de onda).

Segundo o método de Miller, cinco extratos enzimáticos foram testados, o extrato identificado como 33D1 apresentou maior atividade enzimática, mas foi escolhido o extrato 322 para o prosseguimento do experimento, por se tratar de um extrato obtido da linhagem da levedura *Kluyveromyces marxianus*, que já vem sendo utilizada rotineiramente em outros trabalhos, visando à obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

Para acompanhamento do crescimento da levedura e construção da sua curva de crescimento, foram feitas coletas a cada 4 horas e feitas leituras em espectrofotômetro para análise indireta espectrofotométrica a densidade ótica (D.O.) da cultura, essa avaliação da

turbidez da cultura é constituída por um método rápido, indireto, de estimar a concentração celular.

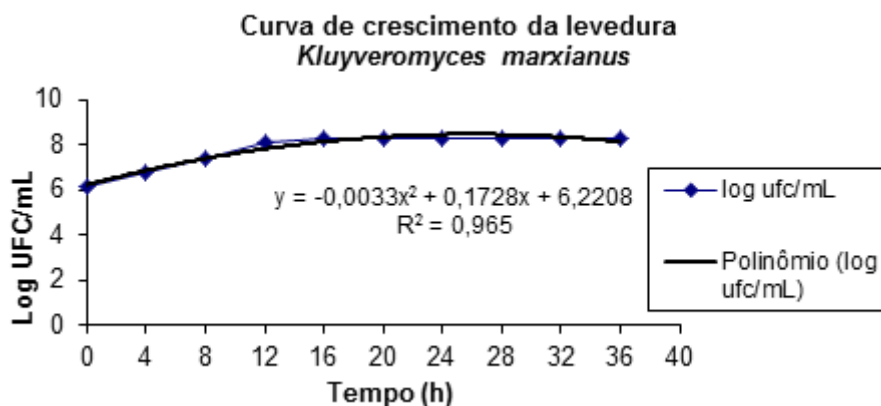


Figura 1: Curva de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*

Os dados de atividade enzimática obtidos durante a curva de crescimento (figura 1) e da cinética da produção da sacarase (figura 2) mostram que em 16 horas de incubação a levedura *Kluyveromyces marxianus* já apresenta uma expressiva atividade enzimática, tendo um valor máximo de atividade enzimática e do conteúdo protéico total em 40h, que corresponde ao final do período de incubação.

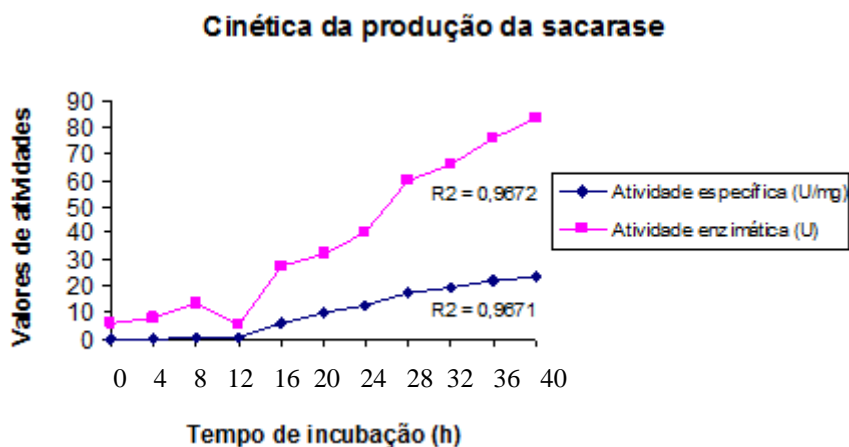


Figura 2: Cinética da produção da sacarase

A Figura 3 apresenta a superfície construída para a atividade da sacarase variando os níveis sacarose e extrato de levedura. Nela observa-se que a máxima produção da sacarase ocorre para valores de sacarose de 9,16 g/L e de extrato de levedura 2,20 g/L, sendo então a atividade de 13,20 U. Este valor está próximo do valor experimental obtido nas condições (sacarose 10 g/L e extrato de levedura 2,0 g/L) que é de 12,92 U.

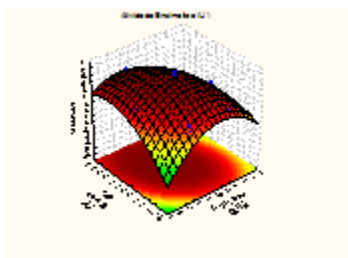


Figura 3: Superfície de resposta (variações dos níveis de concentração da sacarose e do extrato de levedura)

Com relação à atividade da sacarase variando os níveis temperatura e pH no processo da ativação, observou-se que as melhores condições de ativação da enzima foi temperatura 60° C e pH 4,5(figura 3), onde obteve-se uma atividade enzimática de 41,71911 U. O R^2 foi 0,98695, porém a “falta de ajuste” foi significativo a nível de 5% ($p = 0,001779$), provavelmente devido às respostas terem apresentados valores bem distantes (mínimo de 1,91 e máximo 41,71911) (tabela 1).

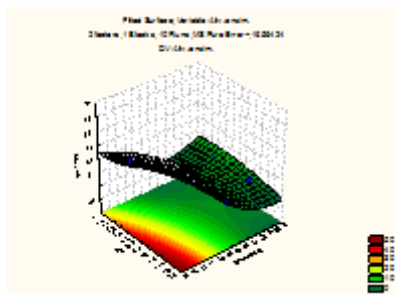


Figura 4: Superfície de resposta (variações dos níveis de temperatura e pH)

Tabela1: Determinação da atividade enzimática (U) do extrato enzimático obtido após planejamento experimental – DNS (540NM)

AMOSTRA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U)
A1	3,235044
A2	1,915322
A3	7,785631
A4	7,470068
A5	7,953861
A6	7,075091
A7	7,881762
A8	2,328061
A9	41,71911
A10	26,98273

Diante dos resultados pôde-se observar que seu tempo de geração é de 4,30 horas e sua taxa de crescimento 0,18h⁻¹ ou 10,8 min⁻¹, tendo um valor máximo de atividade enzimática e do conteúdo protéico total em 40h, que corresponde ao final do período de incubação. Não sendo possível determinar os valores ótimos das atividades, devido não ter prosseguido com a curva de crescimento até chegar ao decréscimo da produção enzimática.

Os experimentos realizados para a otimização da produção enzimática demonstraram que para maximizar a produção da enzima pela levedura *Kluyveromyces marxianus* incubadas por 40h a 28° C sob agitação de 150 rpm, deve-se utilizar 10g/L de sacarose e 2 g/L de extrato de levedura para a obtenção do caldo fermentativo e as melhores condições para obtenção de maior atividade enzimática são pH 4,5 a 60°C.

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.