

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUCIANE PADILHA MENA

**OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE A
PARTIR DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES*
MARXIANUS CCT 7082**

**Bagé
2015**

LUCIANE PADILHA MENA

**OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE A
PARTIR DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES*
MARXIANUS CCT 7082**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Paula
Manera

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline
Costa Moraes

**Bagé
2015**

Dedico este trabalho ao Miguel, a
melhor parte de mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos bons espíritos que me guiam, protegem e iluminam todos os dias.

À professora Ana Paula Manera por todos esses anos de orientação, de paciência e de conhecimentos valiosos. E, também, por ser a melhor “mãe-científica” que alguém poderia ter.

À professora Caroline Moraes pelo exemplo de profissional e por todo o tempo de laboratório, no qual eu muito aprendi e me diverti com seus ensinamentos.

Ao Luciano por ser o melhor técnico, pela disposição e pela ajuda em incontáveis momentos deste trabalho.

À professora Fernanda Gautério por ter aceitado participar da banca e por suas sugestões sempre valiosas. Ao professor Paulo Duarte pela atenção e dedicação de sempre. Aos demais professores do curso por todos os ensinamentos, os quais sem dúvidas foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Fapergs e a Unipampa/PBDA pelas bolsas concedidas. À Furg e a Unicamp pela concessão da levedura.

À minha mãe Arli por todo amor a mim dedicado e por ter sempre confiado em mim e no meu potencial. Ao meu pai Vicente por ter me proporcionado inúmeros aprendizados e oportunidades.

Às minhas irmãs Liziane e Odaiza pela amizade e pela cumplicidade. Vocês são as melhores!

À minha dinda Gisele por todo carinho e amizade sincera. Às minhas tias e primos por todo apoio e torcida.

Ao Peri por ser meu companheiro e meu amigo. Por me apoiar, me estimular e me encorajar sempre. Eu te amo!

A toda a família do Peri, em especial aos seus pais, por terem me acolhido e auxiliado durante toda a minha graduação.

À Jêniifer e à Aline por toda amizade e por me compreenderem em momentos difíceis.

Às minhas amigas queridas, Mariana, Laura, Patricia, Flávia, Sabrina, Isadora e Milene, por sempre estarem lá quando eu preciso, por todo apoio e pelos momentos divertidíssimos.

E, por último, mas não menos importante: ao Miguel. Por ter, com sua chegada, iluminado a minha vida e me proporcionado o conhecimento pleno da palavra AMOR.

“Não há problema que não possa ser
solucionado pela paciência.”

Chico Xavier

RESUMO

As enzimas são biocatalisadores de grande interesse industrial, pois apresentam vantagens frente aos catalisadores químicos e representam alternativa sustentável aos processos industriais. A β -galactosidase é uma importante enzima, possuindo inúmeras aplicações na indústria de alimentos, dentre as quais, destacam-se a hidrólise da lactose e a síntese de galacto-oligossacarídeos. A levedura *Kluyveromyces marxianus* é importante fonte de β -galactosidase, a qual quando produzida por este micro-organismo é intracelular. A permeabilização celular é uma técnica alternativa que visa o acesso aos compostos intracelulares sem que seja preciso submeter a célula a drásticos tratamentos. Solventes orgânicos e detergentes são reportados na literatura para permeabilização de células microbianas com bons resultados. Após a obtenção da enzima é necessário o emprego de técnicas para a conservação, que colaborem para a manutenção da atividade enzimática durante o período de armazenamento. Este trabalho teve como objetivo empregar solventes orgânicos e detergentes em diferentes concentrações para a permeabilização de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, bem como avaliar o emprego de ultra-congelamento (-86°C) e liofilização como formas de conservação da enzima β -galactosidase nas células permeabilizadas. Os agentes permeabilizantes testados foram: álcool metílico, acetona, isopropanol, etanol, acetato de etila, hexano, Tween 20 e Triton X-100. As concentrações testadas variaram de 20 a 50% (p/v) e 100% para os solventes e de 0,5 a 1,5% (p/v) para os detergentes. Os agentes permeabilizantes foram preparados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Os solventes apresentaram melhores resultados de permeabilização que os detergentes testados. O álcool metílico 35% (p/v) foi escolhido como o melhor agente permeabilizante e as células permeabilizadas com esse agente foram submetidas a dois tratamentos de conservação (ultra-congelamento a -86°C e liofilização). Realizou-se o acompanhamento da atividade da enzima antes e após 24 horas dos tratamentos de conservação e a cada 5 dias, durante o período total de 30 dias. A liofilização resultou em perda de mais de 50% da atividade da enzima em 20 dias. Já, o ultra-congelamento proporcionou maior permeabilização das células após 24 horas do tratamento e manutenção da atividade enzimática superior ao valor inicial ao longo de 25 dias. Nas células mantidas congeladas a -86°C em 30 dias notou-se redução de 13,42% da atividade inicial da enzima. Nesse sentido, a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* para obtenção de β -galactosidase foi eficaz. No entanto,

maiores estudos a respeito dos métodos de conservação da enzima em células permeabilizadas, são necessários de forma a viabilizar o seu uso industrialmente.

Palavras-Chave: lactase, permeabilização, armazenamento, atividade enzimática, liofilização, ultra-congelamento.

ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts of great industrial interest, since they have advantages over chemical catalysts and represent sustainable alternative to industrial processes. The β -galactosidase is an important enzyme having numerous applications in the food industry, among which stands out the hydrolysis of lactose and the synthesis of galacto-oligosaccharides. The *Kluyveromyces marxianus* yeast is an important source of β -galactosidase, which when produced by this microorganism is intracellular. Cell permeabilization is an alternative technique which seeks access to intracellular compounds without having to undergo drastic treatments cell. Organic solvents and detergents are reported in the literature for permeabilization of microbial cells with good results. After obtaining the enzyme is necessary to use techniques for conservation, to cooperate for the maintenance of enzyme activity during the storage period. This study aimed to employ organic solvents and detergents in different concentrations to the yeast cell permeabilization *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, and to evaluate the use of ultra-freezing ($-86\text{ }^{\circ}\text{C}$) and lyophilization as forms of conservation of enzyme β -galactosidase activity in permeabilized cells. Permeabilizants agents tested were: methyl alcohol, acetone, isopropanol, ethanol, ethyl acetate, hexane, Tween 20 and Triton X-100. The concentrations tested ranged from 20 to 50% (w / v) and 100% for the solvent and from 0.5 to 1.5% (w / v) to detergents. The permeabilizants agents were prepared in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The solvents outperformed permeabilization that the tested detergents. Methyl alcohol 35% (w / v) was chosen as the best permeabilizer and the cells permeabilized with this agent were subjected to two treatments preservation (freezing to ultra $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilization). We carried out the monitoring of enzyme activity before and after 24 hours of preservation treatments and every 5 days during the whole period of 30 days. Lyophilization resulted in a loss of more than 50% of the enzyme activity at 20 days. Since the ultra-freezing afforded increased permeabilization of the cells after 24 hours of treatment and the maintenance of enzyme activity higher than the initial value over 25 days. In the cells kept frozen at $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ was noted within 30 days a reduction of 13.42% of the initial enzyme activity. Accordingly, the permeabilization of yeast *Kluyveromyces marxianus* cells to obtain β -galactosidase was effective. However, further studies on the enzyme conservation methods in permeabilized cells, are needed in order to enable its use industrially.

Keywords: lactase, permeability, storage, enzyme activity, freeze drying, ultra-freeze.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de lactose	21
Figura 2 - Hidrólise da lactose pela ação da enzima β -galactosidase	22
Figura 3 - Comparação entre o rompimento total da célula e a permeabilização celular	26
Figura 4 - Estrutura da parede celular de leveduras.....	27
Figura 5 - Efeito dos solventes na permeabilização de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082. Teste de Tukey entre as concentrações de cada agente permeabilizante representado pelas legendas acima das barras. Legendas iguais indicam que não houve diferença significativa nos resultados a um nível de 95% de confiança.	36
Figura 6 - Efeito dos detergentes na permeabilização de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082. Teste de Tukey entre as concentrações de cada agente permeabilizante representado pelas legendas acima das barras. Legendas iguais indicam que não houve diferença significativa nos resultados a um nível de 95% de confiança.	37
Figura 7 - Atividade máxima para solventes e detergentes. Teste de Tukey representado pelas letras. Letras iguais denotam que não houve diferença significativa entre os tratamentos a um nível de 95% de confiança	41
Figura 8 - Análise microscópica com aumento de 100 vezes das células da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082 (a) Controle - células não permeabilizadas (b) Células permeabilizadas com álcool metílico 35% (p/v).....	42
Figura 9 - Estabilidade da enzima β -galactosidase em células permeabilizadas de levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082, utilizando álcool metílico 35% (p/v) ao longo do tempo de armazenamento.	44
Figura 10 – Análise microscópica com aumento 100 vezes das células permeabilizadas da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> após tratamentos de (a) ultra-congelamento e (b) liofilização.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de pessoas que apresentam algum grau de intolerância à lactose em diferentes regiões geográficas	20
Tabela 2 - Concentrações testadas para cada agente permeabilizante	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

GOS – Galacto-oligossacarídeos

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

*o*NPG – *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

LS – N-Lauroyl sarcosine

CTAB – Cetiltrimetilamônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Enzimas	18
2.2 Enzima β -galactosidase	19
2.2.1 Aplicações industriais	20
2.2.2 Fontes de obtenção	22
2.2.2.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	24
2.3 Obtenção de enzimas intracelulares a partir de micro-organismos.....	25
2.3.1 Permeabilização celular	26
2.4 Estabilidade de biocompostos.....	28
2.5 Métodos de conservação de compostos biológicos.....	30
2.5.1 Congelamento.....	30
2.5.2 Liofilização	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Produção da enzima β -galactosidase.....	33
3.2 Permeabilização das células.....	33
3.3 Estudo da conservação da enzima em células permeabilizadas.....	34
3.4 Métodos analíticos.....	35
3.4.1 Determinação da atividade enzimática	35
3.4.2 Determinação da concentração celular	35
3.4.3 Microscopia ótica	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Permeabilização das células da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	36
4.2 Estabilidade da enzima β -galactosidase	43
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	49

REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE A.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos estão sendo amplamente estudados, principalmente devido a crescente preocupação com a sustentabilidade e políticas ambientais, que torna necessária a implementação de processos mais eficientes e que utilizem-se de insumos renováveis (COELHO et al., 2001; POLITZER; BON, 2006).

A evolução da biotecnologia possibilitou a obtenção de produtos a partir de micro-organismos, dentre os quais destacam-se as enzimas, biocatalisadores de grande interesse industrial (MONTEIRO; SILVA, 2009; PANESAR, 2008). A indústria de enzimas tem apresentado rápido crescimento, em especial porque esses biocatalisadores apresentam vantagens frente aos catalisadores químicos, além de serem uma alternativa sustentável aos processos industriais (COELHO et al., 2001; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; MONTEIRO; SILVA, 2009).

A β -galactosidase, mais comumente conhecida como lactase, é uma importante enzima empregada com sucesso nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e na medicina (MONTEIRO; SILVA, 2009). Esta enzima possui duas aplicações principais: a hidrólise da lactose do leite e de produtos derivados, possibilitando o consumo desses produtos por pessoas intolerantes a esse carboidrato e a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS), considerados alimentos prebióticos (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; HUSAIN, 2010; LADERO et al., 2001; PANESAR, 2008). Além disso, a β -galactosidase é amplamente utilizada na indústria de alimentos para aumentar a doçura, solubilidade, sabor e digestibilidade de produtos lácteos (BON; FERRARA; CORVO, 2008; GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008). Estima-se que cerca de 75% da população mundial apresente algum grau de intolerância à lactose, tornando importante a produção de produtos isentos deste carboidrato (HUDSON, 2011).

A exemplo de outras enzimas, a β -galactosidase pode ser produzida por micro-organismos. E, quando proveniente da levedura *Kluyveromyces marxianus* possui maiores atividades para valores de pH entre 6,0 e 7,0, tornando-a ideal para tratamento de leite e produtos derivados, os quais possuem pH próximo à neutralidade. Além disso, esse micro-organismo é classificado como *Generally Recognized as Safe*¹ (GRAS), o que possibilita sua utilização em indústrias de alimentos.

¹ Geralmente reconhecido como seguro

Segundo Panesar (2008), a β -galactosidase produzida por leveduras é uma enzima intracelular e sua extração é difícil e trabalhosa. A permeabilização celular é um método alternativo que visa a obtenção de compostos intracelulares, privando a célula de drásticos tratamentos utilizados em outros processos, como elevadas forças de cisalhamento ou condições extremas de temperatura. Quando permeabilizada a célula retém em seu interior seus compostos intracelulares, porém permite a passagem através da membrana celular de pequenas moléculas e solutos, incluindo a lactose. Assim, a enzima permanece no interior da célula de forma naturalmente imobilizada. Diversos estudos apontam o emprego bem sucedido de solventes orgânicos e detergentes na permeabilização de células microbianas (FELIX, 1982; KAUR et al., 2009; PANESAR et al., 2007).

A manutenção da atividade enzimática durante o armazenamento é um dos critérios que determinam o potencial de utilização de enzimas em processos industriais. Algumas técnicas como liofilização, secagem, refrigeração e congelamento são relatadas na literatura como formas de conservação de compostos biológicos (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2013; DAY; STACEY, 2007; TSEN et. al, 2007; VOLKERT et al., 2008).

Jesus (2002) destaca que a conservação de enzimas envolve tecnologias sofisticadas e caras, sendo de grande interesse a elucidação de um método que permita conservar a atividade enzimática original e seja economicamente viável. No entanto, não existem estudos com esta abordagem para a β -galactosidase obtida a partir de células permeabilizadas.

Então, a enzima β -galactosidase é um biocatalisador de grande interesse industrial, especialmente no que tange a hidrólise da lactose do leite para a produção de produtos isentos desse carboidrato destinados a parcela da população que possuem algum grau de intolerância a esse dissacarídeo. E, a levedura *Kluyveromyces marxianus* é um micro-organismo com potencial a produção dessa enzima, sendo considerado um micro-organismo seguro, o que viabiliza seu uso na indústria de alimentos.

Faz-se necessário, portanto, o estudo de métodos de permeabilização celular, tendo em vista a obtenção da enzima. Além disso, não foram encontrados estudos acerca da conservação de enzimas em células microbianas permeabilizadas. Portanto torna-se necessário, ainda, a elucidação de técnicas para o armazenamento das células permeabilizadas que colaborem para a manutenção da atividade enzimática.

Em vista do exposto, desenvolveu-se o presente trabalho, onde o objetivo foi testar diferentes solventes orgânicos e detergentes na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e avaliar a estabilidade da enzima β -galactosidase em células

permeabilizadas, ao longo do tempo de armazenamento, empregando diferentes técnicas de conservação. Para o cumprimento deste objetivo, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- a) avaliar o uso de solventes orgânicos (acetona, álcool metílico, isopropanol, etanol, hexano e acetato de etila), em diferentes concentrações na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082;
- b) avaliar o uso de detergentes (Tween 20 e Triton X-100), em concentrações variadas na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082;
- c) definir o melhor agente permeabilizante, dentre os testados, e sua melhor concentração tendo em vista a atividade da enzima β -galactosidase;
- d) empregar ultra-congelamento e liofilização como formas de conservação da enzima β -galactosidase, obtida a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, e acompanhar a estabilidade da atividade enzimática por 30 dias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores de origem proteica que atuam fundamentalmente como catalisadores das reações do metabolismo celular (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; NELSON; COX, 2011). Possuem a propriedade de aumentar a velocidade de uma reação química sem serem alteradas ou consumidas durante o processo (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

São catalisadores altamente específicos para a reação que catalisam e seletivos, interagindo com um ou poucos substratos. Além da alta especificidade e seletividade, do ponto de vista industrial, as enzimas apresentam vantagens, quando empregadas em lugar dos catalisadores químicos, como condições suaves de reação e a redução dos problemas ambientais e toxicológicos, pois são produtos biológicos naturais e biodegradáveis. Além disso, esses biocompostos são facilmente encontrados na natureza e possuem maior sensibilidade ao controle catalítico (ARROYO, 1998; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; MONTEIRO; SILVA, 2009; OLIVEIRA, 2007).

O poder catalítico das enzimas está relacionado com a sua conformação nativa e depende de condições específicas de temperatura, pH e força iônica do meio. Condições afastadas da ótima podem incorrer em mudanças na estrutura tridimensional nativa, levando a desnaturação enzimática e perda da atividade catalítica da biomolécula (BON; FERRARA; CORVO, 2008; FISCHER et al., 2002).

Como são responsáveis por diversas reações metabólicas, as enzimas estão presentes em todas as células vivas, podendo ser obtidas através de fontes animais, vegetais e microbianas. No entanto, apesar de alguns biocatalisadores ainda serem obtidos a partir de tecidos animais e vegetais, a maioria provém de fontes microbianas (BON; FERRARA; CORVO, 2008; PANESAR; MARWAHA; CHOPRA, 2010).

2.2 Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23), conhecida por lactase, é classificada como hidrolase, tratando-se, portanto, de uma enzima que catalisa a quebra das ligações através da adição de água (CHAMPE; HARVEY; FERIER; 2006; PANESAR; MARWAHA; CHOPRA, 2010).

Esta enzima é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β -1 – 4Glc) originando uma mistura isomolecular de dois monossacarídeos: a glicose e a galactose (KLEIN, 2010; SANTIAGO et al., 2004; SCHOLZ, 2011).

Além disso, a β -galactosidase é uma das mais importantes enzimas empregadas em processos industriais, principalmente na indústria de laticínios com a finalidade de hidrolisar a lactose e produzir produtos próprios ao consumo de pessoas intolerantes a esse dissacarídeo (HEYMAN, 2006; KIM; RAJAGOPAL, 2000; NERI et al., 2008; PANESAR et al., 2006).

Hudson (2011) relata que cerca de 75% da população mundial apresenta algum grau de intolerância à lactose. Essa condição é mais evidente em algumas raças e está diretamente relacionada ao hábito de consumir produtos que contenham quantidades significativas de lactose, como o leite. O mesmo autor, em pesquisa realizada em diversos estudos (Tabela 1), concluiu que em regiões onde o leite não faz parte tradicionalmente da dieta, a intolerância à lactose pode chegar a valores acima de 90%.

Tabela 1 – Percentual de pessoas que apresentam algum grau de intolerância à lactose em diferentes regiões geográficas

Etnia/ Região geográfica	Pessoas com algum grau de intolerância à lactose (%)
1. Leste Asiático	90 – 100
2. Indígenas/ América do Norte	80 – 100
3. Ásia Central	80
4. Afro-americanos/ América do Norte	75
5. Africanos/ África	70 – 90
6. Indianos/ Sul da Índia	70
7. Franceses/ Sul da França	65
8. Judeus Ashkenzi/ América do Norte	60 – 80
9. Região dos Balcãs	55
10. Latinos / Hispâncos/ América do Norte	51
11. Indianos/ Norte da Índia	30
12. Anglo/ América do Norte	21
13. Italianos/ Itália	20 – 70
14. Franceses/ Norte da França	17
15. Finlandeses/ Finlândia	17
16. Austríacos/ Áustria	15 – 20
17. Alemães/ Alemanha	15
18. Britânicos/ Reino Unido	5 – 15

Fonte: Hudon (2011)

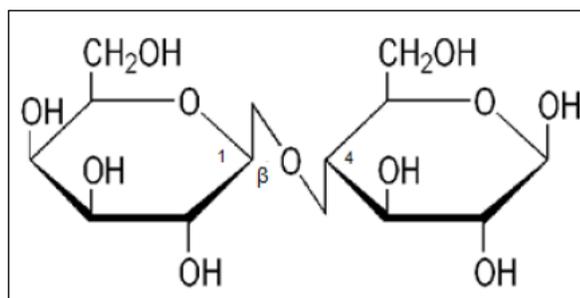
2.2.1 Aplicações industriais

A β -galactosidase possui, além da propriedade de hidrolisar a lactose, a capacidade de transgalactosilar a galactose produzindo galacto-oligossacarídeos (GOS), os quais são utilizados em indústrias de alimentos e de medicamentos. Esses compostos possuem características promotoras da saúde e podem ser considerados prebióticos. O aumento de absorção de nutrientes, como cálcio e magnésio, e a eliminação de compostos tóxicos do

organismo são alguns dos benefícios do consumo de GOS (GOSLING et al., 2010; MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008; TOMAL et al., 2010).

A lactose (Figura 1), ou α - β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glicose, é o principal açúcar presente no leite da maioria dos mamíferos. É um dissacarídeo, de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$, composto por monômeros de glicose e galactose unidos por meio de uma ligação glicosídica β -1-4 (PANESAR et al., 2006; SCHOLZ, 2011; YANG; SILVA, 1995).

Figura 1 - Molécula de lactose



Fonte: Scholz (2011)

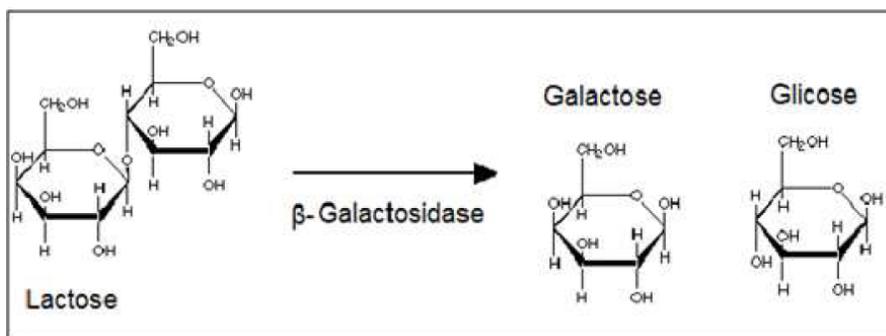
A lactose é um açúcar redutor e, quando comparada a outros açúcares, apresenta baixa solubilidade em água e baixa doçura. A solubilidade da lactose aumenta com o aumento da temperatura e sua doçura relativa é de apenas cerca de 30% em relação à sacarose (AMMAM; FRANSAER; 2010, GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; PANESAR et al., 2006).

Para sua absorção e utilização pelo organismo, a lactose precisa ser hidrolisada em açúcares mais simples e que possam ser mais facilmente absorvidos pelo organismo. A enzima β -galactosidase é produzida pelas vilosidades intestinais e através da hidrólise da molécula de lactose quebra as ligações entre glicose e galactose, os quais são açúcares de fácil absorção pelo organismo (BACELAR JÚNIOR; KASHIWABARA; NAKAOKA, 2013; INTOLERÂNCIA, 2010).

Industrialmente, a hidrólise da lactose pode ser realizada por tratamento ácido ou através da catálise enzimática empregando a enzima β -galactosidase. Na hidrólise ácida, no entanto, são empregadas condições drásticas de pH (1,0-2,0) e temperatura (100°C-150°C), as quais comprometem o uso direto dos produtos finais em processos alimentícios (CARMINATTI, 2001; FREITAS, 2013; INTOLERÂNCIA, 2010). Já, na hidrólise enzimática são empregadas condições mais amenas de pH (3,5-8,0) e temperatura (5°C-60°C)

(GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998). A enzima β -galactosidase age hidrolisando a lactose em seus monossacarídeos constituintes, conforme a Figura 2.

Figura 2 - Hidrólise da lactose pela ação da enzima β -galactosidase



Fonte: Scholz (2011)

Além do uso de condições mais brandas de reação, quando emprega-se a hidrólise enzimática obtêm-se maiores rendimentos e não ocorrem reações de escurecimento nos produtos, as quais estão presentes no processo ácido (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998).

Além disso, a β -galactosidase também pode ser utilizada em indústrias alimentícias como forma de evitar a cristalização da lactose, através da sua hidrólise, em produtos com elevados teores desse açúcar, como sorvetes, leite condensado, leites concentrados congelados, entre outros. A cristalização da lactose nesses produtos resulta em texturas arenosas, farinhentas e desagradáveis. O emprego da β -galactosidase promove a redução da concentração de lactose a valores aceitáveis, contribuindo para a melhora da qualidade sensorial e para o aumento da digestibilidade, cremosidade e suavidade desses produtos (BON; FERRARA; CORVO, 2008; DAGBALI; GOKSUNGUR, 2008; GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008).

2.2.2 Fontes de obtenção

As β -galactosidases estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser obtidas através de fontes naturais, como plantas, animais, bactérias, fungos filamentosos (enzimas extracelulares) e leveduras (enzimas intracelulares) (RICHMOND; GRAY; STINE, 1981).

A obtenção a partir de fontes microbianas é mais interessante quando comparada às demais fontes, devido ao fácil manuseio e às elevadas taxas de multiplicação e rendimento (PANESAR et al., 2006). Segundo Bon, Ferrara e Corvo (2008) as fontes microbianas são mais vantajosas quando comparadas às fontes animais e vegetais devido “à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade da produção de enzimas por processos fermentativos em grande escala com a regularidade necessária e à simplicidade dos requerimentos nutricionais”.

Dentre os micro-organismos produtores de β -galactosidases destacam-se os fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp.; as leveduras, especialmente as do gênero *Kluyveromyces* e; as bactérias, como *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* e *Bacillus stearothermophilus* (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; JURADO et al., 2002; PANESAR et al., 2006; ZHOU; CHEN, 2001). As condições ótimas de atividade da enzima, tais como pH e temperatura, dependem das suas fontes de obtenção e permitem selecionar a lactase mais apropriada para uma aplicação específica (KLEIN, 2010; RICHMOND; GRAY; STINE, 1981).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) especifica, através da Resolução RDC n° 99/2009, que a enzima β -galactosidase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, obtida a partir de fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) ou leveduras (*Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces* sp) (BRASIL, 2009). Esses micro-organismos possuem status GRAS, o qual é importante critério para sua aplicação e de seus produtos em processos industriais que envolvam produtos alimentícios.

As β -galactosidases obtidas a partir de fungos filamentosos são extracelulares e geralmente possuem maiores valores de atividade enzimática para a faixa de pH entre 2,5-5,4, sendo empregadas de forma eficaz na hidrólise da lactose presente em produtos ácidos, como o soro de leite acidificado. A temperatura ótima para a atividade das β -galactosidases fúngicas é relativamente alta, estas enzimas são estáveis e tipicamente utilizadas em temperaturas na faixa de 50-60°C (HUSAIN, 2010; PANESAR et al., 2006).

Já, as β -galactosidases provenientes de leveduras são enzimas intracelulares e termossensíveis, com atividades ótimas, em geral, relacionadas a valores de temperaturas situados entre 35-52°C. E, diferente das lactases fúngicas, apresentam ótimos de atividade enzimática para valores de pH próximos a neutralidade sendo, por isso, amplamente

empregadas na hidrólise da lactose do leite e de produtos derivados (PANESAR, 2006; SCHOLZ, 2011).

2.2.2.1 *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui diversas aplicações biotecnológicas relatadas na literatura, especialmente na produção de biocompostos de interesse, como as enzimas β -galactosidase (MANERA et al., 2008; PANESAR et al., 2006), inulinase (JAIN; JAIN; KANGO, 2012; MAKINO et al., 2005; PESSOA; VITOLO, 1999) e β -glicosidase (YOSHIDA et al., 2009).

Manera e colaboradores (2008) testaram a produção de β -galactosidase a partir de 5 cepas de *Kluyveromyces marxianus* e duas cepas de *Kluyveromyces lactis* e observaram que a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 apresentou os melhores resultados em relação à atividade enzimática.

As linhagens da levedura *Kluyveromyces marxianus* podem ser isoladas a partir de vasta gama de habitats, possibilitando uma grande diversidade metabólica e de aplicações biotecnológicas (FONSECA et al., 2008; SCHOLZ, 2011).

A β -galactosidase produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta seu ótimo de atividade em valores de pH na faixa de 6,0-7,0 e, portanto, é ideal para hidrolisar a lactose presente no leite, pois esse produto possui pH adequado à atividade da enzima. Em função disso, esse micro-organismo é relatado como sendo a fonte mais importante para a produção de β -galactosidase (FONSECA et al., 2008; PANESAR et al., 2006; PANESAR, 2008).

Segundo Kaur e colaboradores (2009), esta levedura, além de apresentar bom rendimento e ser reconhecida como um micro-organismo seguro (GRAS), quando comparada a outras leveduras produz a enzima β -galactosidase com maiores valores de atividade.

No entanto, a β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* é uma enzima intracelular, o que dificulta a sua utilização em processos baseados na hidrólise da lactose (PANESAR, 2008). Deste modo, torna-se necessário o emprego de métodos visando a obtenção de componentes intracelulares.

2.3 Obtenção de enzimas intracelulares a partir de micro-organismos

A utilização comercial de enzimas intracelulares, como a β -galactosidase de leveduras, requer o emprego de métodos que permitam o acesso através das estruturas celulares à esses biocompostos (PANESAR; MARWAHA; CHOPRA, 2010; PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Pessoa e Kikilian (2005) classificam os métodos para obtenção de compostos intracelulares em mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, prensa-francesa e ultra-som) ou não-mecânicos (rompimento físico, rompimento enzimático e permeabilização química).

Na literatura são encontrados trabalhos que se utilizam destes métodos para a obtenção de enzimas intracelulares (MEDEIROS et al., 2008; SHEETAL et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2010). A escolha do método dependerá, entre outros fatores, do tipo de micro-organismo utilizado e da estabilidade da enzima. Conforme o tratamento utilizado a parede celular poderá ser totalmente rompida ou parcialmente permeabilizada (PANESAR; MARWAHA; CHOPRA, 2010; PESSOA; KIKILIAN, 2005).

Na obtenção de enzimas o emprego de métodos mecânicos apresenta desvantagens. Pessoa e Kikilian (2005) afirmam que “as elevadas forças de cisalhamento provocadas pelos rompimentos mecânicos podem destruir organelas celulares e desnaturar complexos enzimáticos ou enzimas localizadas próximas à membrana”. Os mesmos autores salientam ainda que, quando ocorre ruptura total da célula, todo o conteúdo intracelular é liberado no meio juntamente com o composto de interesse. E, em função disso o homogeneizado celular apresenta grande quantidade de contaminantes e elevada viscosidade, a qual aumenta 8 vezes após o rompimento de uma suspensão com 75% (massa úmida) de células.

Além disso, quando são empregados métodos que promovem a ruptura total da célula e a liberação de todo material intracelular no meio, a enzima fica em sua forma livre e são necessárias etapas de purificação para sua obtenção (KNOX; CLEFEE, 1984 apud LIU et al., 2000).

Dentre os métodos não-mecânicos o rompimento físico e o rompimento enzimático são desvantajosos quando comparados a permeabilização química. O primeiro devido à sensibilidade das enzimas a condições drásticas, como o congelamento/descongelamento. E, o segundo por ser inviável em escala industrial, pois o custo das enzimas utilizadas é elevado (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Já, a permeabilização química é uma técnica alternativa que visa o acesso aos compostos intracelulares sem promover o rompimento total da célula. Após o processo de permeabilização celular a enzima permanece no interior da célula, em forma naturalmente imobilizada (SOMKUTI; DOMINIECKI; STEINBERG, 1998).

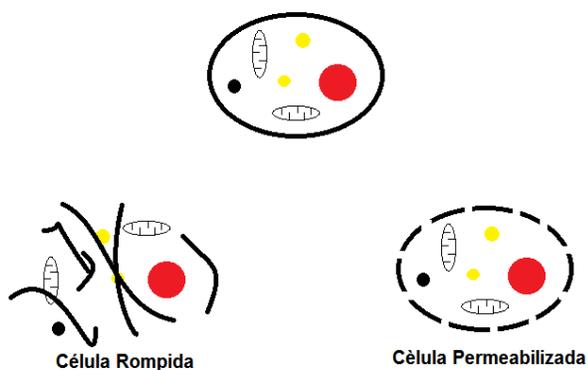
Kondo e colaboradores (2000) afirmam que o emprego de biocatalisadores em células inteiras é mais vantajoso quando comparado às formas livre ou imobilizada, pois a enzima apresenta maior estabilidade e dispensa as etapas de purificação, as quais encarecem o processo de obtenção da enzima devido ao seu alto custo.

2.3.1 Permeabilização celular

Ao contrário dos métodos de rompimento total da célula, a permeabilização permite que as enzimas intracelulares permaneçam em um ambiente mais parecido com o natural, pois o emprego desta técnica não leva a liberação da enzima do interior da célula (ALÄMAE; JÄRVISTE, 1995).

A permeabilização celular consiste no emprego de agentes permeabilizantes, como solventes ou detergentes, os quais atuam removendo os fosfolipídios da parede celular e tornando a célula porosa, permitindo a passagem de pequenas moléculas e solutos, como a lactose e seus subprodutos (PANESAR et al., 2007). A Figura 3 ilustra a diferença entre o rompimento total da célula e a permeabilização celular.

Figura 3 - Comparação entre o rompimento total da célula e a permeabilização celular



Fonte: O Autor

Diversos agentes permeabilizantes, solventes e detergentes, tem sido estudados combinados ou não, em concentrações variadas para permeabilizar células microbianas. Dentre os agentes mais frequentemente relatados na literatura estão o etanol, o isopropanol, o Triton X-100, o Tween 20, o butanol, a acetona, entre outros (KAUR et al. 2009; LIU et al., 2000; PANESAR et al; 2007).

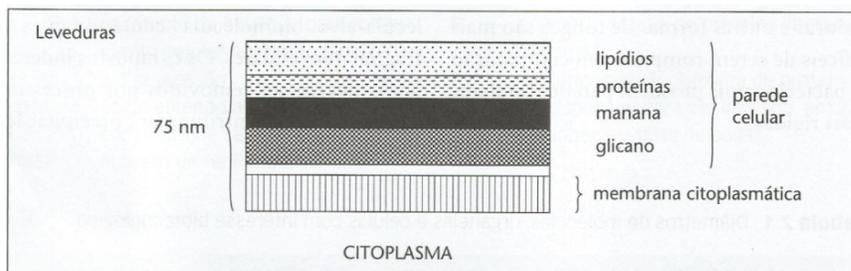
Segundo Felix (1982), as diferenças nas paredes celulares dos micro-organismos influenciam no efeito da permeabilização sobre eles. Células eucariotas e procariotas podem ser permeabilizadas e as diferentes formas como reagem ao mesmo processo de permeabilização está associada justamente a diferença existente entre as paredes celulares desses micro-organismos.

O mesmo autor ressalta que o efeito de permeabilização pode ser obtido quando um agente ultrapassa as barreiras da parede celular e alcança a membrana citoplasmática. Quanto maior a interação do agente permeabilizante com os componentes da membrana celular, maior a permeabilidade obtida. E, por isso, células como os protoplastos, desprovidas de parede celular, apresentam permeabilidade mais elevada a determinadas moléculas.

A exemplo de outros micro-organismos, a levedura *Kluyvermyces marxianus* possui parede celular e membrana citoplasmática, as quais conferem forma e rigidez à célula. A parede celular que envolve as leveduras é composta basicamente por lipídios, proteínas, manana e glicano e está representada na Figura 4.

Rose (1993) afirma que 60-90% da parede celular de leveduras são compostas por polissacarídeos, os quais são uma mistura de manana e glicano. Esse autor ressalta que esses compostos, na parede celular de *Sacharomyces cerevisiae*, estão presentes em proporções similares e representam cerca de 60-70% da parede celular.

Figura 4 - Estrutura da parede celular de leveduras



Fonte: Pessoa e Kilikian (2005)

Segundo Felix (1982) o efeito dos métodos de permeabilização variam conforme a concentração do agente e o tempo de permeabilização. Esse mesmo autor salienta que a eficiência do método de permeabilização é variável. O tempo e a temperatura de permeabilização, assim como o agente permeabilizante e sua concentração são variáveis que devem ser otimizadas conforme as características da célula a ser permeabilizada e da biomolécula de interesse.

Kaur e colaboradores (2009) testaram o uso de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um detergente, na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* visando a obtenção de β -galactosidase. As concentrações testadas variaram de 0,03-0,24 % (p/v) e o tempo de permeabilização foi de 10 minutos. O máximo da atividade enzimática foi observado na concentração de 0,06% (p/v) de CTAB.

Abraham e Bhat (2008) também utilizaram detergente, N-Lauroyl sarcosine (LS), para a permeabilização de células microbianas. O objetivo era a obtenção de catalase a partir de células de *Sacharomyces cerevisiae*. As concentrações de detergente variaram de 0 a 5%. E, o melhor resultado foi obtido permeabilizando-se as células com 1 mL de LS, na concentração de 2%, a 45°C, durante 15 minutos.

Assim como os detergentes, os solventes orgânicos tem sido amplamente relatados na literatura como bons agentes permeabilizantes de células microbianas. Panesar e colaboradores (2007), por exemplo, testaram diferentes concentrações de vários solventes (etanol, isopropanol, n-butanol, acetona, tolueno, entre outros) para a permeabilização de células de *Kluyveromyces marxinaus* visando a obtenção de β -galactosidase. O melhor resultado foi obtido empregando-se etanol 50% (v/v).

2.4 Estabilidade de biocompostos

O potencial de utilização de biocompostos está diretamente relacionado ao conhecimento do seu comportamento sob as condições de armazenamento. Diversos estudos envolvendo a estabilidade de antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, micro-organismos, entre outros, permitem a elucidação de técnicas para a conservação desses biocompostos.

Campos e colaboradores (2008) fizeram uma revisão sobre a estabilidade de antioxidantes em hortaliças processadas. Esses autores constataram que após pesquisas relacionarem os antioxidantes à prevenção de alguns tipos de cânceres, o aumento por alimentos que contenham esses compostos aumentou. No entanto, as condições de preparo e

armazenamento influenciam significativamente na conservação do antioxidante presente nas hortaliças. Se não forem controladas, estas condições podem levar a perda total do antioxidante.

Favel (1998) comparou a influência do armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente do brócolis e do espinafre sob a quantidade de vitamina C presente nessas hortaliças. Os autores constataram após 3 dias que houveram perdas de 40 e 90% da vitamina C no brócolis e no espinafre, respectivamente, quando armazenados a temperatura ambiente. Já, sob refrigeração não houveram perdas no brócolis e a perda da vitamina C do espinafre foi menor, cerca de 40%.

Os micro-organismos são, também, importantes biocompostos de interesse em diversas áreas atualmente. Sua conservação é elemento-chave para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (SOLA et al., 2012). Culturas de micro-organismos podem ser armazenadas por períodos curtos de tempo sob refrigeração (4-10°C). O armazenamento de culturas por longos períodos pode ser feito através do armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ou em freezers (-70°C). Outra alternativa é a liofilização. O conhecimento da melhor forma de preservação de culturas microbianas viabiliza a construção de uma coleção de micro-organismos de referência, interessante principalmente na área de microbiologia (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Quanto às enzimas, Vieira (2013) destaca que o potencial de utilização destas está diretamente relacionado a estabilidade. A estabilidade de enzimas refere-se à manutenção de sua atividade catalítica sob as condições de armazenamento. Apesar das características interessantes ao uso industrial das enzimas, como alta especificidade, condições brandas de reação e biodegradabilidade, aspectos negativos como perda da atividade catalítica durante as etapas de obtenção e conservação limitam a utilização desses biocompostos (KLIBANOV, 1979).

A preparação enzimática, se mantida sob as mesmas condições, perde atividade, ao longo do tempo de armazenamento. Assim, a estabilidade da enzima será tanto maior quanto maior o período de manutenção desta atividade. Alguns métodos como liofilização, secagem, refrigeração e congelamento são sugeridos para conservação de enzimas, sendo as condições de cada método, específicos para cada enzima (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2013; DAY; STACEY, 2007).

2.5 Métodos de conservação de compostos biológicos

A literatura apresenta inúmeras alternativas para a conservação de alimentos e compostos biológicos. Dentre essas, destacam-se a refrigeração, o congelamento rápido e lento, a liofilização, a desidratação, entre outros. A escolha do método a ser aplicado dependerá, especialmente, do produto a ser conservado, do tempo de armazenamento requerido (ORDÓÑEZ et al., 2005; NELSON; COX, 2011; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Neste trabalho, a liofilização e o ultra-congelamento (-86°C) foram utilizados como formas de conservar a atividade enzimática de β -galactosidase em células permeabilizadas da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Em vista disso, esses métodos seguem detalhados nos tópicos seguintes.

2.5.1 Congelamento

O congelamento é um antigo e eficaz método de preservação de alimentos. Sendo, a conservação de biocompostos também retratada na literatura através do emprego desta técnica (MEDEIROS, 2008; SILVA; COSTA; RECHE, 2008).

O congelamento, através da redução da temperatura do produto, permite a sua conservação por longos períodos. Neste processo, a temperatura é reduzida e a água presente sofre uma mudança de estado, passando do estado líquido para o estado sólido (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Silva, Costa e Reche (2008) avaliaram o uso de congelamento (-20°C) na manutenção da preservação de 328 espécies de leveduras, representadas pelos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rodothorulla*. Após 3 anos e 6 meses de congelamento, os autores afirmam ter recuperado 99% das leveduras, provando que o congelamento é uma técnica eficaz para a conservação de micro-organismos, além de possuir baixo custo.

Porém, é preciso observar que embora esse método de conservação seja eficaz, as características do produto a ser congelado devem ser consideradas para a escolha do tipo de congelamento a ser empregado. Segundo Ordóñez e colaboradores (2005) a formação de cristais de gelo pode acarretar em perda da qualidade do produto.

Dossat (1980), afirma que quando emprega-se o congelamento lento (temperatura desejada é obtida em 3 a 72 horas) grandes cristais de gelo são formados, os quais podem

causar sérios danos aos tecidos biológicos, incluindo a ruptura celular. Já, no congelamento rápido (-20°C em 30 minutos) são formados pequenos cristais de gelo, causando menos danos às células, visto que estes cristais são formados quase inteiramente dentro da célula.

2.5.2 Liofilização

A liofilização, ou criodesidratação, é um método de secagem no qual a água presente no produto é, inicialmente, congelada e em seguida retirada por sublimação. Ou seja, a água passa diretamente do estado sólido para o gasoso. A retirada da água ocorre através do emprego de baixas pressões e temperaturas (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Martins (2006) e Medeiros (2014), em estudos realizados com criopreservação de sêmen, afirmam que a liofilização é uma forma alternativa a conservação celular. Terroni e colaboradores (2011) salientam que “o desempenho da liofilização depende significativamente do processo de congelamento”. Cada produto, de acordo com suas características, determinará as condições mais adequadas tais como velocidade e tipo de congelamento que devem ser executados (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Ordóñez e colaboradores (2005) descreve o processo de liofilização em duas etapas. A primeira é chamada de desidratação primária e a segunda de desidratação secundária ou dessorção. Na primeira etapa, após o congelamento do produto, a pressão é reduzida abaixo de 600 Pa. Com isso, a água é removida por sublimação, sob vácuo e com adição de calor (condução, convecção ou radiação). Conforme as moléculas passam do estado sólido para o estado gasoso, a temperatura da superfície do produto aumenta e o centro permanece congelado e frio. O final da primeira etapa caracteriza-se pelo aumento da temperatura do produto a um valor próximo a temperatura ambiente.

Já, na segunda etapa, o gelo do produto já foi eliminado, no entanto ele continua a reter certa quantidade de água, chamada de água fortemente ligada. Para a obtenção de um produto estável, torna-se necessário a redução do teor de umidade a cerca de 2-8%. Para isso, o produto pode ser mantido de 2 a 6 horas no liofilizador, mantendo-se o vácuo até temperatura igualar-se a temperatura da placa calefatora (20-60°C) (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A liofilização é retratada em diversos trabalhos como uma técnica eficaz para a preservação de alimentos (MARQUES; PRADO; FREIRE, 2009; ORDÓÑEZ et al., 2005). Estudo envolvendo a conservação de enzimas também são encontrados (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2013; SUNDARI; ADHOLEYA, 2000; WU et al., 2007). Porém,

não foram encontrados relatos do uso deste método na conservação de células microbianas permeabilizadas, visando a manutenção da atividade de enzimas intracelulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos do curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Pampa – Campus Bagé.

3.1 Produção da enzima β -galactosidase

Para a produção da enzima β -galactosidase empregou-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. O cultivo da levedura iniciou-se com 10% de inóculo composto por meio complexo otimizado por Manera e colaboradores (2008) e incubado por 24h, a 150 rpm e 30°C. O cultivo, composto pelo mesmo meio do inóculo, foi realizado em erlenmeyer aletado e incubado em shaker por 48 h a 150 rpm e 30°C.

3.2 Permeabilização das células

Decorrido o tempo de cultivo, as células do caldo fermentado foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 min a 5°C e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida as células foram permeabilizadas para a obtenção da enzima. Foram coletados, para cada teste de permeabilização, 15 mg de biomassa (peso seco) de acordo com o Apêndice A.

Para a permeabilização das células da levedura foram testados seis solventes orgânicos (acetona, álcool metílico, etanol, isopropanol, acetato de etila e hexano) e dois detergentes (Tween 20 e Triton X-100). Os agentes permeabilizantes foram preparados em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. A Tabela 2 apresenta as concentrações testadas para cada um dos agentes permeabilizantes. As concentrações foram selecionadas de acordo com a literatura.

Tabela 2 - Concentrações testadas para cada agente permeabilizante

	Agente Permeabilizante	Concentrações testadas (%)
Solventes	Acetona	20, 35, 50 (p/v) e 100
	Álcool metílico	20, 35, 50 (p/v) e 100
	Etanol	20, 35, 50 (p/v) e 100
	Isopropanol	20, 35, 50 (p/v) e 100
	Acetato de etila	100
	Hexano	100
Detergentes	Tween 20	0,5, 1,0 e 1,5 (p/v)
	Triton X-100	0,5, 1,0 e 1,5 (p/v)

Fonte: O Autor

Para todos os testes de permeabilização as células coletadas do caldo fermentado (15 mg de biomassa – peso seco) foram ressuspensas em 2 mL de cada agente permeabilizante. A suspensão foi mantida durante 5 min a 25°C para que ocorresse a permeabilização das células. Todos os testes de permeabilização das células foram realizados em triplicata.

Decorrido o tempo de permeabilização, as células foram novamente centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min a 5°C e lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 para a retirada do agente permeabilizante.

O melhor tratamento dentre os estudados, para a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em relação à atividade da enzima β -galactosidase, foi definido através da comparação estatística (análise de variância e Teste de Tukey) entre os melhores resultados obtidos para cada um dos agentes permeabilizantes testados.

3.3 Estudo da conservação da enzima em células permeabilizadas

Para o estudo da conservação da enzima β -galactosidase as células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foram permeabilizadas empregando-se o melhor tratamento de permeabilização.

As células permeabilizadas foram armazenadas empregando-se a liofilização e o ultracongelamento (-86°C) como métodos de conservação da enzima β -galactosidase.

Para o tratamento de liofilização, inicialmente as células foram congeladas em ultra-freezer (-86°C) durante 12 horas e após liofilizadas durante 48 horas. Após, as células liofilizadas foram mantidas refrigeradas a 4°C para acompanhamento da atividade da enzima.

E, para o ultra-congelamento, as células foram congeladas em ultra-freezer a aproximadamente -86°C e mantidas nessa condição durante todo o período de acompanhamento da atividade enzimática.

A atividade da enzima foi quantificada antes do armazenamento e ao longo do tempo de armazenamento (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias), como forma de avaliar a estabilidade da enzima para cada método estudado.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinação da atividade enzimática

As células permeabilizadas foram utilizadas na determinação da atividade enzimática de β -galactosidase, a qual foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*NPG) como substrato, segundo metodologia descrita por Inchaurredo, Yantorno e Voget (1994). Os resultados da atividade enzimática foram expressos em U/mg de biomassa. Uma unidade U é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto sob as condições do ensaio.

3.4.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm e convertida para peso seco. A conversão para peso seco deu-se conforme a curva-padrão apresentada no Apêndice A, a qual foi construída segundo metodologia descrita por Longhi e colaboradores (2004).

3.4.3 Microscopia ótica

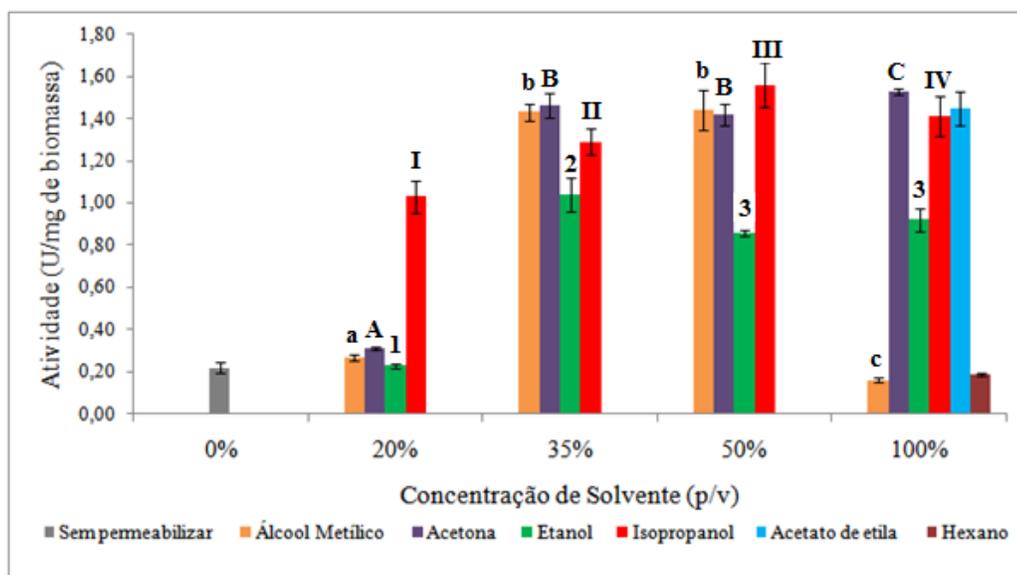
Foi realizada análise microscópica das células antes e após o emprego do melhor tratamento de permeabilização das células utilizando microscopia ótica com aumento de 100 vezes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus*

Os resultados obtidos para a atividade enzimática para cada um dos solventes, empregados como agentes de permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em suas respectivas concentrações estão apresentados na Figura 5. No eixo das ordenadas tem-se a atividade da enzima β -galactosidase expressa em U/mg de biomassa e no eixo das abscissas tem-se a concentração dos agentes permeabilizantes testados (p/v). Os agentes permeabilizantes estão indicados na figura através das barras. Na concentração de 0% tem-se a atividade das células não permeabilizadas.

Figura 5 - Efeito dos solventes na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Teste de Tukey entre as concentrações de cada agente permeabilizante representado pelas legendas acima das barras. Legendas iguais indicam que não houve diferença significativa nos resultados a um nível de 95% de confiança



Fonte: O Autor

A partir da análise de variância foi possível concluir que para todos os solventes testados, com exceção do hexano e do acetato de etila que foram testados unicamente na concentração de 100%, as diferentes concentrações empregadas na permeabilização das células influenciaram significativamente na atividade enzimática ($p < 0,05$). Então, para o

álcool metílico, a acetona, o etanol e o isopropanol, realizou-se o teste de Tukey entre as concentrações, o qual está indicado na Figura 5 através das legendas sobre as barras.

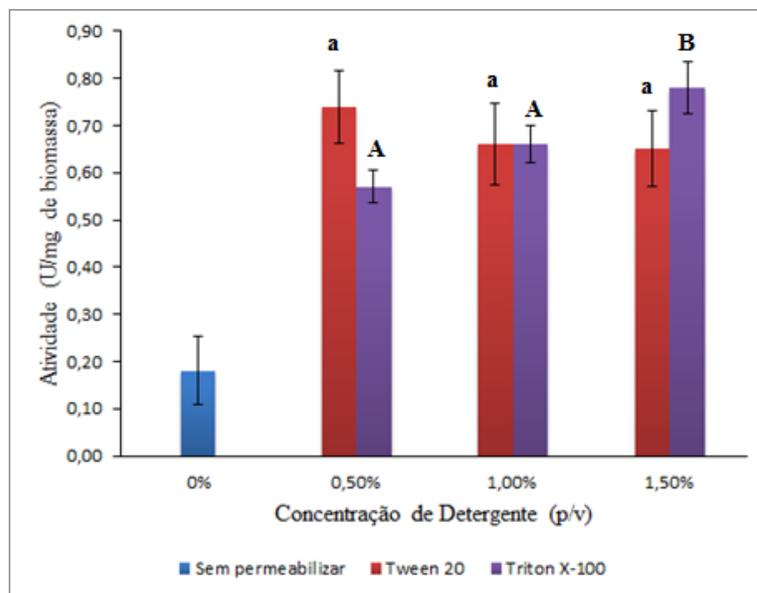
A partir do Teste de Tukey, com um nível de confiança de 95%, constatou-se que o álcool metílico nas concentrações de 35 e 50% (p/v) apresentou resultados significativamente iguais ($1,43 \pm 0,043$ U/mg de biomassa e $1,44 \pm 0,097$ U/mg de biomassa, respectivamente). Portanto, a melhor concentração escolhida para este agente foi a de 35% (p/v) por requerer em sua formulação uma quantidade menor de solvente, sendo, portanto, mais interessante economicamente.

Os demais solventes apresentaram-se melhores resultados nas concentrações de 35% (p/v) para o etanol ($1,04 \pm 0,083$ U/mg de biomassa), 50% (p/v) para o isopropanol ($1,56 \pm 0,104$ U/mg de biomassa) e 100% para a acetona ($1,53 \pm 0,014$ U/mg de biomassa), para o acetato de etila ($1,45 \pm 0,079$ U/mg de biomassa) e para o hexano ($0,19 \pm 0,006$ U/mg de biomassa).

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos para os detergentes, estando o teste de Tukey representado na figura através das legendas acima das barras. Legendas iguais denotam que não houve diferença estatística entre os resultados com um nível de confiança de 95%.

Figura 6 - Efeito dos detergentes na permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Teste de Tukey entre as concentrações de cada agente permeabilizante

representado pelas legendas acima das barras. Legendas iguais indicam que não houve diferença significativa nos resultados a um nível de 95% de confiança



Fonte: O Autor

Em relação aos detergentes, como pode ser observado na Figura 6, a análise de variância indicou que as diferentes concentrações estudadas não diferem significativamente entre si ($p = 0,40$) quando empregou-se o detergente Tween 20 como agente permeabilizante. Em vista disso, definiu-se, para esse agente permeabilizante, a concentração de 0,5% (p/v) como o melhor tratamento ($0,74 \pm 0,077$ U/mg de biomassa), tendo em vista a menor necessidade de reagente, do mesmo modo que foi descrito para o álcool metílico

O contrário foi observado para o detergente Triton X-100. Para esse detergente a análise de variância mostrou que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações estudadas para permeabilizar as células da levedura. Com a realização do Teste de Tukey, com um nível de confiança de 95%, definiu-se 1,5% (p/v) como a melhor concentração para este agente permeabilizante, na qual obteve-se atividade enzimática igual a $0,78 \pm 0,055$ U/mg de biomassa.

Entretanto, segundo Panesar e colaboradores (2007), a concentração ótima dos agentes permeabilizantes, na qual observa-se o máximo valor para a atividade enzimática, pode apresentar variações conforme o micro-organismo estudado, sua cepa, bem como as condições de permeabilização das células.

Esses mesmos autores, por exemplo, para a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3465 e obtenção de β -galactosidase, testaram, dentre outros solventes, o etanol, o isopropanol e a acetona. Porém, as concentrações ótimas para esses solventes foram 50%, 35% e 30% (v/v), respectivamente. Neste caso, a cepa e as diferentes condições de permeabilização empregadas podem ter contribuído para os diferentes ótimos de concentração encontrados. Além disso, o preparo do agente permeabilizante foi realizado de forma distinta (v/v), daquela utilizada no presente trabalho (p/v). De modo que quando considera-se (v/v) tem-se um volume de solvente diferente de quando utiliza-se (p/v), em função da densidade de cada solvente.

Tanto para os solventes, exceto hexano e acetato de etila, quanto para os detergentes observou-se que a atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração até atingir um valor crítico, no qual ocorre o máximo valor da atividade. Após esta concentração a atividade decresce novamente.

Para os detergentes, as concentrações testadas não permitiram observar um padrão tão bem definido quanto para os solventes. No entanto, pode-se observar para o Tween 20 que o maior valor da atividade deu-se na concentração de 0,5% (p/v) e a partir deste houve decréscimo nos valores da atividade.

Já, para o Triton X-100 o maior valor de atividade deu-se na concentração de 1,5%. Em concentrações inferiores a atividade possui valor reduzido. Este detergente poderia, ainda, em concentrações superiores apresentar maiores valores para a atividade da enzima. No entanto, a sua alta viscosidade impossibilitou o teste de concentrações mais elevadas.

Segundo Panesar e colaboradores (2007) em concentrações menores o baixo valor da atividade enzimática deve-se à quantidade insuficiente de agente para uma permeabilização efetiva da célula. Já, nas concentrações mais elevadas esses autores acreditam que as diminuições na atividade da enzima podem ser atribuídas à lise celular ou a liberação da enzima a partir da célula.

No entanto, para todos os agentes permeabilizantes testados (solventes e detergentes), a atividade dos sobrenadantes foi próxima à zero ($0,01 \pm 0,001$ U/mL) indicando que a enzima permaneceu no interior da célula de forma naturalmente imobilizada. Segundo Darzynkiewicz, Robison e Crisman (1994) em altas concentrações a redução da atividade da enzima pode dever-se à perda da sua estrutura tridimensional original.

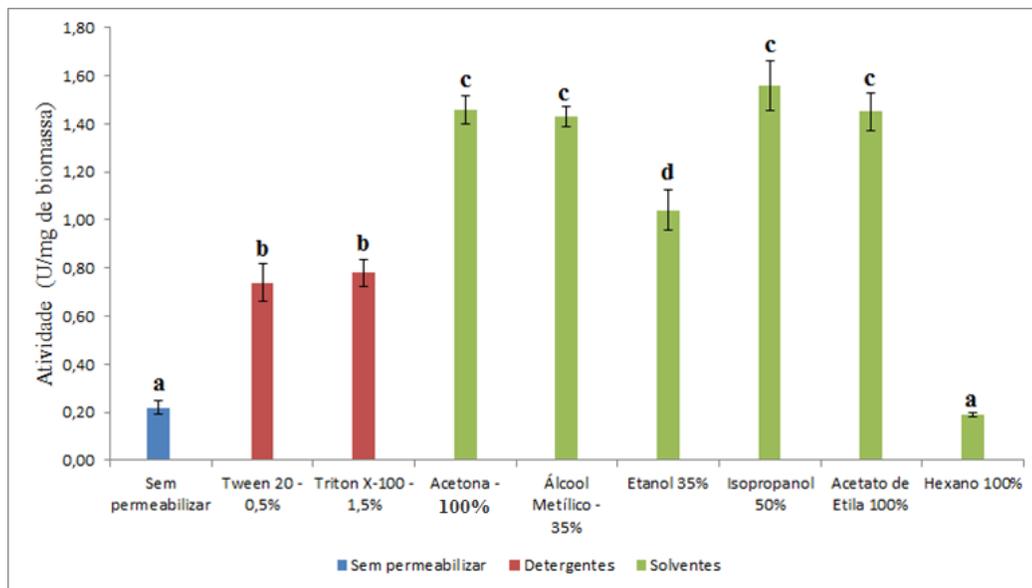
Conforme Nelson e Cox (2011) a perda suficiente dessa estrutura tridimensional capaz de causar a inatividade da enzima caracteriza a desnaturação proteica. Os mesmos autores

salientam, também, que as proteínas globulares, como as enzimas, podem ser passíveis de desnaturação e consequente perda de sua função quando submetidas a condições drásticas, como valores extremos de pH e temperatura. Porém outros fatores podem resultar em estruturas desnaturadas, como a exposição da enzima a solventes orgânicos e detergentes, a qual pode ocasionar o rompimento das interações hidrofóbicas responsáveis por manter o núcleo estável das proteínas globulares.

Após a escolha das melhores concentrações para solventes e detergentes, foi escolhido o melhor agente para a permeabilizar as células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em relação à atividade da enzima β -galactosidase. Os valores das máximas atividades enzimáticas obtidas com o uso dos agentes permeabilizantes, incluindo solventes e detergentes, ficaram compreendidos entre $0,19 \pm 0,006$ U/mg de biomassa e $1,56 \pm 0,104$ U/mg de biomassa, para o hexano 100% e para o isopropanol 50%, respectivamente.

A Figura 7 apresenta os resultados das máximas atividades obtidas para cada tratamento, em suas respectivas concentrações. A análise de variância apontou a existência de diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). O Teste de Tukey está representado na Figura 3 através das letras e foi utilizado como forma de definir o melhor tratamento para permeabilizar as células da levedura. Letras iguais denotam que não houve diferença significativa entre os tratamentos a um nível de 95% de confiança.

Figura 7 - Atividade máxima para solventes e detergentes. Teste de Tukey representado pelas letras. Letras iguais denotam que não houve diferença significativa entre os tratamentos a um nível de 95% de confiança



Fonte: O Autor

O hexano 100% apresentou atividade estatisticamente igual a das células não permeabilizadas. Isto pode indicar que este tratamento ou não foi eficaz na permeabilização das células ou provocou a desnaturação da enzima, ocasionando perda de sua função. No entanto, a alta concentração empregada sugere que tenha ocorrido a desnaturação da enzima.

Todos os demais tratamentos foram considerados significativamente diferentes das células não permeabilizadas. Isto evidencia que os agentes permeabilizantes testados possuem a capacidade de permeabilizar as células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em relação à atividade da enzima β -galactosidase.

Os detergentes Tween 20, concentração de 0,5% (p/v) e Triton X-100, concentração de 1,5% (p/v) foram considerados estatisticamente iguais entre si e diferentes de todos os solventes. Os detergentes apresentaram os resultados mais baixos em relação à atividade da enzima, quando comparados aos resultados promovidos pela acetona, álcool metílico, etanol, isopropanol e acetato de etila.

Com exceção do hexano 100%, que apresentou atividade próxima a das células não permeabilizadas, o etanol 35% (p/v) apresentou a menor atividade dentre os solventes testados e foi considerado estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Já, o álcool metílico 35%

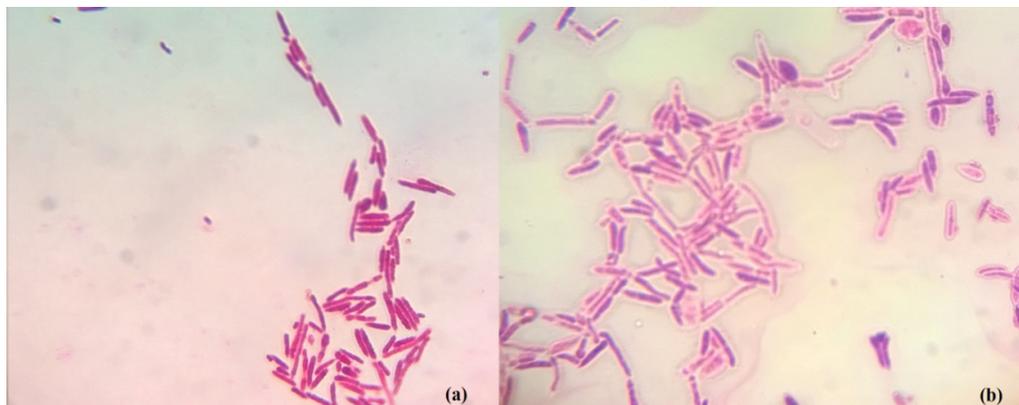
(p/v), o isopropanol 50% (p/v), a acetona 100% e o acetato de etila 100% foram considerados estatisticamente iguais e apresentaram os melhores resultados dentre os agentes permeabilizantes testados.

Portanto, os solventes mostraram-se mais eficazes na permeabilização das células da levedura, em relação à atividade da enzima, que os detergentes testados. Resultados semelhantes, comparando solventes e detergentes, foram relatados por Panesar e colaboradores (2007). Esses autores demonstraram que em relação aos solventes testados (acetona, isopropanol, etanol, tolueno, benzeno, n-butanol, e n-propanol) a atividade da enzima β -galactosidase foi menor quando empregaram Triton X-100 para a permeabilização das células de *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3465.

Os melhores resultados foram obtidos para o álcool metílico 35% (p/v), o isopropanol 50% (p/v), a acetona 100% e o acetato de etila 100%. Definiu-se o álcool metílico 35% (p/v) como melhor agente permeabilizante, dentre os testados, relevando o uso de menores quantidades de solvente necessárias ao seu preparo, fator interessante economicamente.

As células permeabilizadas com álcool metílico 35% (p/v) foram observadas através de microscopia ótica com aumento de 100 vezes, como forma de examinar as diferenças morfológicas na estrutura da célula após o tratamento de permeabilização, em relação ao controle (células não permeabilizadas). A Figura 8 apresenta as células não permeabilizadas (a) e após a permeabilização com álcool metílico 35% (p/v) (b).

Figura 8 - Análise microscópica com aumento de 100 vezes das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 (a) Controle - células não permeabilizadas (b) Células permeabilizadas com álcool metílico 35% (p/v)



É possível verificar através das imagens que as células permeabilizadas são distintas das células não permeabilizadas. Em alguns pontos é possível observar segregações na parede celular, bem como alguns componentes intracelulares, os quais não podem ser claramente identificados. Nas células permeabilizadas notou-se que os contornos das células tornaram-se translúcidos, indicando que ocorreram modificações nas paredes celulares e membranas citoplasmáticas. No entanto, o tratamento de permeabilização não provocou drásticas alterações na integridade da célula.

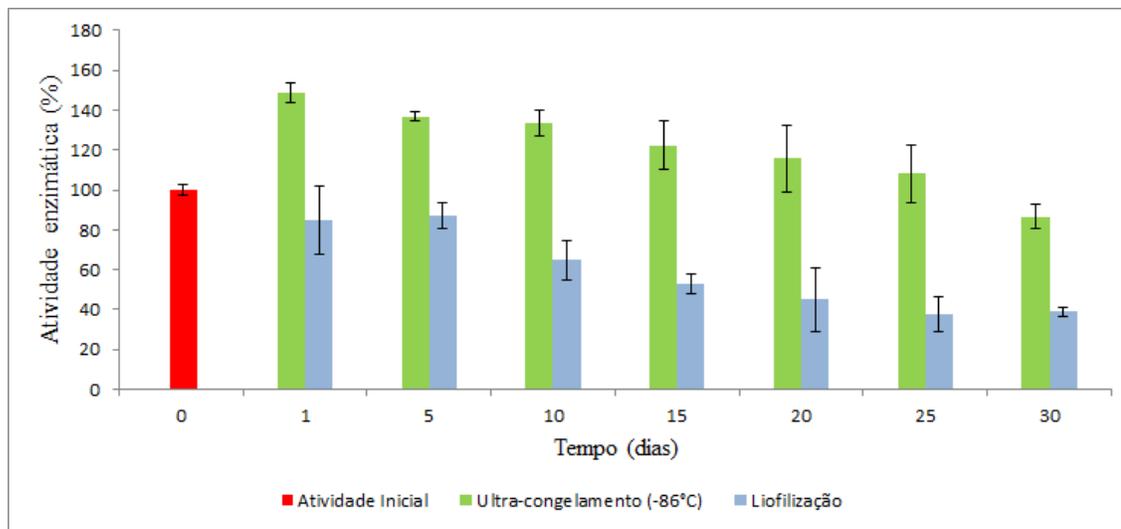
Relato semelhante foi feito por Galabova, Tuleva e Spasova (1996) que, ao permeabilizarem as células de *Yarrowia lipolytica* com Triton X-100, observaram através da microscopia eletrônica diferenças entre as células não permeabilizadas e permeabilizadas. A principal diferença descrita foi a translucidez das paredes celulares e membranas citoplasmáticas, quando as células foram permeabilizadas. Esses autores também relataram que em certas zonas observaram-se segregações na célula, as quais foram associadas a pontos onde ocorreu o rompimento da parede celular.

4.2 Estabilidade da enzima β -galactosidase

Dois tratamentos, ultra-congelamento e liofilização, foram empregados de forma a estudar a estabilidade da enzima β -galactosidase nas células permeabilizadas da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. As células foram permeabilizadas utilizando álcool metílico 35% (p/v), preparado em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, o qual foi definido neste trabalho como o melhor agente de permeabilização das células dessa levedura.

Na Figura 9 está apresentado o acompanhamento da atividade da enzima nas células permeabilizadas ao longo de 30 dias. No eixo das ordenadas tem-se a atividade enzimática expressa em porcentagem (%) e no eixo das abscissas tem-se o tempo em dias. O acompanhamento foi feito, para ambos os tratamentos, ao longo de 30 dias. No ponto zero tem-se a atividade da enzima antes dos tratamentos, equivalente a 100%. E, no ponto 1 tem-se a atividade 24 horas após o tratamento.

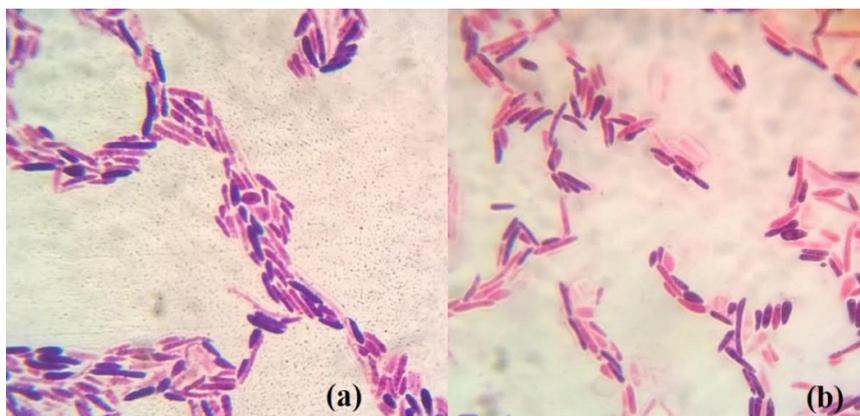
Figura 9 - Estabilidade da enzima β -galactosidase em células permeabilizadas de levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, utilizando álcool metílico 35% (p/v) ao longo do tempo de armazenamento.



Fonte: O Autor

Após 24 horas do início dos tratamentos constatou-se que a atividade da enzima de células mantidas em ultra-freezer aumentou 48,60% enquanto a atividade da enzima de células liofilizadas diminuiu 15,36%. As células permeabilizadas foram observadas ao microscópio depois dos tratamentos de ultra-congelamento e liofilização (Figura 10).

Figura 10 – Análise microscópica com aumento 100 vezes das células permeabilizadas da levedura *Kluyveromyces marxianus* após tratamento de (a) ultra-congelamento e (b) liofilização.



Fonte: O Autor

Através das imagens é possível perceber para ambos os tratamentos os contornos translúcidos das células, bem como a manutenção da integridade da célula, sem alterações drásticas notáveis. Em comparação ao tratamento de ultra-congelamento (a), as células submetidas à liofilização (b) parecem ter sofrido maiores modificações, ainda que mantidas inteiras. Essas modificações foram, possivelmente, causadas pela alta pressão empregada durante a liofilização e causaram danos à enzima, levando à redução de sua atividade inicial. No entanto, análise microscópica mais detalhada seria necessária para o esclarecimento das reais condições das células após ambos os tratamentos.

O tratamento de ultra-congelamento auxiliou na permeabilização das células da levedura, resultando em aumento na atividade enzimática após 24 horas. A atividade da enzima permaneceu, durante 25 dias, superior ao valor inicial. Após, aos 30 dias de estocagem a -86°C houve perda de 13,42% da atividade inicial da enzima.

Já, a liofilização após as primeiras 24 horas apresentou decréscimo da atividade da enzima. Assim, este tratamento, não foi eficaz na manutenção da atividade da enzima β -galactosidase em células permeabilizadas. Em 20 dias constatou-se a perda de 54,84% da atividade inicial da enzima.

Foi medida a atividade das células sem permeabilizar antes e 24 horas após cada tratamento de conservação. Antes dos tratamentos a atividade enzimática foi de $0,21 \pm 0,058$ U/mg de biomassa. E, após as 24 horas o valor da atividade foi de $0,30 \pm 0,005$ U/mg de biomassa e $0,62$ U/mg de biomassa para o ultra-congelamento e a liofilização, respectivamente.

Analizou-se, também, a atividade enzimática no sobrenadante, a fim de verificar possíveis rompimentos das células e liberação do conteúdo intracelular para o meio. As células após o tratamento (liofilização ou ultra-congelamento) foram ressuspensas em tampão para posterior leitura da atividade enzimática. Esta suspensão foi centrifugada e o sobrenadante empregado para determinar a quantidade de enzima liberada pelas células. No entanto a atividade enzimática apresentada foi próxima a zero para ambos os tratamentos, indicando que a enzima permaneceu no interior das células permeabilizadas.

Declerie, Cat e Huynt (1986) constataram que o congelamento e posterior descongelamento de células podem incorrer na permeabilização destas, favorecendo o aumento da atividade da enzima. Os autores compararam vários tratamentos de permeabilização para células de *Kluyveromyces bulgaricus*, incluindo métodos químicos (solventes e detergentes) e tratamentos físicos (ciclos de congelamento e descongelamento). O

objetivo era a obtenção de β -galactosidase. Os tratamentos químicos e físicos foram testados separadamente. Após 5 ciclos de congelamento e descongelamento o valor da atividade da enzima foi igual ao máximo valor encontrado para os solventes, indicando que os tratamentos físicos contribuem para permeabilizar as células microbianas.

Pisani e colaboradores (1990) relataram a purificação e as principais propriedades moleculares e cinéticas da enzima β -galactosidase. Para seus testes a enzima foi obtida a partir do micro-organismo *Sulfolobus solfataricus* MT-4. Ao contrário do aplicado neste trabalho, as células foram rompidas e a enzima foi recuperada a partir do sobrenadante através de sucessivas etapas de purificação e conservada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5. Não foram observadas perdas significativas na atividade da enzima por 2 anos.

Itoh e colaboradores (1982) estudaram a produção da enzima β -galactosidase com 12 leveduras diferentes. As células também foram rompidas através de tratamento de sonificação, para obtenção da enzima, e o extrato livre foi liofilizado e estocado a 4°C. Durante 6 meses de acompanhamento da atividade não foram verificadas perdas significativas na atividade da enzima.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2013) avaliaram o efeito da liofilização nas propriedades catalíticas da enzima frutossiltransferase obtida a partir de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. Após 6 meses de estocagem os pesquisadores constataram perda de 7% da atividade inicial da enzima.

No entanto, estudos envolvendo a conservação de enzimas são mais comuns quando dizem respeito a enzimas obtidas a partir de células livres, como os mencionados acima. A literatura carece ainda de relatos que abranjam a conservação desses biocatalisadores em células permeabilizadas.

Este trabalho empregou o ultra-congelamento e a liofilização como formas de conservação da enzima β -galactosidase em células microbianas permeabilizadas. Porém, somente o ultra-congelamento foi eficaz na conservação da atividade inicial da enzima após o tratamento e por apenas 25 dias. Este período de conservação ainda é pouco para o uso industrial da enzima. Além disso, como descrito anteriormente, alguns trabalhos relatam a manutenção da atividade da enzima purificada, obtida a partir de células rompidas, por períodos de tempo superiores.

Sendo a permeabilização celular uma técnica eficaz na obtenção de enzimas intracelulares, com inúmeras vantagens frente aos métodos de rompimento celular, são necessários ainda maiores estudos no sentido de aprimorar os métodos de conservação da

enzima β -galactosidase obtida a partir de células microbianas permeabilizadas, como forma de promover futuramente seu uso industrial.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho as principais conclusões obtidas foram as seguintes:

Para a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 obtiveram-se melhores resultados nas concentrações de: 35% (p/v) para o álcool metílico e o etanol, 50% (p/v) para o isopropanol, 100% para a acetona, o hexano e o acetato de etila, 0,5% (p/v) para o Tween 20 e 1,5% (p/v) para o Triton X-100.

Os máximos valores de atividade da enzima foram de $1,43 \pm 0,043$ U/mg de biomassa, $1,56 \pm 0,104$ U/mg de biomassa, $1,53 \pm 0,014$ U/mg de biomassa, $1,45 \pm 0,079$ U/mg de biomassa, para o álcool metílico 35% (p/v), para o isopropanol 50% (p/v), para a acetona 100% e para o acetato de etila 100%, respectivamente. Esses resultados foram considerados estatisticamente iguais.

Definiu-se o álcool metílico 35% (p/v) como o melhor agente permeabilizante das células da levedura, pois em sua formulação requer quantidades menores de solvente. A atividade dos sobrenadantes foi reduzida, indicando que a enzima permaneceu no interior da célula. A análise microscópica das células permeabilizadas em contraste às células antes da permeabilização confirma que não ocorreram danos a integridade da célula.

Para os tratamentos de conservação da enzima, os resultados mostraram aumento de 48,60% e redução de 15,35% da atividade da enzima decorridas 24 horas dos tratamentos de ultra-congelamento e liofilização, respectivamente.

A liofilização não foi eficiente na conservação da enzima β -galactosidase em células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* tendo, aos 20 dias de armazenamento, resultado em perda de 54,84% da atividade inicial da enzima. Em relação ao ultra-congelamento a atividade da enzima manteve-se superior ao valor inicial durante 25 dias. Em 30 dias, houve perda de 13,42% da atividade inicial da enzima.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os estudos realizados no presente trabalho podem ser ampliados, especialmente no que tange a conservação da atividade da enzimática em células permeabilizadas. De modo que para trabalhos futuros seguem as seguintes sugestões:

- Realizar análise microscópica detalhada, utilizando microscopia eletrônica de varredura, de forma que possam ser observadas detalhadamente as estruturas das paredes celulares e membranas citoplasmáticas em células permeabilizadas e não permeabilizadas.
- Otimizar o processo de permeabilização das células selecionando agentes permeabilizantes mais eficazes, a partir do conhecimento das interações entre os componentes das paredes celulares e membranas citoplasmáticas com agentes permeabilizantes.
- A partir da mesma metodologia descrita para o processo de ultra-congelamento e liofilização de células permeabilizadas, empregar outros métodos como *spray-drying*, secagem a baixas temperaturas (37°C), congelamento (-18°C) e refrigeração para a conservação da atividade da enzima e avaliar a sua estabilidade durante o período de armazenamento.
- Selecionar, a partir de dados da literatura, agentes protetores, cujo uso seja permitido em alimentos, e adicioná-los as células permeabilizadas antes dos tratamentos de conservação da enzima e comparar com os resultados obtidos sem a adição dos protetores.
- Comparar, através de análises microscópicas, as estruturas celulares antes e após os tratamentos de conservação das células permeabilizadas, com e sem a adição dos agentes protetores.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; BHAT, S. G. Permeabilization of baker's yeast with *N*-lauroyl sarcosine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 799-804, 2008

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Effects of lyophilization on catalytic properties of immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10. **Food and Bioprocess Processing**, v. 91, 2013.

ALÄMAE, T; JÄRVISTE, A. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study. **Journal of Microbiological Methods**, v. 22, p. 193-205, 1995.

AMMAM, M.; FRANSAER, J. T. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. **Sensors and Actuators B:Chemical**, v. 148, p. 583-589, 2010.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2; p. 23-39, 1998.

BACELAR JÚNIOR, A. J.; KASHIWABARA, T. G. B.; NAKAOKA, V. Y. E. S. Intolerância à lactose: Revisão da literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n. 4, p. 38-42, 2013.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Editora Interciência Ltda, Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 26, de 26 de maio de 2009. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2009.

CAMPOS, F. M. et al. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 481-490, 2008.

CARMINATTI C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis***. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade federal de Santa Catarina, SC – Brasil, 2001.

CHAMPE, C. P.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Editora Artmed, 3ª Edição, Porto Alegre, 2006.

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, 2001.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB, Rio de Janeiro, 2008.

DAGBALI, S; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p.1-12, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z.; CRISSMAN, H. A.; ROBINSON, J. P. **Methods in cell biology**. Auspices of the Arican Society for Cell Biology, v. 64, 3ª edição, 1994.

DAY, J. G.; STACEY, G. N. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2007.

DECLEIRE, M.; CAT, W. D.; HUYNH, N.V. Comparasion of various permeabilization treatments of *Kluyveromyces* by determining *in situ* β -galactosidase activity. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 9, p. 300-302, 1987.

DOSSAT, R.J., **Princípios de Refrigeração**. Hemus, 3ª edição, 1980.

FAVEL, D. J. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables **Food Chemistry**., v. 62, n. 1, p.59-64, 1998.

FELIX, H. Permeabilized cells. *Analytical Biochemistry*, v. 120, p. 211-234, 1982.

FISCHER, G. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31, n. 1, p. 402-410, 2002.

FREITAS, M. F. M. **Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, CE – Brasil, 2013.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

GALABOVA, D.; TULEVA, B.; SPASOVA, D. Permeabilization of *yarrowia lipolytica* cells by Triton X-100. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18. p. 18-22, 1996.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 2009.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 1985.

GOSLING, A. et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p. 307-318, 2010.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -galactosidase in food industry – a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

HUDSON, E. Alimentos sem lactose mantêm apelo global. **Revista Aditivos e Ingredientes**, n. 77, 2011.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **American Academy of Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. 1278-1287, 2006.

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

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, n. 1, p. 47-54, 1994.

ITOH, T.; SUZUKI, M.; ADACHI, S. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 899-904, 1982.

INTOLERÂNCIA à lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose. **Revista Aditivos e Ingredientes**, n. 66, 2010.

JAIN, S. C.; JAIN, P. C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 62-69, 2012.

JESUS, S. S. **Desenvolvimento e análise do processo de secagem de α -amilase por microndas a vácuo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, São Paulo, Campinas, 2002.

JURADO, E. et al. A new kinetic proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

KAUR, G. et al. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 63-67, 2009.

KIM, J. W.; RAJAGOPAL, S. N. Isolation and Characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus*. **Folia Microbiologica**, v. 45, n. 1, p. 29-34, 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2010.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v. 93, p. 1-25, 1979.

KNOX, T.; CLEFEE, K. R. Synthesis of long-chain esters in a loop reactor system using a fungal cell bound enzyme. **Process Biochemistry**, v. 19, p. 188-192, 1984 apud LIU, Y. et al. Preparation of high activity whole cell biocatalysts by permeabilization of recombinant yeasts with alcohol. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 554-558, 2000.

KONDO, A. et al. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recominant flocculent yeast with alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 806-811, 2000.

LADERO, M. et al. Activity over lactose and ONPG of a genetically of an engineered - galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized kinetic modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 18-193, 2001.

LIU, Y. et al. Preparation of high-activity whole cell biocatalysts by permeabilization of recombinant yeasts with alcohol. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 554-558, 2000.

LONGHI, L. G. S. et al. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2004.

MAKINO, Y. et al. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on streamline deae resin. **Brazilian Journal of chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 539-545, 2005.

MANERA, A P. et al. Optimization of the culture médium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.

MARQUES, L. G.; PRADO, M. M.; FREIRE, J. T. Rehydration characteristics of freeze dried tropical fruits. **Food Science and Technology**, Amsterdam. v.42, n. 7, p. 1232-1237, 2009.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. et al. Study of galactooligosaccharide composition in comercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 540-544, 2008.

MARTINS, C.F. **Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e funcional**. Tese de doutorado pela Universidade de Brasília -Faculdade de Ciências Biológicas. Brasília/DF, 2006.

MEDEIROS, F. O. et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galctosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, A. B. **Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal**. Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**. v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NERI, D. F. M. et al. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**, v. 9, p. 2334-2339, 2008.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. Dissertação de Mestrado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2005.

PANESAR, P. S., et al. Review: Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 530-543, 2006.

PANESAR, P. S. et al. Permeabilization of yeast cells with organic solvents for β -galactosidase activity. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2007.

PANESAR, P. S. Application of response surface methodology for maximal lactose hydrolysis in whole milk using permeabilised yeast cells. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 2, p. 191-203, 2008.

PANESAR, P. S.; MARWAHA, S. S.; CHOPRA, H. K. **Enzymes in food processing: Fundamentals and potential applications**. New Delhi: International Publishing House, 2010.

PELCZAR, J. M. JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. São Paulo: Editora Pearson Makron Books, 2 edição, v. 1, 1997.

PESSOA, A. JR.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Editora Manole LTDA, 2005.

PESSOA, A. JR.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 3, p. 237-245, 1999.

PISANI, F. M. et al. Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, p. 321-328, 1990.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e especiais**. Rio de Janeiro, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006.

RICHMOND, M. L.; GRAY, J. I.; STINE, C. M. β -galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 1759-1771, 1981.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 74, p. 110S-118S, 1993.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SCHOLZ, E. B. **Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase**. Projeto de pesquisa, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2011.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C . **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SHEETAL, B. et al. Comparative study of extraction methods for intracellularly produced glucose isomerase by *Streptomyces* sp. SB-*All*₄. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 10, p. 43-50, 2013.

SOLA, M. C. et al. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (Nível: Doutorado), Goiânia, 2012.

SOMKUTI, G. A.; DOMINIECKI, M. E.; STEINBERG, D. H. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* with ethanol. **Current Microbiology**, v. 36, p. 202-206, 1998.

SRIVASTAVA, P. et al. Isolation, purification & characterization of glucose isomerase enzyme from *Streptomyces* species isolated from Parbhani region. **Journal of Enzyme Research**, v. 1, n. 1, p. 01-10, 2010.

SUNDARI, S. K.; ADHOLEYA, A. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 865-868, 2000.

TERRONI, H. C. et al. Liofilização. **Revista Científica Unilago**, 2011.

TOMAL, A. A. B. et al. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligosacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

TSEN, J.-H. et al. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 561-564, 2007.

VIEIRA, H. S. F. **Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha**. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

VOLKERT, M. et al. Effect of air freezing, spray freezing, and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 532, 540, 2008.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and the new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.

YOSHIDA, E. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of beta-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 65, n. 2, p. 1190-1192, 2009.

WU, J. C. et al. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 108-112, 2007.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.

APÊNDICE A
Curva Padrão de Biomassa

