



Aspectos toxicológicos do bissulfito e outros agentes tóxicos sobre a síntese de glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática de levedura de panificação.

Gattás, E.A.L.^{1*}; Peres, M.F.S.¹

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 17/11/06 / Aceito 20/12/06

RESUMO

A síntese de glicerol-3-fosfato desidrogenase intracelular (EC 1.1.1.8) foi investigada a partir de fermento de panificação em cultivos submersos, contendo glicose ou glicerol como únicas fontes de carbono. Agentes inibitórios da via glicolítica, do ciclo de Krebs e da Cadeia Respiratória inibiram a síntese da enzima quando adicionados em baixas concentrações até $7,5 \times 10^{-4}$ mol/L. A repressão exercida pela glicose sobre a síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase em meio YP-glicose foi reduzida, com a adição de produtos de fermentação e de bissulfito de sódio. Observou-se aumentos de 22-110% na síntese da enzima. Entretanto, em meio YP-glicerol, a adição de bissulfito de sódio 0,06 % (p/v) reduziu a síntese da enzima em 29%, enquanto, o acetaldeído 0,012 % (v/v) estimulou a síntese de glicerol-3-fosfato desidrogenase em 12%.

Palavras-chave: fermento de panificação; glicerol-3-fosfato desidrogenase; inibidores.

INTRODUÇÃO

O fluxo metabólico através das diversas vias metabólicas pode ser alterado por inibidores, moduladores e agentes que sequestram componentes das vias. As células possuem mecanismos de adaptações a mudanças drásticas no ambiente (físicas e nutricionais) que, geralmente são denominadas de condições de estresse. Mecanismos de adaptações à temperatura ou ao choque térmico ou ainda ausência de nutrientes e agentes tóxicos são estudados em leveduras (Craig 1992; Sanchez et al., 1992). Foi estudada a ação de diversas substâncias, em baixa concentração, sobre a expressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase em levedura de panificação crescidas em meio contendo glicose. Inibidores como arsenito e arseniato de sódio, azida de sódio, 2,4-dinitrofenol, fluoreto e bissulfito de sódio atuam em nível de ciclo de Krebs e cadeia respiratória bem como sobre a síntese de ATP.

Os íons arsenatos também podem substituir os íons fosfatos na reação de formação do ácido-3-fosfoglicérico a partir de gliceraldeído-3-fosfato, ocasionando diminuição do ATP das células, além de atuar juntamente com o arsenito sobre a atividade da α -ceto glutarato desidrogenase (Hought, 1990). O fluoreto sequestra o magnésio exigido pela enolase da via glicolítica e o bissulfito sequestra aldeído da mesma via, formando aducto e é utilizado para deslocar o fluxo da via glicolítica, no sentido do acúmulo do glicerol (Maier et al., 1986). A azida de sódio inibe a citocromo oxidase e o 2,4-dinitrofenol desfaz o gradiente mitocondrial de prótons, inibindo a ação da ATPase.

Outros inibidores interferem no nível intracelular das enzimas por atuarem sobre o sistema de expressão gênica. A cicloheximida inibe a síntese de um grande número de enzimas, em nível de transcrição (Lee et al., 1992). Em condições de estresse térmico, a adição de cicloheximida na presença de glicerol causa aumento do nível de HSP (proteína de choque térmico) sugerindo um possível efeito indutor sobre as enzimas envolvidas com a produção do glicerol (Stanley et al., 1993). Os íons Cu^{+2} e Cd^{+2} estimulam a síntese de proteínas de choque térmico (Craig, 1992).

Os níveis de glicerol-3-fosfato desidrogenase estão sujeitos a repressão por glicose (Entian & Barnett, 1992) e indução pelo sistema de regulação de pressão osmótica (Edgley & Brown, 1983; Blomberg et al., 1983). A repressão pela glicose em leveduras é complexa e tem sido extensivamente estudada (Overkamp et al. 2002; Lascaris et al. 2004; Palecek et al. 2002). As possíveis causas da repressão da síntese é inativação das enzimas e mudanças no transporte de açúcares (Bisson et al., 1993) e o fluxo de próton da célula. A expressão de um grande número de genes é necessária para a célula utilizar glicose como fonte de carbono, assim como, sacarose, maltose e galactose. Valier et al. (1994), estudando o gene GRR1 (glucose repression regulation) mostraram possíveis correlações entre repressão por glicose e processos de transportes. Este gene de repressão por glicose, também responde a mudanças morfológicas das células, transportes de cátions bivalentes

*Autor correspondente: Edwil Aparecida de Lucca Gattás - Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 - Caixa Postal 502 - CEP 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - Fone: (16) 3301-6929 - Fax: (16) 3301-6920 - E-mail: gattas@fcfar.unesp.br

e outros processos. A repressão pela glicose acontece em nível de transcrição, com algumas poucas exceções (Trumpley, 1992).

Neste trabalho, submeteu-se as células de levedura à presença de agentes tóxicos e/ou em concentrações tóxicas de agentes que limitam parcialmente o crescimento em meio contendo glicose (meio reprimido) ou glicerol (meio não reprimido) como fonte de carbono. O objetivo foi induzir sinais para elevação do nível da glicerol-3-fosfato desidrogenase constitutiva como aparecimento de atividades de uma fração enzimática induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi isolada de fermento de panificação produzido pela Fleischmann & Royal Ltda. A manutenção desta linhagem foi realizada em geladeira a 4°C por até 6 meses em meio YPD em Agar inclinado (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura (Difco), 20 g/L de peptona (Difco) e 20 g/L de agar (Difco)).

Preparo do Inoculo, Crescimento e Produção da Enzima

Transferiram-se duas alçadas de células para 50 mL de meio (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), contidos em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL e submetidos à agitação por 24 horas a 250 rpm e 30°C. As células foram conservadas por uma noite a 4°C em repouso, para sedimentação da biomassa (cerca de 12 horas). O sobrenadante foi descartado e a biomassa concentrada, convenientemente diluída, e utilizada como inoculo. Os experimentos de crescimento da levedura e produção da enzima foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de meio, em mesa agitadora operando a 250 rpm, a 30°C. O pH do meio foi ajustado para 4,5 antes da esterilização. O meio para o crescimento da levedura e produção da enzima foi esterilizado a 120°C por 15 minutos e apresentou a seguinte composição: extrato de levedo 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e fonte de carbono 4% (glicose ou glicerol) conforme o ensaio. O inoculo foi adicionado para se obter densidade inicial de células de 0,050 mg/mL com base na massa seca. O tempo total do crescimento foi de 48 horas e a determinação da biomassa final foi realizada por meio de medidas turbidimétricas a 570 nm e um coeficiente de conversão de uma curva padrão que relaciona medidas de absorvâncias e massa seca foi utilizado.

Adição de Agentes Tóxicos e Subprodutos de Fermentação ao Meio de Crescimento

Os experimentos para observação dos efeitos de adição de agentes tóxicos e subprodutos de fermentação foram realizados conforme descrito acima. Os agentes

tóxicos: fluoreto de sódio, arsenato de sódio, arsenito de sódio, bissulfito de sódio, azida de sódio, 2,4 dinitrofenol, sulfato de cobre, sulfato de cádmio e cicloheximida foram adicionados ao meio de crescimento da levedura, após esterilização por filtração, em membrana Millipore 0,22 µm.

Os subprodutos: acetaldeído, acetato de sódio, citrato de sódio, succinato de sódio, propionato de sódio e glicerol foram adicionados ao meio de crescimento da levedura, após esterilização por filtração, em membrana Millipore 0,22 µm, exceto glicerol esterilizado separadamente do meio.

Preparo dos extratos celulares

Para cada 100 mg de células liofilizadas, pesadas em frascos de vidro com capacidade de 5 mL, foi adicionado 1 mL de tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,01 M de NaF. O rompimento celular foi realizado em agitador de tubos (Tecnal, modelo 162), por trituração com esferas de vidro (1g) de diâmetro de 425-600 microns (Sigma, G8772) por quatro vezes (períodos de 30 segundos seguido de 30 segundos de intervalo em banho de gelo), atingindo rompimento celular de aproximadamente 80%. O extrato enzimático foi obtido do sobrenadante da centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm e utilizado imediatamente nos ensaios de atividade enzimática.

Atividade da Glicerol-3-fosfato desidrogenase

Foi utilizada uma modificação do ensaio descrito por Wieland (1974), que se baseia na conversão enzimática do glicerol-fosfato, com redução do NAD⁺ a NADH. A mistura da reação (tubo teste), de volume final de 3,3 mL continha os seguintes reagentes: 0,42 mM de NAD⁺ (Sigma G6501), 0,11 M de tampão glicina/NaOH contendo 0,88 M de hidrato de hidrazina, pH 9,8, 10 mM de cloreto de manganês e extrato enzimático diluído. O controle (tubo branco) foi determinado da mesma maneira, adicionando-se água no lugar do glicerol fosfato. A atividade do extrato frente ao glicerol-fosfato foi realizada pela diferença de absorvância a 340nm (teste - branco), por minuto, e o coeficiente de absorção do NADH foi 6,02 x 10³ /M cm. Uma unidade de atividade de G-3-PDH é equivalente a 1 µmol de NADH formado por minuto nas condições acima mencionadas. As determinações enzimáticas foram realizadas em duplicatas e os resultados apresentados mostraram desvios com variações de até 5%.

Determinação de proteína total

O teor de proteína foi determinado utilizando o método Folin-Lowry modificado por Layne (1975). Os ensaios foram realizados em duplicatas para cada amostra e os resultados mostraram desvios com variações de até 2%. O cálculo da atividade específica da glicerol-3-fosfato desidrogenase (U/mg) corresponde a relação entre a atividade enzimática e a concentração de proteína total.

Tabela 1 - Efeito da adição de substâncias que inibem crescimento de leveduras e atuam sobre a síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase em meio YP-glicose.

SUBSTÂNCIAS			ATIVIDADE DE G-3-PDH			
Natureza	Concentração (mol/L)	Biomassa Final (mg/mL)	U/mL	Atividade Relativa	Proteínas mg/mL	U/mg
Controle	-	10,5	0,143	1,00	11,2	0,013
Fluoreto de Sódio	$1,0 \times 10^{-5}$	9,9	0,058	0,41	3,84	0,015
Arsenato de Sódio	$3,2 \times 10^{-4}$	5,5	0,127	0,89	12,2	0,010
Arsenito de Sódio	$7,5 \times 10^{-4}$	8,5	0,027	0,19	1,40	0,019
Bissulfito de Sódio	$4,8 \times 10^{-4}$	9,3	0,223	1,56	7,25	0,031
Azida de Sódio	$1,0 \times 10^{-5}$	8,5	0,042	0,29	1,40	0,030
2,4-dinitrofenol	$1,0 \times 10^{-5}$	9,1	0,106	0,74	4,85	0,022
Sulfato de Cobre	$1,1 \times 10^{-4}$	9,2	0,106	0,74	11,0	0,009
Sulfato de Cádmi	$7,5 \times 10^{-6}$	4,5	0,025	0,17	3,23	0,008
Cicloheximida	$3,6 \times 10^{-6}$	9,1	0,149	1,04	10,4	0,014

Reprodutibilidade dos Resultados

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas com resultado divergentes até 5% conforme Callegari-Jacques (2003).

RESULTADOS

Ensaio preliminares foram realizados a fim de determinar as concentrações permitidas dos diversos agentes tóxicos no meio de crescimento da levedura. As substâncias

tóxicas foram ensaiadas em concentrações variáveis com a finalidade de limitarem parcialmente o crescimento e estimularem atividades de uma fração enzimática induzida. A Tabela I mostra o efeito dos inibidores sobre a síntese da enzima em meio contendo glicose como fonte de carbono. Fluoreto, arsenato, arsenito, azida de sódio e 2,4 dinitrofenol, sulfato de cobre e sulfato de cádmio, nas condições ensaiadas, inibiram a síntese da enzima. Os íons Cu^{2+} e Cd^{2+} , que estimulam a síntese de proteínas de choque térmico, foram inibidores da síntese da G-3-PDH. A menor inibição foi observada com arsenato de sódio que estimulou a síntese de proteínas totais. A adição da cicloheximida não variou a síntese da G-3-PDH e de proteína total, enquanto que, o bissulfito de sódio estimulou a síntese da enzima da ordem de 56% com redução de síntese protéica.

A Figura 1 mostra os efeitos das adições de subprodutos da fermentação ao meio YP-glicose. Estes compostos ativaram a síntese da enzima em baixas concentrações. O acetaldeído na concentração de 0,02% (v/v) estimula a síntese da enzima da ordem de 22% (atividade relativa de 1,22 vezes), enquanto que, o acetato 0,1% (p/v) estimulou na ordem de 82% e mostrou um efeito inibitório intenso sobre o crescimento. O propionato e o glicerol, em pequenas quantidades exerceram efeito estimulante sobre a síntese enzimática, sem inibir o crescimento da levedura.

Na Tabela 2 a adição do acetaldeído 0,012% (v/v) na fase exponencial de crescimento em meio YP-glicerol mostrou um efeito estimulante sobre a síntese da enzima de 12% sem inibição de biomassa e proteína total. No entanto, a cicloheximida (Tabela 3), que inibe a síntese de proteínas, em nível de transcrição mostrou efeito inibitório sobre a síntese da G-3-PDH e da sua atividade específica, já a adição de 0,06% do bissulfito de sódio (Tabela 4), inibiu em 70 % a formação de biomassa, 26 % a proteína total e 28,8% a síntese da enzima.

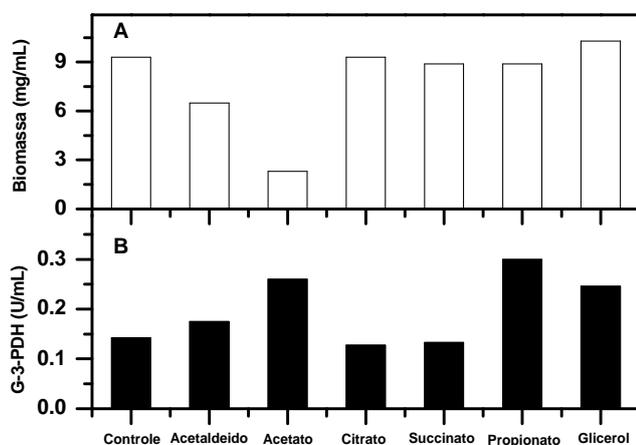


Figura 1. Efeito da adição de subprodutos da fermentação alcoólica (acetaldeído 0,02% (p/v), acetato 0,1% (p/v), citrato 0,1% (p/v), succinato 0,1% (p/v), propionato 0,1% (p/v) e glicerol 0,1% (p/v)) sobre a formação de biomassa (A) e síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase (B) em meio YP-glicose.

Tabela 2 - Efeito da adição do acetaldeído na fase exponencial de crescimento da linhagem GD0 em meio YP-glicerol sobre o nível intracelular da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G-3-PDH).

Acetaldeído (% v/v)	Biomassa Final (mg/mL)	ATIVIDADE DA G-3-PDH			
		U/mL	Proteínas		U/mg
			Atividade Relativa	mg/mL	
-	7,55	0,520	1,00	16,7	0,031
0,012	7,34	0,592	1,12	16,7	0,035

Tabela 3 - Efeito da adição de cicloheximida na linhagem GD0 em meio YP-glicerol sobre o síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G-3-PDH).

Cicloheximida (mol/L)	Biomassa Final (mg/mL)	ATIVIDADE DA G-3-PDH			
		U/mL	Proteínas		U/mg
			Atividade Relativa	mg/mL	
-	7,4	0,467	1,0	12,0	0,038
$3,6 \times 10^{-6}$	7,0	0,308	0,67	11,0	0,028

Tabela 4 - Efeito da adição do bissulfito de sódio na fase exponencial de crescimento da linhagem GD0 em meio YP-glicerol sobre a síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G-3-PDH).

Concentração de bissulfito		Biomassa Final (mg/mL)	ATIVIDADE DA G-3-PDH			
(% p/v)	mmol/L		U/mL	Proteínas		U/mg
				Atividade Relativa	mg/mL	
-	-	7,0	0,552	1,00	18,4	0,030
0,06	0,10	2,1	0,393	0,71	13,6	0,030

DISCUSSÃO

O bissulfito deve ser adicionado a processos de fermentação de açúcares destinados a produção de glicerol para desviar o metabolismo no sentido do acúmulo deste triol, pelo *S. cerevisiae*. Os resultados do presente estudo mostram que o bissulfito estimulou a formação da G3-PDH apenas em meio YP-glicose (1,56 vezes).

A azida de sódio 0,1 mM e 2,4-DNF 0,03 mM inibiram a produção de etanol e crescimento durante o cultivo aerado do *S. cerevisiae* em meio YP-glicose 4% (Lighthelm et al., 1988) indicando bloqueio de atividade mitocondrial. No entanto, a produção de biomassa pelo *S. cerevisiae* em presença destes inibidores foi menor. Estes dois inibidores também reduziram a síntese da G-3-PDH em nossos estudos. Outros inibidores (arsenito e arsenato de sódio e fluoreto de sódio) também foram estudados sendo a azida e o arsenito os maiores inibidores da formação de G-3-PDH. O fluoreto inibiu a síntese de enzima, mas não alterou o rendimento da biomassa.

Os produtos de fermentação alcoólica que adicionou-se ao meio YP-glicose e estimularam a síntese da G-3-PDH foram acetato, propionato, glicerol e acetaldeído. O

acetaldeído é conhecido como inibidor de crescimento (Stanley & Pamment, 1992) bem como o acetato, em fermentações aeróbicas (Phowchinda et al., 1995).

Os metais pesados Cu^{++} e Cd^{++} inibiram parcialmente o crescimento bem como a síntese da G-3-PDH.

A cicloheximida protege as células contra termo-resistência por induzir a síntese de proteína de choque térmica (Lee et al., 1992). Os dados deste estudo mostram que a cicloheximida inibiu a síntese de proteínas totais tanto em meio contendo glicerol, quanto em meio contendo glicose como fontes de carbono. No entanto, inibição da síntese de G-3-PDH e da proteína total foi observada em meio contendo glicerol como fonte de carbono (0,67 vezes), ao passo que, a atividade específica não sofreu alteração. Pequeno estímulo da ordem de 1,04 vezes foi observado no meio contendo glicose como fonte de carbono.

Com base nos resultados apresentados, propionato de sódio e acetato de sódio em meio YP-glicose, estimularam a síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase (110 e 82%, respectivamente), seguido por glicerol (67 %) e bissulfito de sódio (56 %). No meio YP-glicerol a adição de 0,012 % (v/v) de acetaldeído estimulou a síntese da enzima em 12 %.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório da Profa. Dra. Cecília Laluze, Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química da UNESP, Araraquara, com auxílio financeiro do PADC/FCF/UNESP (Processo 95/12-I).

ABSTRACT

Toxicological effects of bisulfite and other toxic agents on the cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of baker's yeast.

The synthesis of intracellular glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) in baker's yeast was investigated in submerged culture supplied with glucose or glycerol as sole carbon sources. Inhibitors of the glycolytic pathway, Krebs cycle and respiratory chain did not stimulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase synthesis when added in low concentrations in up 7.5×10^{-5} mol/L. The repression exercised by glucose on the synthesis of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in YP-glucose medium was reduced by the addition of fermentation products and of sodium bisulfite. Synthesis of the enzyme was raised 22-110%. However, in YP-glycerol medium, the addition of 0.06% (w/v) sodium bisulfite reduced (29%) the synthesis of the enzyme, while 0.012% (v/v) acetaldehyde stimulated the synthesis of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by 12%.

Keywords: baker's yeast; glycerol-3-phosphate dehydrogenase; inhibitors.

REFERÊNCIAS

Bisson LF, Coons DM, Kruckeberg AL, Lewis DA. Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28:259-308.

Blomberg A, Larsson C, Gustafsson L. Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in regulation to physiological state. *J Bacteriol* 1983; 171:1087-92.

Callegari-Jacques SM, editor. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.144-52.

Craig EA. The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Jones EW, Pringle JR, Broach JR, editors. *The Molecular and cellular biology of the yeast saccharomyces*. New York: Cold Spring Harbor; 1992. p.501-37.

Edgley M, Brown AD. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J Gen Microbiol* 1983; 129:3453-63.

Entian KD, Barnett JA. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:506-10.

Hought JS. Fermentación- fundamentos del proceso. In: Hought JS, editor. *Biotecnología de la cerveza y de la malta*. Zaragoza: Acribia; 1990; 8:133-56.

Lascaris R, Piwowarski J, Van Der Spek H, De Mattos JT, Grivell L, Blom J. Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology* 2004; 150:929-34.

Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Colowich SP, Kaplan NO, editors. *Methods enzymology*. New York: Academic Press; 1975; 73:448-50.

Lee YJ, Hou ZZ, Corry PM. Effect of cycloheximide on nonpermissive temperature killing in tsH1 mutant cells. *J Therm Biol* 1992; 17:313-6.

Lighthelm ME, Prior A, Dupreez JC. The effect of respiratory inhibitors on the fermentative ability of *Picchia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* under various conditions of aerobiosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988; 29:67-71.

Maier K, Hinze H, Leuschel L. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1986; 848:120-30.

Overkamp KM, Bakker BM, Kottler P, Lutik MAH, Van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environm Microbiol* 2002; 68:2814-21.

Palecek SP, Parikh AS, Huh JH, Kron SJ. Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Mol Microbiol* 2002; 45:453-69.

Phowchinda O, Délia-Dupuy ML, Strehaiano P. Effects of acetic acid on grown and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 1995; 17:237-42.

Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. *Embo J* 1992; 11:2357-64.

Stanley GA, Douglas NG, Every EJ, Tzanatos T, Pamment NB. Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnol Lett* 1993; 15:1199-204.

Stanley GA, Pamment NB. Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 1992; 42:24-9.

Trumbly RJ. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 1992; 6:15-21.

Valier LG, Cooms D, Bisson LF, Carlson M. Altered regulatory responses to glucose are associated with a glucose transport defect in *grr 1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1994; 136:1279-85.

Wieland O. Glycerol, UV-Method. In: Bergmeyer, HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd.ed. New York: Academic Press; 1974. p.1404-09.