

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

ESTUDO CINÉTICO DE *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 A PARTIR DE
FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO VISANDO A SÍNTESE
DE β -GALACTOSIDASE

ELIZA BONIFACIO SCHOLZ

JOINVILLE

2011

ELIZA BONIFACIO SCHOLZ

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 apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Processos na Universidade da
Região de Joinville - UNIVILLE
Orientadora: Dr^a Andréa Lima dos Santos Schneider
co-Orientadora: Dr^a Ana Paula Testa Pezzin

JOINVILLE

2011

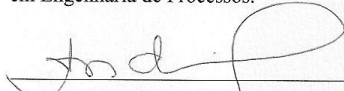
Termo de Aprovação

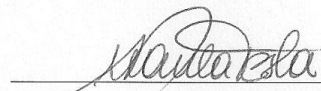
“Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase”


por

Eliza Bonifacio Scholz

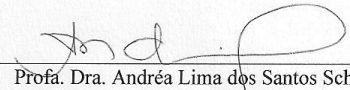
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.

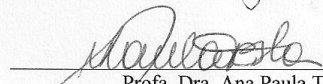

 Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
 Orientadora (UNIVILLE)

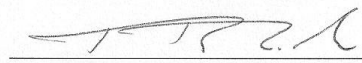

 Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
 Co-Orientadora (UNIVILLE)

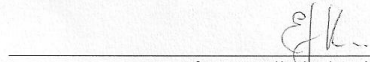

 Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
 Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:


 Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
 Orientadora (UNIVILLE)


 Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
 Co-Orientadora (UNIVILLE)


 Prof. Dra. Rosane Rech
 (UFRGS)


 Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
 (UNIVILLE)

Joinville, 20 de dezembro de 2011.

Dedicatória

Dedico a obtenção deste título aos meus amores: Michael, Donária, Sueli, Mariza, Adriana, Alessandra, Paula e Carlos Jr.

Por estarem sempre ao meu lado, apoiando, ajudando e incentivando.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho;

À minha família: Vóvi, Aunt, tia Mariza, Adriana, Sissi, Paulinha, Jú, Kleber, Henrique e Marília, pelo apoio, incentivo, carinho, paciência;

Ao meu noivo Michael, por toda a ajuda, pelo companheirismo, paciência, apoio, incentivo.

Especialmente ao meu amigo Maikon Kelbert, por me ajudar tanto em todas as dissertações iniciadas e por me ajudar a chegar até esta defesa.

À Prof^a Andréa Schneider, por guiar este trabalho, pela paciência, ajuda e o apoio;

À Prof^a Ana Paula Pezzin, por toda a ajuda, pelo incentivo e carinho;

À Prof^a Elisabeth Wisbeck, por aceitar participar desta banca e por toda a compreensão;

À Prof^a Rosane Rech, por aceitar participar desta banca;

Ao meus sogros, Eunice e Pedro, pelo carinho e pela ajuda;

À Prof^a Giannini Appati pelo auxílio no delineamento experimental e pelo carinho;

À Michele Cristina Garcia, pelos conselhos e por toda a ajuda;

À Carolina Pinheiro Barbosa, por sempre ser tão querida e por toda a ajuda;

Às minhas amigas Ellen, Deyse, Wanda, Amanda e Sílvia, pelo incentivo e carinho;

À minha amiga Camilla, pelo apoio, incentivo e carinho;

Aos meus amigos de mestrado Cleberson, Eveline, Lilian, Márcia, Sara e Schaiene, pelo companheirismo.

Aos meus amigos de laboratório, Bruna, Endi, Gustavo, Jéssica, Ketlyn, Maíra, pelo companheirismo, ajuda e incentivo.

RESUMO

A lactose é um açúcar presente no leite e em seus derivados. Para sua hidrólise é necessária a ação da enzima β -galactosidase, também conhecida como lactase, gerando os monômeros glicose e galactose. A deficiência na produção da β -galactosidase pode ocasionar uma síndrome conhecida como intolerância à lactose, com sintomas como, flatulência, cólicas, diarreia, inchaço, dores de cabeça, dentre outros desconfortos. Uma alternativa para as pessoas intolerantes à lactose é a ingestão de suplemento de β -galactosidase ou a ingestão de produtos com baixo teor de lactose. Porém a maior parte da β -galactosidase consumida no Brasil é importada, o que dificulta o acesso a esta enzima. Diante deste quadro, muitos estudos estão direcionados para a produção da β -galactosidase utilizando micro-organismos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a produção de β -galactosidase, avaliando o efeito das concentrações dos substratos, da temperatura e da agitação sobre o crescimento celular e a produção da enzima. Assim, por meio de um delineamento experimental, avaliou-se como fonte de carbono o soro de queijo (125, 250 ou 375 mL.L⁻¹), oriundo da indústria de laticínios e como fontes de nitrogênio a água de maceração do milho, milhocina (3, 6 ou 9 g.L⁻¹), e um extrato bruto de levedura, comercialmente conhecido como Prodex Lac (0, 2,5 ou 5 g.L⁻¹). Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer aletados de 1000 mL contendo 300 mL de meio de cultivo, por 24h com agitação de 120, 180 ou 220 min⁻¹, conforme o ensaio. As temperaturas avaliadas foram 30, 37 ou 44°C. Em paralelo foi observada a produção de etanol, em diferentes concentrações, de acordo com a agitação e a concentração inicial de lactose contida no soro de queijo. Observando as curvas de crescimento e os valores dos fatores de conversão, assim como os parâmetros significativos apontados no tratamento dos dados, conclui-se que o experimento contendo soro de queijo (125 mL.L⁻¹) e milhocina (9 g.L⁻¹) conduzidos em 44°C e 220 min⁻¹, foi o mais indicado para a produção de β -galactosidase. E para o crescimento celular da levedura, conclui-se que o experimento contendo soro de queijo (125 mL.L⁻¹) e milhocina (3 g.L⁻¹), em 30°C e 220 min⁻¹, foi a melhor condição. A enzima produzida se mostrou estável nas temperaturas de 30 e 37°C, sendo estas as melhores temperaturas para a atividade enzimática de β -galactosidase. A enzima ficou estável durante 8 dias, quando armazenada de forma refrigerada e congelada e quanto ao pH, se mostrou estável em pH 6 e 7. Diante dos resultados, conclui-se que as fontes alternativas de carbono e nitrogênio avaliadas foram satisfatórias para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, assim como para a produção da enzima β -galactosidase.

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus*, β -galactosidase, soro de queijo, milhocina, Prodex.

ABSTRACT

Lactose is a sugar found in milk and its derivatives. Its hydrolysis requires the action of the enzyme β -galactosidase, also known as lactase, to the monomers glucose and galactose. Deficient production of β -galactosidase can cause a syndrome known as lactose intolerance, with symptoms such as bloating, cramping, diarrhea, headaches, among other discomforts. An alternative for lactose-intolerant people is the intake of dietary β -galactosidase or ingestion of products with low lactose content. But most of the β -galactosidase consumed in Brazil is imported, fact that difficult the access to this enzyme. Given this framework, many studies are dedicated to the production of β -galactosidase using micro-organisms. In this context, the aim of this work, was to study the kinetics of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 alternative sources of carbon and nitrogen aiming the production of β -galactosidase in evaluating the effect of concentrations of substrates, temperature and agitation on cell growth and enzyme production. Thus, through an experimental design was evaluated as a carbon source the cheese whey (125, 250 or 375 mL.L⁻¹), derived from the dairy industry and as sources of nitrogen to corn steep liquor (3, 6 or 9 g.L⁻¹), from the corn steep liquor, and a crude extract of yeast, commercially known as Prodex Lac (0, 2.5 or 5 g L⁻¹). The experiments were conducted in Erlenmeyer flasks containing finned 1000 mL, with 300 mL of culture medium for 24 h with agitation of 120, 180 or 220 min⁻¹, as the test. Temperatures evaluated were 30, 37 or 44 °C. In parallel was observed the production of ethanol in different concentrations, in accordance with the excitement and initial concentration of lactose contained in whey. Observing the growth curves and the values of conversion factors, as well as significant parameters indicated in the treatment of the data, it's conclude that the experiment containing cheese whey (125 mL.L⁻¹) and corn steep liquor (9 g.L⁻¹) carried out at 44°C and 220 min⁻¹, was the most suitable for the production of β -galactosidase. About the cell growth, it's concluded that the experiment containing cheese whey (125 mL.L⁻¹) and corn steep liquor (3 g.L⁻¹), carried out at 30 °C and 220 min⁻¹, was the best condition. The enzyme produced remained stable at temperatures of 30 and 37 °C, these also are the best temperatures for enzyme activity of β -galactosidase. The enzyme was stable for 8 days when stored in a refrigerated and frozen, and about pH, the enzyme kept stable at pH 6 and 7. Considering the results, it's conclude that alternative sources of carbon and nitrogen evaluated were satisfactory for the growth of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, as well as for the production of the enzyme β -galactosidase.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, β -galactosidase, cheese whey, corn steep liquor, Prodex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Molécula da lactose.....	20
Figura 2.2: Hidrólise da lactose pela ação da β -galactosidase em glicose e galactose.....	21
Figura 2.3: Esquema da absorção da lactose no intestino.....	23
Figura 2.4: Formação de Galacto-oligossacarídeos (GOS).....	28
Figura 2.5: Imagem microscópica da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556.....	32
Figura 2.6: Produção de queijo e do sub-produto soro.....	36
Figura 3.1: Aspecto visual do soro de queijo antes e depois da desproteínização.....	42
Figura 4.1: Velocidade específica máxima de crescimento μ_{max}	51
Figura 4.2: Consumo de lactose por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 nos experimentos conduzidos em frascos agitados em diferentes condições de cultivo.....	55
Figura 4.3: Curvas do consumo de lactose e produção de etanole biomassa no experimento cultivado em 30°C e 220 min ⁻¹ , contendo soro de queijo (125 mL.L ⁻¹), milhocina (3 g.L ⁻¹) e sem Prodex.....	56
Figura 4.4: Curvas do consumo de lactose e produção de etanol, biomassa e β -galactosidase (Aemax) no cultivo conduzido em 44°C e 1 20 min ⁻¹ , contendo soro de queijo (375 mL.L ⁻¹),milhocina (3 g.L ⁻¹) e sem Prodex.....	57
Figura 4.5: Curvas de consumo de lactose e produção de etanol, biomassa e β -galactosidase no experimento cultivado em 44°C e 220 min ⁻¹ , contendo soro de queijo (125 mL.L ⁻¹), milhocina (9 g.L ⁻¹) e sem Prodex.....	58
Figura 4.6: Gráfico relacionando a concentração de lactose dos cultivos com os respectivos fatores de conversão de substrato em células.	59
Figura 4.7: Gráfico relacionando a concentração de lactose dos cultivos com os respectivos fatores de conversão de substrato em enzima.....	59
Figura 4.8: Curvas referentes à estabilidade de β -galactosidase com o tempo...	61
Figura 4.9: Curvas de estabiliadde de β -galactosidase com a temperatura.....	62
Figura 4.10: Estabilidade da β -galactosidase com o pH.....	63

Figura 4.11: Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -galactosidase.....	64
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1: Exemplos de micro-organismos considerados GRAS.....	30
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Micro-organismos produtores de β -galactosidase e suas condições ideais para atividade enzimática máxima.....	27
Tabela 2.2: Comparação do metabolismo entre algumas leveduras.....	31
Tabela 2.3: Relação de estudos empregando soro de queijo como substrato.....	37
Tabela 2.4: Relação de estudos empregando milhocina como fonte de nitrogênio.....	38
Tabela 2.5: Relação de agitações utilizadas em cultivos.....	39
Tabela 2.6: Relação de temperaturas utilizadas em cultivo.....	40
Tabela 3.1. Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no delineamento experimental.....	42
Tabela 3.2. Matriz Plackett & Burman com 12 ensaios e ponto central em triplicata.....	43
Tabela 4.1: Resultados dos parâmetros testados.....	50
Tabela 4.2: Efeitos calculados no delineamento PB sobre a concentração celular máxima.....	52
Tabela 4.3. Efeitos calculados no delineamento PB sobre a produção máxima de enzima.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AE: atividade enzimática (U.mL^{-1})
- AET_0 : atividade enzimática inicial (U.mL^{-1})
- AET_{esp} : atividade enzimática específica (U.g^{-1})
- AET_{max} : atividade enzimática máxima (U.mL^{-1})
- ATCC: American Type Culture Collection
- ATP: adenosina tri-fosfato
- CBS: Centraalbureau Voon Schimmelcultures
- DBO: demanda bioquímica de oxigênio
- (dX/dt) : velocidade instantânea de crescimento celular ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- FDA: *Food and Drug Administration* (EUA)
- GOS: galacto-oligossacarídeos
- GRAS: *generally recognized as safe*
- HPLC: *high performance liquid chromatography*
- L: caminho ótico (cm)
- NCY: *non conventional yeasts*
- NDO: *non digestable oligosaccharides*
- ONP: *o*-nitrofenil
- ONPG: *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
- PA: reagente com pureza para análise
- PB: delineamento Plackett & Burman
- $P_{X\text{max}}$: produtividade celular máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- QPS: *qualified presumption of safety*
- S_0 : concentração inicial de substrato (g.L^{-1})
- S_f : concentração final de substrato (g.L^{-1})
- t: tempo de cultivo (h)
- V_a : volume da amostra (mL)
- V_f : volume final do teste (mL)
- X: concentração celular (g.L^{-1})

X' : concentração celular correspondente à AET_{max} ($g.L^{-1}$)

X_0 : concentração celular inicial ($g.L^{-1}$)

X_{max} : concentração celular máxima ($g.L^{-1}$)

$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto ($g.g^{-1}$)

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células ($g.g^{-1}$)

YPL: meio de cultivo contendo *yeast extract*, *peptona*, *lactose*

ΔA : diferença da absorvância entre o branco e a amostra

ϵ : coeficiente de extinção molar do produto da reação ($cm^2.\mu mol^{-1}$)

μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE QUADROS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
INTRODUÇÃO.....	17
1 OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 LACTOSE.....	20
2.1.1 Metabolismo da lactose.....	21
2.1.2 Intolerância à lactose.....	22
2.2 ENZIMAS.....	24
2.2.1 Aplicações das enzimas.....	25
2.2.2 Fatores que afetam a atividade enzimática.....	25
2.2.2.1 Temperatura.....	25
2.2.2.2 pH.....	26
2.2.3 β -galactosidase.....	27
2.2.4 Produção de enzimas por micro-organismos.....	29
2.2.5 Aplicações da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	32
2.3 Metabolismo de carboidratos nas leveduras.....	32
2.4 Fatores que influenciam o crescimento celular.....	34
2.4.1 Fontes de carbono.....	35
2.4.1.1 Soro de queijo.....	35
2.4.2 Fontes de nitrogênio.....	37
2.4.2.1 Prodex.....	38
2.4.2.2 Milhocina.....	38
2.4.3 Agitação.....	39
2.4.4 Temperatura.....	40
3 METODOLOGIA.....	41

3.1 MICRO-ORGANISMO.....	41
3.2 ATIVAÇÃO DA CEPA.....	41
3.3 DEFINIÇÃO DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO DE CULTIVO E DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.....	41
3.4 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA.....	41
3.5 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE LACTOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL.....	44
3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	44
3.6.1 Rompimento celular.....	44
3.6.2 Determinação da atividade enzimática.....	45
3.6.2.1 Atividade enzimática volumétrica.....	45
3.6.2.2 Atividade enzimática específica.....	46
3.7 Caracterização da enzima β -galactosidase.....	46
3.7.1 Estabilidade com o tempo.....	46
3.7.2 Estabilidade com a temperatura.....	47
3.7.3 Estabilidade com o pH.....	47
3.7.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	47
3.8 METODOLOGIA DE CÁLCULO.....	47
3.8.1 Fatores de conversão	48
3.8.2 Produtividade celular máxima $P_{x_{max}}$	48
3.8.3 Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max})	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, AGITAÇÃO, SORO DE QUEIJO, PRODEX E MILHOCINA, NO CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE.....	50
4.1.1 Crescimento celular.....	50
4.1.2 Produção de β -galactosidase.....	53
4.2 ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556.....	54
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE.....	60
4.3.1 Estabilidade com o tempo.....	60
4.3.2 Estabilidade com a temperatura.....	61
4.3.3 Estabilidade com o pH.....	62
4.3.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase.....	64

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS.....	83
ANEXO A: ORÇAMENTO DE MATÉRIAS PRIMAS.....	83
APÊNDICES.....	84
APÊNDICE A: CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	84
APÊNDICE B: CROMATOGRAMA TÍPICO.....	85
APÊNDICE C: CURVAS DO CONSUMO DE LACTOSE, PRODUÇÃO DE ETANOL, BIOMASSA E β-GALACTOSIDASE NOS EXPERIMENTOS.....	85
APÊNDICE D: MÉDIAS E VALORES DE DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DA β-GALACTOSIDASE.....	87

INTRODUÇÃO

A lactose é um açúcar presente no leite e seus derivados, sendo necessária para a sua hidrólise a ação de uma enzima gerando dois monômeros: glicose e galactose. A enzima responsável por esta hidrólise é a β -galactosidase, mais conhecida como lactase, que é naturalmente produzida no intestino.

A deficiência na produção da β -galactosidase pode ocasionar a ocorrência de uma síndrome conhecida como intolerância à lactose, sendo que as pessoas que apresentam este quadro não conseguem hidrolisá-la. Com a sua permanência no intestino as bactérias existentes fermentam a lactose não hidrolisada gerando ácidos graxos, gás carbônico e gás hidrogênio, que podem resultar em flatulência, cólicas, diarreia, inchaço, dores de cabeça, dentre outros sintomas.

As pessoas intolerantes à lactose têm como alternativa não consumir produtos que contenham lactose ou utilizar suplementos de β -galactosidase para suprir esta deficiência no organismo. No entanto, a maior parte da β -galactosidase consumida no Brasil é importada o que dificulta o acesso ao medicamento. Sendo assim, vários estudos estão sendo realizados para a produção de β -galactosidase utilizando micro-organismos, destacando-se as leveduras do gênero *Kluyveromyces*.

Dentre as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, as linhagens que vêm sendo estudadas com maior destaque para a produção de β -galactosidase são as espécies *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*. A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo mais estudada devido às suas características: capacidade de utilizar como fonte de carbono e nitrogênio, substratos alternativos, além de ser termotolerante e apresentar rápida taxa de crescimento.

Os micro-organismos requerem fonte de carbono e de nitrogênio e as matérias primas utilizadas para este fim, podem representar cerca de até 75% do custo total de um processo biotecnológico. Uma alternativa para diminuir o custo de produção é a utilização de fontes alternativas de carbono e nitrogênio para o cultivo.

Os estudos relatam a utilização de soro de queijo como fonte de carbono e milhocina e Prodex Lac® como fontes de nitrogênio. O soro de queijo é um resíduo oriundo da produção de laticínios, tendo em sua composição aproximadamente 5% de lactose, dentre outros componentes. A milhocina é a água de maceração do milho, possuindo alto valor nutritivo.

O Prodex Lac® é um extrato de levedura bruto, que tem valor comercial bem menor que o extrato de levedura purificado.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a cinética de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio, visando a produção de β -galactosidase.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a influência de uma fonte alternativa de carbono (soro de queijo) e diferentes fontes de nitrogênio (Prodex Lac® e milhocina) sobre o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e a produção de β -galactosidase, por meio de um delineamento experimental;
- ✓ Verificar a influência da temperatura e da agitação sobre o crescimento celular e a produção de β -galactosidase, por meio de um delineamento experimental;
- ✓ Verificar a produção de etanol;
- ✓ Caracterizar a enzima β -galactosidase produzida quanto à estabilidade com tempo, temperatura e pH;
- ✓ Verificar a temperatura ótima para a atividade da enzima β -galactosidase produzida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LACTOSE

A α - β -D-galactopiranosil-(1,4)-D-glicose ou lactose, que tem fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ (GUIMARÃES *et al.*, 2010), é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose e galactose unidos por meio de uma ligação glicosídica β – 1, 4 (AMMAM e FRANSAER, 2010), como mostrado na Figura 2.1.

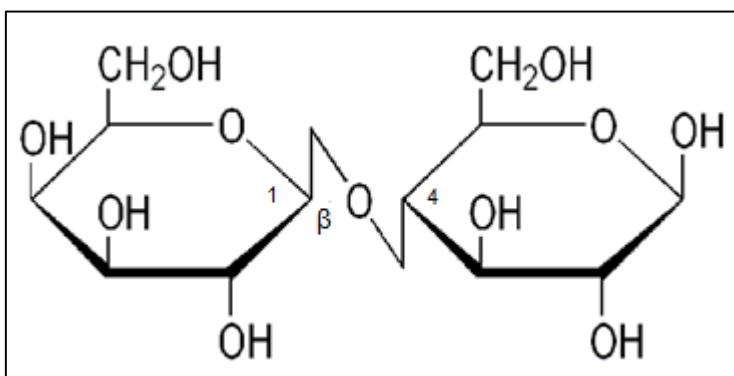


Figura 2.1: Molécula da lactose

Fonte: Adaptado de LOMER *et al.*, 2008.

A lactose é um açúcar redutor encontrado apenas no leite de mamíferos (NEU, 2010). No leite humano a concentração de lactose é de aproximadamente 72 g.L^{-1} e no leite de vaca é de aproximadamente 47 g.L^{-1} (LOMER *et al.*, 2008).

Este açúcar é um dos excipientes mais usados na indústria farmacêutica e é um componente importante nos produtos lácteos em pó e em ingredientes alimentares. É utilizada na indústria alimentícia devido ao seu poder adoçante e como agente escurecedor em pães, que se faz por meio da reação de Maillard (LISTIOHADI *et al.*, 2008; LOMER *et al.*, 2008; LISBOA, 2008). A reação de Maillard ocorre entre o grupo carbonila de açúcares redutores e grupamentos amínicos das proteínas, formando o composto denominado melanoidina, que confere cor escura e um odor característico aos alimentos (BRIÃO *et al.*, 2011).

2.1.1 Metabolismo da lactose

O metabolismo de dissacarídeos é precedido pela sua hidrólise em seus monômeros (FLORES *et al.*, 2000). Após a ingestão, o dissacarídeo lactose é hidrolisado no intestino em glicose e galactose, devido a ação da enzima β -galactosidase, popularmente conhecida por lactase, como mostrado na Figura 2.2 (MESSIA *et al.*, 2007).

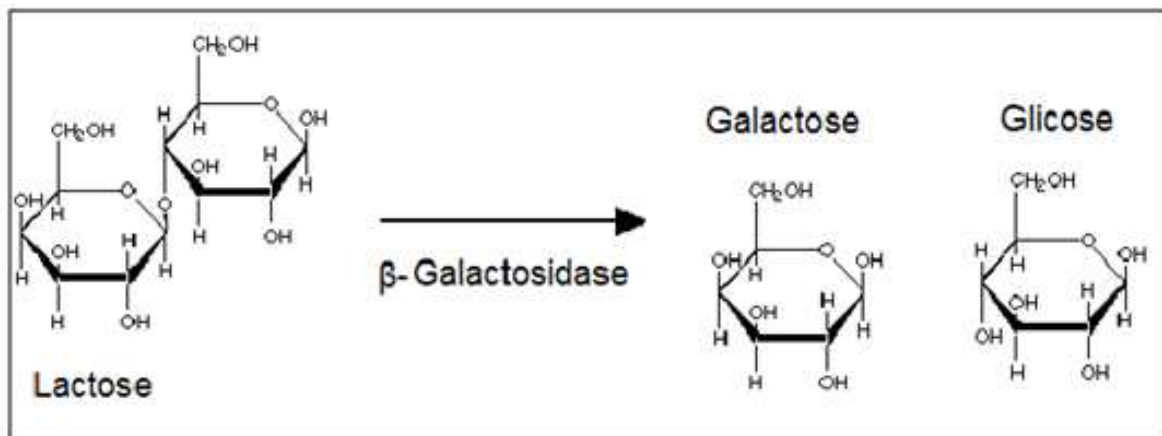


Figura 2.2: Hidrólise da lactose pela ação da β -galactosidase em glicose e galactose.

Fonte: Adaptado de MESSIA *et al.*, 2007.

Em humanos, na superfície da mucosa do intestino delgado, chamada de borda em escova, há células que produzem, estocam e liberam a enzima β -galactosidase. Esta enzima hidrolisa a lactose nos seus monossacarídeos constituintes, que são absorvidos por células do intestino, os enterócitos, para a corrente sanguínea (LOMER *et al.*, 2008).

A glicose é utilizada pelo organismo como uma fonte de energia e a galactose é metabolizada no fígado ou pelos enterócitos em glicose e também passa a ser utilizada como fonte de energia, ou ainda como galactose, é eliminada na urina (MATTAR e MAZO, 2010).

2.1.2 Intolerância à lactose

Os produtos lácteos estão relacionados as alergias ao leite e intolerância à lactose. Comumente, estas doenças são confundidas, sendo importante a distinção entre elas e um correto diagnóstico para um tratamento adequado. A primeira trata-se de uma alergia a proteínas do leite, tais como caseína, β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, lactoferrina, dentre outras (NORO, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2010). Já a intolerância à lactose está relacionada com a má absorção de lactose, trata-se de uma deficiência do organismo em digerir este açúcar devido a hipolactasia ou lactase não persistente. A hipolactasia é a diminuição da atividade enzimática da β -galactosidase (lactase), que é a enzima responsável pela digestão da lactose (OBINU *et al.*, 2010; TAMURA *et al.*, 2008).

A maioria dos mamíferos apresenta a capacidade reduzida para digerir a lactose após o desmame, devido à uma diminuição irreversível e geneticamente programada na expressão da enzima β -galactosidase. Alguns humanos continuam produzindo β -galactosidase durante a vida adulta e outros apresentam um quadro de hipolactasia (BURGER *et al.*, 2007; MATTAR e MAZO, 2010).

Assim, as pessoas com deficiência de β -galactosidase no organismo não conseguem hidrolisar a lactose, que permanece no intestino. As bactérias existentes no intestino fermentam anaerobicamente a lactose não hidrolisada, gerando ácidos de cadeia curta como ácido láctico e ácidos graxos e gases como hidrogênio, metano e dióxido de carbono, que podem resultar em flatulência, cólicas, diarreia, inchaço, dores de cabeça, dentre outros sintomas (OBINU *et al.*, 2010; MARTINDALE, 1999; TÊO, 2002). Atualmente esta síndrome acomete cerca de 60% da população brasileira e 70% da população mundial (MUNIZ *et al.* 2010).

Na Figura 2.3 é mostrada a diferença de absorção de lactose em organismos com a produção normal de β -galactosidase e em organismos com deficiência desta enzima.

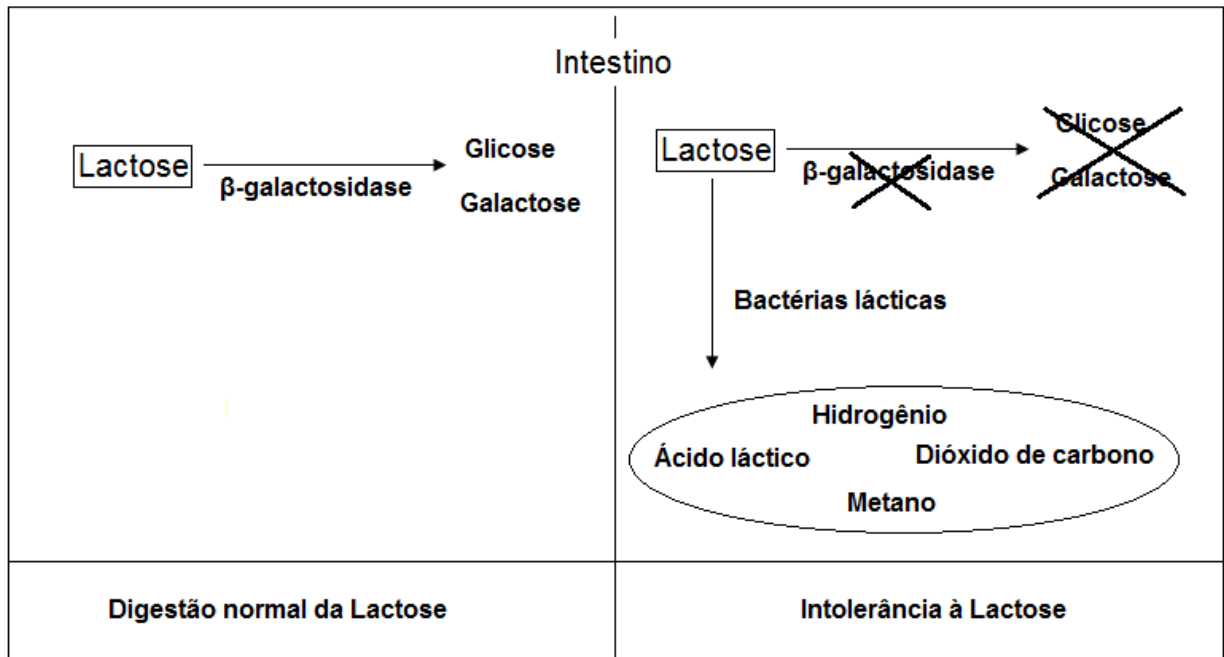


Figura: Esquema da absorção da lactose no intestino.

Fonte: Adaptado de SANTIN, 2005.

O diagnóstico de intolerância à lactose pode ser feito com base no histórico alimentar e principalmente por alguns testes. Estes testes estão relacionados com alterações nos níveis de expiração de hidrogênio ou dos níveis séricos de glicose após a ingestão de lactose (SWAGERTY JR *et al.*, 2002).

Os indivíduos intolerantes à lactose procuram fazer uma dieta com menos produtos lácteos, porém, estes são uma importante fonte de vários nutrientes, tais como sais minerais e vitaminas (MONTALTO *et al.*, 2006; BARBOSA e ANDREAZZI, 2011). Portanto, este tipo de dieta pode prejudicar a ingestão necessária destes nutrientes, podendo trazer danos à saúde (KREBS, 2010). Como por exemplo, quando a ingestão de cálcio e vitamina D3 são insuficientes, pode ocorrer uma diminuição da densidade mineral óssea (MONTALTO *et al.*, 2006; SWAGERTY JR *et al.*, 2002).

Diante deste contexto, as indústrias alimentícias e farmacêuticas vêm buscando alternativas que atendam as pessoas com deficiência da enzima β -galactosidase. As indústrias de laticínios, por exemplo, vêm produzindo produtos com baixo teor de lactose (TREVISAN, 2008; KLEIN, 2010; MESSIA *et al.*, 2007), enquanto as indústrias farmacêuticas vêm se baseando na terapia de reposição de β -galactosidase para suprir a deficiência dos organismos (MONTALTO *et al.*, 2006).

2.2 ENZIMAS

A palavra enzima tem origem grega, significando “em leveduras”. Enzimas são proteínas, com atividade intra ou extracelular, sendo funcionalmente catalisadores biológicos, geralmente mais eficientes que os catalisadores sintéticos. A ação das enzimas se faz através da redução da energia de ativação necessária para a ocorrência de uma reação química, aumentando a velocidade das reações. A ação das enzimas podendo aumentar a velocidade de uma reação na ordem de até milhões de vezes (FISCHER *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2001).

Devido à função de catalisador, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram o seu equilíbrio químico (FISCHER *et al.*, 2002). A atuação da enzima depende de um “encaixe” entre sua molécula e o substrato, também chamado de “chave-fechadura”. O local da enzima onde o substrato se encaixa é denominado sítio ativo, desta forma, há uma especificidade das enzimas quanto aos substratos em que atuam (CABRAL *et al.*, 2003, COELHO *et al.*, 2008).

O sítio ativo de uma enzima é uma região tridimensional formada por agrupamentos de diferentes partes da estrutura primária da enzima, que se liga ao substrato e aos cofatores para promover cisão ou geração de ligações (COELHO *et al.*, 2008). As enzimas convertem o substrato em produto e são extremamente específicas para a reação que catalisam, devido à excepcional seletividade. Sendo assim, geralmente uma enzima catalisa apenas um só tipo de reação química (BON *et al.*, 2008).

As enzimas foram classificadas pela comissão de enzimas da União Internacional de Bioquímica e organizadas em seis classes distintas, de acordo com a natureza da reação catalisada (WAITES *et al.*, 2001; DEVLIN, 2008):

- Oxi-redutases: catalisam as reações de oxi-redução, a transferência de átomos de hidrogênio e oxigênio, ou elétrons;
- Transferases: catalisam a transferência de grupos químicos de uma molécula para outra;
- Hidrolases: catalisam reações de hidrólise, onde ocorre a adição de água à uma ligação química;
- Liases: catalisam a cisão de ligações entre carbonos;

- Isomerases: catalisam rearranjos estruturais de moléculas;
- Ligases ou sintetases: catalisam a formação de novas ligações, mas precisam de energia, logo há consumo de ATP.

2.2.1 Aplicações das enzimas

As indústrias de enzimas vêm apresentando um rápido crescimento nas últimas décadas devido principalmente à evolução da biotecnologia (KIRK *et al.*, 2002). Atualmente as enzimas são utilizadas em diversos segmentos, por exemplo: α -amilase, na hidrólise de amido, de milho e batata (SRICHUWONG *et al.*, 2009); pectinase, usada no processamento de sucos de frutas (SARIOGLU *et al.*, 2000); celulase, na cisão de materiais celulósicos (BON *et al.*, 2008); tanase, utilizada na produção industrial de ácido gálico (BARTHOMEUF *et al.*, 1994); β -galactosidase, na hidrólise de lactose (RAJOKA *et al.*, 2003; GUZMAN *et al.*, 2006; LADERO *et al.*, 2001; MANERA *et al.*, 2011; MARQUEZ *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

2.2.2 Fatores que afetam a atividade enzimática

A atividade das enzimas pode ser influenciada por alguns fatores, destacando-se: temperatura e pH (TORTORA *et al.*, 2000; BON *et al.*, 2008).

2.2.2.1 Temperatura

A temperatura é um fator relevante na velocidade da maioria das reações químicas, pois em baixas temperaturas há menor agitação das moléculas, fazendo com que estas não tenham energia suficiente para a ocorrência de uma reação química (KIELING, 2002; TORTORA *et al.*, 2000). No entanto em reações que envolvam enzimas, o aumento da temperatura pode ter efeito inverso quanto à velocidade de reação, podendo levar à desnaturação de enzimas, sendo assim, a elevação da temperatura para melhor atividade enzimática é limitada pela

estabilidade da proteína (DANIEL, 1996). A estabilidade térmica das enzimas influencia sua aplicação em processos biotecnológicos e na sua utilização industrial (TORTORA *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2011).

A β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, é mais ativa em baixas temperaturas, 4 °C, quando comparada às enzimas obtidas de outras linhagens (BRADY *et al.*, 1995).

Freitas *et al.* (2011) produziram β -galactosidase a partir do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* com estabilidade térmica de até 63 °C. Já Rajoka *et al.* (2003) produziram β -galactosidase, empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NIBGE Y-1, com estabilidade térmica de até 60 °C. Em contrapartida, Ladero *et al.* (2001) utilizaram outro tipo de micro-organismo, a bactéria *Escherichia coli* JM109, para a produção de β -galactosidase e esta enzima apresentou estabilidade térmica de até 40 °C.

Braga *et al.* (2011) testaram a estabilidade térmica das enzimas β -galactosidase obtidas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, e estas apresentaram maior estabilidade em 30 °C.

2.2.2.2 pH

A concentração de íons hidrogênio (H^+) está ligada à estrutura tridimensional da enzima. Logo a diminuição da concentração de H^+ (pH), pode alterar a sua estrutura, levando-a à desnaturação. Sendo assim, haverá um pH no qual a conformação será a mais adequada para a atividade catalítica das enzimas, este é chamado de pH ótimo (TORTORA *et al.*, 2000; KIELING, 2002).

As β -galactosidases fúngicas atuam melhor em pH ácido, entre 2,5 – 4,5. Já as provenientes de leveduras e bactérias têm pH ótimo próximo ao neutro, entre 6,0 e 8,0 (KLEIN, 2010).

A β -galactosidase obtida por Rajoka *et al.* (2003), empregando *Kluyveromyces marxianus*, apresentaram pH ótimo para atividade enzimática em 7,0. Já Marquez *et al.* (2005), empregando *Kluyveromyces marxianus*, obtiveram pH ótimo de atividade enzimática entre 6,6 – 6,8.

Na Tabela 2.1, são apresentados micro-organismos produtores de β -galactosidase e suas condições ideais para atividade enzimática máxima.

Tabela 2.1. Micro-organismos produtores de β -galactosidase e suas condições ideais para atividade enzimática máxima.

Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50- 55
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 – 65
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	35
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,5 – 7,0	37
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 – 45
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 – 57
<i>Mucor pucillus</i>	4,5 – 6,0	60
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 – 7,5	55

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2005.

2.2.3 β -galactosidase

A enzima β -galactosidase é codificada pela *Enzyme Commission* sob o número 3.2.1.23 (KLEIN, 2010). Mais conhecida por lactase, é também denominada tilactase (MARTINDALE, 1999), lactase-florizina hidrolase (SIBLEY, 2010), β -galactosídeo galactohidrolase (BRAGA *et al.*, 2011). A β -galactosidase é a enzima que catalisa a hidrólise da molécula de lactose, na clivagem da ligação glicosídica $\beta - 1, 4$ presente na molécula da lactose, liberando assim os monômeros glicose e galactose (SIBLEY, 2010; FURLAN *et al.* 2001). A β -galactosidase é classificada como uma hidrolase, que se trata de uma enzima onde a água participa na quebra das ligações covalentes do substrato (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Esta enzima tem grande interesse econômico para as indústrias de alimentos e farmacêuticas. As indústrias de laticínios vêm produzindo produtos com baixo teor de lactose, mas com as mesmas quantidades dos demais nutrientes. Desta forma, os

intolerantes à lactose podem ingerir produtos lácteos sem o desconforto da ingestão de lactose. Outra questão está relacionada com produtos como sorvete, leite condensado e doce de leite, onde a lactose presente pode se cristalizar, resultando em produtos com textura arenosa (KLEIN, 2010). O teor de lactose é reduzido com a adição da enzima β -galactosidase aos produtos, evitando os problemas relacionados com a lactose, além de formar a glicose e galactose, que são açúcares com maior poder adoçante (TREVISAN, 2008; KLEIN, 2010; MESSIA *et al.*, 2007).

As indústrias farmacêuticas vêm se baseando na terapia de reposição de β -galactosidase para suprir a deficiência dos organismos. As enzimas podem ser administradas na forma de cápsulas ou comprimidos, sendo a dose utilizada de acordo com a necessidade de cada organismo.

A enzima β -galactosidase pode ter duas vias de ação sobre a lactose, pois seu sítio ativo possui habilidade tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosar a galactose, gerando galacto-oligossacarídeos - GOS (JURADO *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2011 b; KLEIN *et al.*, 2011). Os GOS são formados simultaneamente com a hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase, quando há alta concentração deste açúcar (LISBOA, 2008; KLEIN, 2010). Na Figura 2.4 está apresentada a formação dos GOS.

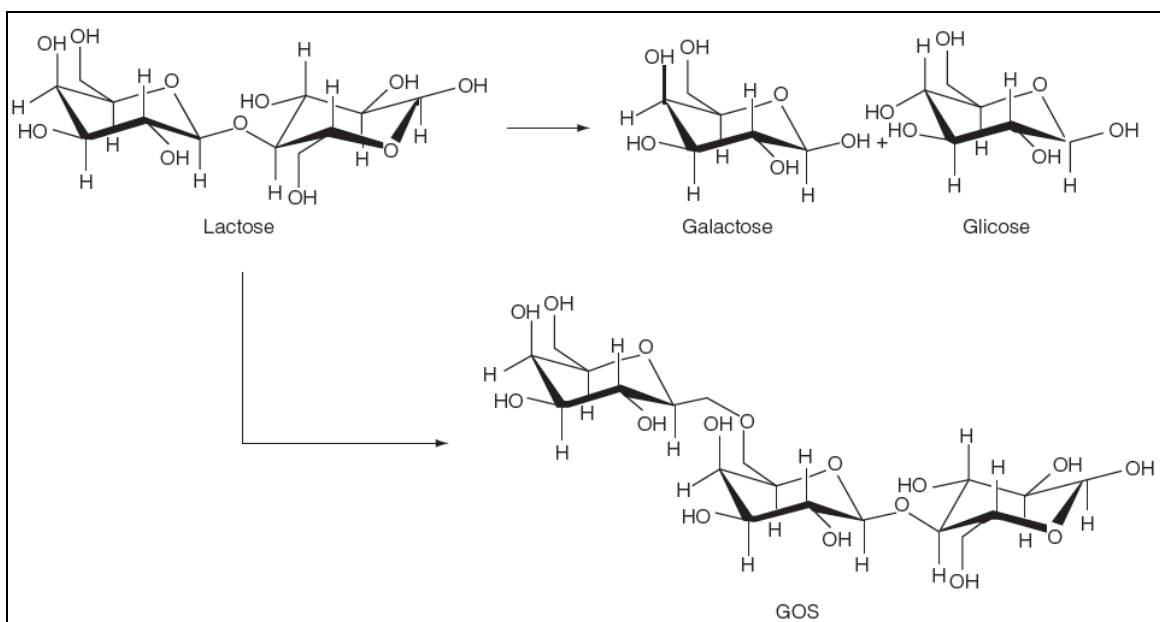


Figura 2.4: Formação de galacto-oligossacarídeos (GOS).

Fonte: MARTINS e BURKERT, 2009.

Os GOS estão incluídos entre os NDO's – *Non Digestable Oligosaccharides* – oligossacarídeos não digeríveis (LISBOA, 2008). Apresentam configurações β e as enzimas digestivas gastrointestinais são específicas para ligações α (ALMEIDA e PASTORE, 2004), desta forma não são absorvidas no intestino e sim no cólon, onde são hidrolisados anaerobicamente a pequenos oligômeros ou monômeros pelas bactérias existentes no cólon, principalmente as bifidobactérias (MARTINS e BURKERT, 2009). Os GOS facilitam a digestão e devido a ação das bifidobactérias, produzem ácidos graxos de cadeia curta que estimulam a absorção de cálcio (LISBOA, 2008; MARTINS e BURKERT, 2009).

A β -galactosidase pode ser encontrada em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs, assim como em alguns órgãos de animais como intestino, cérebro e placenta (KLEIN, 2010; LISBOA, 2008). Porém a extração da β -galactosidase destas fontes tem alto custo e baixo rendimento, por apresentarem baixa concentração da enzima. Desta forma, esta enzima é obtida principalmente a partir de micro-organismos, principalmente fungos e leveduras (MONTALTO *et al.*, 2006). A utilização de micro-organismos para a produção desta enzima pode contribuir para a redução do custo de produção também devido a possibilidade da utilização de resíduos como matéria prima.

2.2.4 Produção de enzimas por micro-organismos

Os micro-organismos são atualmente as principais fontes de obtenção de enzimas. Estes apresentam um alto rendimento e também não têm um custo tão elevado quando comparados com as tradicionais fontes de enzimas extraídas de fontes animais e vegetais (KIRK *et al.*, 2002; BON *et al.*, 2008).

Estudos mostram a produção de enzimas por micro-organismos: inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (SCHNEIDER, 1996); lacase por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 e *Phoma* sp. UHH 5-1-03 (LIBARDI JR, 2010); xilanase por *Penicillium echinulatum* (MICHALSKI *et al.*, 2008); glicose-frutose oxidoreductase por *Zimomonas mobilis* ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 2001), β -galactosidase por *Aspergillus oryzae* (FREITAS, *et al.*, 2011), entre muitos outros.

As indústrias têm preferência por micro-organismos que não tragam riscos à saúde, desta forma, tendem a escolher micro-organismos classificados pelo

departamento do governo dos Estados Unidos, FDA (*Food and Drug Administration*) como GRAS (*Generally Recognized As Safe* – geralmente reconhecidos como seguros) e de acordo com a União Europeia Q.P.S. (*Qualified Presumption of Safety* – Qualificada segurança presumida) (LANE e MORRISSEY, 2010). A seguir, na Quadro 2.1, são apresentados alguns exemplos de micro-organismos considerados GRAS.

Quadro: Exemplos de micro-organismos classificados como GRAS.

Bactéria	Leveduras	Fungos filamentosos
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Mucor javanicus</i>
<i>Leuconostoc oenos</i>		<i>Penicillium roqueforti</i>

Fonte: Adaptado de WAITES *et al.*, 2001.

A β -galactosidase, a exemplo de outras enzimas, tem sua produção industrial obtida a partir de micro-organismos. A produção de β -galactosidase pela bactéria *Escherichia coli* foi muito estudada, porém a *E. coli* não é considerada GRAS, logo sua utilização para a produção industrial de β -galactosidase não é recomendada (LADERO *et al.*, 2001). Dentre os micro-organismos produtores de β -galactosidase, destacam-se as leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*. A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo estudada em processos biotecnológicos devido as vantagens que apresenta quando comparada com outras leveduras (SONG *et al.*, 2010). Na Tabela 2.2 é apresentada a comparação entre *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Kluyveromyces*, indicando alguns parâmetros relacionados ao metabolismo, como capacidade de assimilar lactose e glicose, velocidade máxima de crescimento (μ_{max}), capacidade térmica e capacidade de produzir inulinase.

Tabela 2.2: Comparação do metabolismo entre algumas leveduras.

Levedura	Assimilação de lactose	Produção de inulinase	μ_{\max} (h ⁻¹)	Assimilação de glicose	Temperatura máxima (°C)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	0,37	+	35
<i>Kluyveromyces aestaurii</i>	-	-	-	+	35
<i>Kluyveromyces nonfermentants</i>	-	-	-	-	42
<i>Kluyveromyces wikerhamii</i>	-	-	0,43	+	37
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	0,50	+	37
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	0,60	+	52
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	-	-	-	+	35

Fonte: Adaptado de LANE e MORRISEY, 2010.

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, têm a parede celular rígida e podem ser esféricas ou ovais (MARQUEZ *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2000).

As linhagens de *Kluyveromyces marxianus* são isoladas a partir de variados *habitats*, fazendo com que estas linhagens tenham diversidade metabólica, possibilitando uma vasta gama de aplicações biotecnológicas (FONSECA *et al.*, 2008). São amplamente utilizadas nos processos biotecnológicos para a produção de alimentos, bebidas, enzimas, química fina, farmacêutica e de reagentes (WAITES *et al.*, 2001).

Kluyveromyces marxianus tem alta capacidade respiratória e grande afinidade com oxigênio (RECH e AYUB, 2007). Na Figura 2.5 é mostrada a imagem microscópica da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

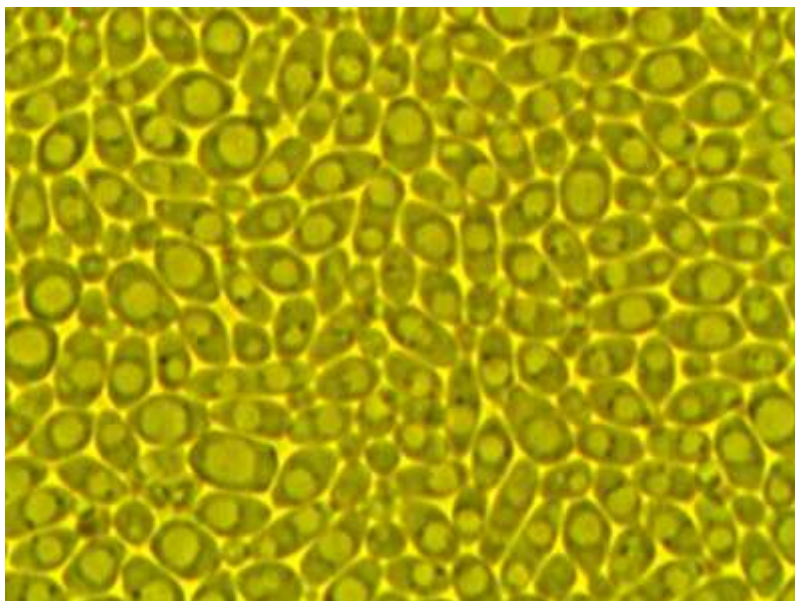


Figura 2.5: Imagem microscópica da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (aumento 400x).
Fonte: Primária.

2.2.5 Aplicações da levedura *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é termotolerante (NONKLANG *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2007), metaboliza glicose, inulina e lactose; pode produzir etanol (GUIMARÃES *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2008; YANASE *et al.*, 2010; SILVEIRA, 2004; KORKOUTAS *et al.*, 2001); também pode produzir as enzimas β -galactosidase, intracelularmente, (GONÇALVES e CASTILLO, 1982; RECH e AYUB, 2007; LEMOS *et al.*, 2011 a,b; MANERA *et al.*, 2011); inulinase, intra e extracelularmente (SCHNEIDER, 1996; ROWENHORST *et al.*, 1988; ROWENHORST *et al.*, 1990; RICHETTI *et al.*, 2011; COGHETTO *et al.*, 2011) e endopoligalacturonase (JIA e WHEALS, 2000); tem grande capacidade de converter substratos em biomassa e tem rápida taxa de crescimento celular (FONSECA *et al.*, 2007; BELLAVAR *et al.*, 2004). A hidrólise rápida do substrato é que confere à *Kluyveromyces marxianus* grande velocidade de crescimento e formação de biomassa e etanol (DINIZ, 2009).

Kluyveromyces marxianus tem sido utilizada na biorremediação de corantes têxteis e de cobre de águas residuárias e no tratamento dos resíduos da indústria de papel (LANE e MORRISSEY, 2010). Esta levedura é também, considerada grande produtora de 2-feniletanol, que é um álcool aromático com odor de rosa, um dos mais importantes flavorizantes das indústrias de cosméticos e perfumes (GARAVAGLIA *et*

al., 2007). *Kluyveromyces marxianus* vem sendo estudada, também, para a produção de extrato de levedura (REVILLION *et al.*, 2003), na produção de proteína celular (*single cell protein*) e proteínas heterólogas (FONSECA *et al.*, 2008).

Outra aplicação foi mostrada por Milessi *et al.* (2011), que estudaram a produção de ribonucleotídeos empregando *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* CCT 4086 a partir de glicerol.

2.3 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NAS LEVEDURAS

O comportamento referente ao metabolismo de açúcares pode ser diferente de acordo com cada levedura. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a orientação metabólica a ser seguida depende da concentração inicial de açúcar no cultivo. Em *Kluyveromyces*, a escolha entre respiração e fermentação é controlada pelo nível de oxigenação do cultivo (SILVEIRA *et al.*, 2005).

Fisiologicamente as leveduras podem ser classificadas quanto ao oxigênio como: aeróbias estritas, que necessitam de oxigênio para metabolizar carboidratos (DINIZ, 2009); facultativas, que crescem com ou sem oxigênio; anaeróbias facultativas, suportam até uma baixa concentração de oxigênio e anaeróbias estritas, não suportam oxigênio (BLANK *et al.*, 2004; VERDUYN *et al.*, 1992). A *Kluyveromyces marxianus* é classificada como facultativa, sendo capaz de gerar energia tanto por respiração como por fermentação alcoólica, mas preferencialmente segue a respiração e só produz etanol em condições limitadas de oxigênio (LANE e MORRISSEY, 2010; FONSECA *et al.*, 2008). Nas leveduras do gênero *Kluyveromyces*, as vias oxidativas e fermentativas podem ocorrer simultaneamente (SILVEIRA *et al.*, 2005; SILVEIRA, 2004).

O metabolismo de leveduras pode ser peculiar, apresentando o chamado efeito *crabtree* (BRANDÃO *et al.*, 2006). O efeito *crabtree* ocorre quando a levedura tem a tendência de seguir a via fermentativa mesmo em condição aeróbica (VERDUYN *et al.*, 1992). A levedura *Kluyveromyces marxianus* é classificada como *crabtree* negativa, logo, em condições aeróbicas esta levedura segue a via respiratória (FONSECA *et al.*, 2008; BELLAVER *et al.*, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2006).

Em situações de hipoxia ou anaerobiose, as leveduras *crabtree* negativas produzem etanol e, após o consumo do substrato, a levedura *Kluyveromyces*

marxianus pode passar a consumir o etanol produzido. A utilização de etanol como substrato é possível devido à presença da enzima álcool desidrogenase (FLORES *et al.*, 2000). Furlan *et al.* (2001) relataram que em temperaturas mais baixas, como por exemplo, 28 °C e 30 °C, o consumo de etanol ocorre mesmo enquanto ainda há o substrato inicial.

Quanto à concentração de açúcares, as leveduras podem apresentar o mecanismo repressão catabólica, uma inibição na transcrição dos genes em cultivos contendo açúcares facilmente fermentescíveis em altas concentrações, como por exemplo, a glicose. Leveduras do gênero *Kluyveromyces* não são tão sensíveis à repressão catabólica, devido à habilidade de manter uma homeostase diante de altas concentrações de glicose (SILVEIRA *et al.*, 2005; SILVEIRA, 2004). A homeostase, também conhecida como equilíbrio dinâmico ou propriedade auto-reguladora, permite ao micro-organismo manter as condições internas constantes. Se o micro-organismo não conseguir manter a homeostase, este não se multiplica, permanecendo em fase *lag* (fase de adaptação do micro-organismo) ou até morrendo antes que a homeostase seja restabelecida (LEISTNER, 2000).

Nas leveduras a capacidade de metabolizar a lactose está relacionada com a capacidade de produzir a enzima β -galactosidase. A levedura que sempre foi mais estudada é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao fato de ser GRAS e devido a sua vasta aplicação industrial. Porém a *Saccharomyces cerevisiae* não apresenta a capacidade de assimilar a lactose, sendo necessário empregar as chamadas NCY (*Non Conventional Yeasts* – leveduras não convencionais) para a utilização deste açúcar (FLORES *et al.*, 2000). Dentre as leveduras que assimilam a lactose, destaca-se o gênero *Kluyveromyces*, que metabolizam este dissacarídeo tanto pela via fermentativa como pela via respiratória (LANE e MORRISSEY, 2010).

2.4 Fatores que influenciam o crescimento celular

O crescimento celular depende da manutenção e do transporte de nutrientes do meio de cultivo para o interior da célula, assim como das condições do cultivo (GHALY *et al.*, 2005). Sendo assim, o meio de cultivo desempenha um papel importante na formação de células e produtos (MADDIPATI *et al.*, 2011). As fontes de carbono e nitrogênio são muito significativas porque estão diretamente ligadas ao

processo metabólico dos micro-organismos, a agitação e a temperatura podem influenciar o transporte de nutrientes (MAO *et al.*, 2005).

2.4.1 Fontes de carbono

A fonte de carbono é necessária para a biossíntese desde a reprodução, a formação do produto até a manutenção celular. A produção de β -galactosidase por processo biotecnológico é feita geralmente utilizando lactose. A lactose, porém tem alto custo, aproximadamente R\$ 66,00 / kg (orçamento Anexo A). Desta forma, uma alternativa para minimizar o custo é a utilização de algum resíduo que contenha lactose. O uso de resíduos como matéria prima em processos fermentativos, além de ser de baixo custo também favorece a redução das grandes quantidades de resíduos nos aterros industriais (WAITES *et al.*, 2001).

2.4.1.1 Soro de queijo

As indústrias geram grandes quantidades de resíduos, um exemplo é a indústria de queijos, que tem como resíduo o soro de queijo (CHOLLANGI e HOSSAIN, 2007; SCHULTZ *et al.*, 2006; GHALY *et al.*, 2005). A cada quilograma de queijo produzido, são gerados aproximadamente nove litros de soro (GUIMARÃES *et al.*, 2010; DINIZ, 2009).

Até pouco tempo, o soro de queijo era simplesmente lançado nos corpos hídricos (LEITE, 2006). O soro apresenta elevada DBO, entre 30000 ppm e 40000 ppm (RECH e AYUB, 2007), logo, o descarte incorreto do soro pode acarretar em problemas ambientais. Diante disto, as empresas vêm procurando alternativas para se adequarem às regras estabelecidas pelos órgãos ambientais (GUIMARÃES *et al.*, 2010; LEITE, 2006). Na Figura 2.6 está ilustrado o processo de produção de queijo e a geração do soro de queijo.

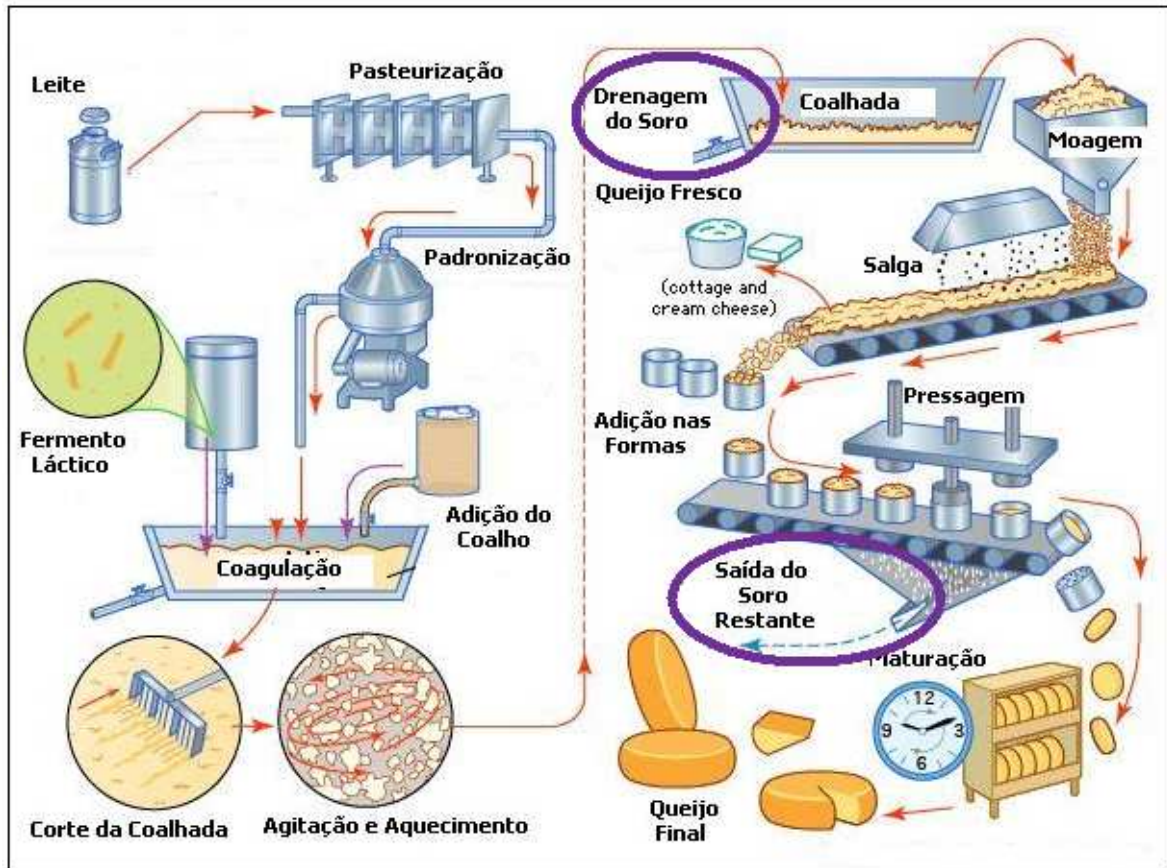


Figura 2.6: Produção de queijo e do sub-produto soro.

Fonte: <http://tecalim.vilabol.uol.com.br/queijo.html>

O soro de queijo tem em sua composição entre 40 e 80 g.L⁻¹ de lactose, 8 g.L⁻¹ de proteínas, 8 g.L⁻¹ de lipídeos e 10 g.L⁻¹ de sais minerais e vitaminas, principalmente cloreto de sódio e cloreto de potássio, dependendo das condições de processamento (SILVEIRA, 2006). Na fermentação do soro de queijo, a lactose é hidrolisada em glicose e galactose (GUIMARÃES *et al.*, 2010; GHALY *et al.*, 2005).

O soro de queijo pode ser utilizado como fonte de carbono por muitos micro-organismos (ASKU e EREN, 2005), porém sua utilização em processos biotecnológicos requer a escolha de um micro-organismo capaz de metabolizar a lactose, pois poucas espécies de micro-organismos têm esta capacidade (GHALY *et al.*, 2003).

Na Tabela 2.3 estão apresentados estudos utilizando soro de queijo como substrato, bem como a concentração de lactose equivalente à utilização do soro em cada estudo, verificando o seu efeito sobre o crescimento, produção de β -galactosidase e produção de etanol.

Tabela 2.3: Relação de estudos empregando soro de queijo como substrato.

Micro-organismo	[] lactose (g.L ⁻¹)	Tipo de soro	Produto	Fonte
<i>S. cerevisiae</i> B4	120	Pó	Etanol	Lewandowska e Kijawski (2006)
<i>K. marxianus</i> IMB3	70	Líquido	Etanol	Korkoutas <i>et al.</i> (2001)
<i>K.s marxianus</i> UFV-3	240	Pó	Etanol	Silveira <i>et al.</i> (2005)
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	140	Pó	Proteína celular	Schultz <i>et al.</i> (2006)
<i>K. marxianus</i> ATCC 46537	50	Pó	β-galactosidase	Santiago <i>et al.</i> (2004)
<i>K.s marxianus</i> CCT 7082	70	Pó	β-galactosidase	Manera <i>et al.</i> (2011)

2.4.2 Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio geralmente utilizadas nas fermentações para produção de β-galactosidase são extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e uréia. Devido ao alto valor destas matérias-primas (extrato de levedura R\$ 153,00/kg, peptona R\$ 160,00/kg, sulfato de amônio R\$ 12,00/kg, ureia R\$ 17,00/kg – Anexo A) é interessante utilizar outras fontes de nitrogênio com menor valor comercial, tais como Prodex Lac® e milhocina.

A milhocina e o Prodex Lac® fornecem a quantidade de nitrogênio necessária para o crescimento do micro-organismo e para a produção de β-galactosidase (MANERA *et al.*, 2011).

2.4.2.1 Prodex

O Prodex Lac® é um extrato de levedura bruto, utilizado como fonte de vitaminas de baixo custo em substituição ao extrato de levedura purificado (MICHALSKI *et al.*, 2008).

Furlan *et al.* (2000) utilizaram Prodex Lac® na concentração de 5 g.L⁻¹ para a produção de β-galactosidase empregando *Kluyveromyces marxianus* CDB002. Manera *et al.* (2011) utilizaram concentração próxima, de 4 g.L⁻¹, para a produção de β-galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

Já Valduga *et al.* (2007) fizeram uso de concentração mais elevada de Prodex Lac®, em 10 g.L⁻¹, para a produção de carotenoides empregando *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

2.4.2.2 Milhocina

A água de maceração do milho ou milhocina é um subproduto da extração do amido de milho. É um líquido viscoso com coloração marrom escura, odor característico e pH ácido (MIRZA e MUSHTAQ, 2006). A sua composição varia de acordo com a qualidade do milho e as condições de processamento (SILVEIRA *et al.*, 2001). Extratos concentrados geralmente contêm entre de 4% e 7,5% de nitrogênio, incluindo uma grande variedade de aminoácidos, vitaminas e minerais e aproximadamente 50% de água (THE CORN REFINERS ASSOCIATION, 2006; WAITES *et al.*, 2001).

Devido a sua composição rica em nitrogênio e vitaminas, a milhocina tem diversas utilizações. É usada como suplemento alimentar líquido para bovinos, ovelhas, cabras e suínos; na produção de ácido acético e em processos fermentativos (THE CORN REFINERS ASSOCIATION, 2006; TRENKLE e RIBEIRO, 1999). Na Tabela 2.4 estão apresentados estudos utilizando a milhocina.

Tabela 2.4: Relação de estudos que utilizaram milhocina como fonte de nitrogênio.

Micro-organismo	Milhocina (g.L ⁻¹)	Produto	Fonte
<i>K. marxianus</i> NRRLY-7571	10	Carotenóides	Valduga <i>et al.</i> (2007)
<i>Clostridium</i> P11 ATCC 7826	10 – 20	Etanol	Maddipati <i>et al.</i> (2011)
<i>Mucor macedo</i>	10	Biosurfactante	Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191	5 – 100	Glicose-frutose oxireductase	Silveira <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> CDB 002	100	β-galactosidase	Schneider <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> CDB 002	100	β-galactosidase	Furlan <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> CCT 7082	65	β-galactosidase	Manera <i>et al.</i> (2011)

2.4.3 Agitação

A disponibilidade de oxigênio é um fator relevante no desempenho das leveduras durante um cultivo. O oxigênio deve ser suficiente para garantir a biossíntese dos lipídeos da membrana (esteróis e ácidos graxos insaturados) e o crescimento celular, diminuindo a produção de etanol (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Altos níveis de oxigenação aumentam as taxas de formação de biomassa (FONSECA *et al.*, 2008).

A maioria das espécies de leveduras, quando em meio contendo glicose e limitação de oxigênio, têm seu metabolismo via fermentação alcoólica (BELLAVIER *et al.*, 2004). Na Tabela 2.5 são mostrados estudos englobando o efeito da variação da agitação sobre a produção de β -galactosidase e etanol.

Tabela 2.5: Relação de agitações utilizadas em cultivos.

Micro-organismo	Agitação (min ⁻¹)	Produto	Fonte
<i>K. marxianus</i> ATCC 8553	100	Etanol	Castro e Roberto (2011)
<i>K. marxianus</i> IMB3	150	Etanol	Korkoutas <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> UFV-3	40	Etanol	Diniz (2009) e Silveira <i>et al.</i> (2005)
<i>K. marxianus</i> UFV-3	250	β -galactosidase	Diniz (2009) e Silveira <i>et al.</i> (2005)
<i>K. marxianus</i> ATCC 46537	150	β -galactosidase	Santiago <i>et al.</i> (2004)
<i>K. marxianus</i> ATCC 46537	200	β -galactosidase	Marquez <i>et al.</i> (2005)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7082	180	β -galactosidase	Manera <i>et al.</i> (2011) e Lemos <i>et al.</i> (2011a)
<i>K. marxianus</i> CCA 510	180	β -galactosidase	Lima <i>et al.</i> (2011)

2.4.4 Temperatura

A temperatura influencia as reações químicas e enzimáticas e conseqüentemente a velocidade de crescimento. A temperatura está diretamente relacionada com a síntese de enzimas (FONSECA *et al.* 2008). Na Tabela 2.6 estão apresentados alguns estudos verificando o efeito da temperatura sobre a produção de β -galactosidase e etanol.

Tabela 2.6: Relação de temperaturas utilizadas em cultivos.

Micro-organismo	Temperatura (°C)	Produto	Fonte
<i>K. marxianus</i> DMKU3-1042	40	Etanol	Nonklang <i>et al.</i> (2009)
<i>K. marxianus</i> IMB3	45	Etanol	Korkoutas <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> UFV-3	30	Etanol	Silveira <i>et al.</i> (2005)
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	30	Etanol	Bellaver <i>et al.</i> (2004)
<i>K. marxianus</i> CDB 002	30	β -galactosidase	Schneider <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> CDB 002	30 - 34	β -galactosidase	Furlan <i>et al.</i> (2001)
<i>K. marxianus</i> NIBGE Y-1	35	β -galactosidase	Rajoka <i>et al.</i> (2003)
<i>S. cerevisiae</i> W303, (geneticamente modificada)	30	β -galactosidase	Rech e Ayub (2007)
<i>K. marxianus</i> ATCC 46537	30	β -galactosidase	Marquez <i>et al.</i> (2005) e Santiago <i>et al.</i> (2004)

3 METODOLOGIA

3.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* obtida da Centraalbureau voor Schimmelcultures sob o código CBS 6556. Para manutenção da cepa foi utilizado o cultivo em placas de Petri com o meio YPL (extrato de levedura 1%, peptona 1% e lactose 2%) com repiques mensais e mantidos em refrigerador a 4 °C.

3.2 ATIVAÇÃO DA CEPA

A ativação foi realizada à temperatura de 37 °C, em frascos de Erlenmeyer não aletados (1000 mL), contendo 300 mL de meio YPL (extrato de levedura, peptona e lactose), em shaker com agitação circular de 180 min⁻¹ por aproximadamente 15 horas. A fração de inoculação foi de 10%.

3.3 DEFINIÇÃO DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO DE CULTIVO E DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Os substratos utilizados foram: soro de queijo cedido pela Indústria Victória (Fpolis/SC); a água de maceração do milho (milhocina) que foi cedida pela Corn Products (Barra Nova/PR) e o extrato de levedura bruto (Prodex Lac®) cedido pela BioSpringer (Valinhos/SP).

Verificou-se a necessidade de desproteínizar o soro de queijo, pois ao ser aquecido a parte protéica precipitou e este fato prejudicou as leituras de absorvância das amostras. Para a desproteínização, o soro de queijo foi mantido durante 15 min a 121°C. Após o aquecimento, o soro foi filtrado a vácuo em membrana de 0,2 µm. Na Figura 3.1 está apresentado o aspecto visual do soro de queijo antes e após o tratamento térmico para desproteínização.



Figura 3.1: Aspecto visual do soro de queijo antes e após a desproteínização.

Após a desproteínização a concentração de lactose no soro de queijo, foi determinada por meio de análise de cromatografia em fase líquida (HPLC), resultando em uma concentração de $71,2 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose. O pH foi medido após a desproteínização, apresentando valor em 5,35. Desta forma não foi necessário o ajuste do pH do soro para o cultivo, por já se encontrar na faixa ideal para atuação de leveduras, 5,0 – 6,0 (MANERA *et al.*, 2011).

A milhocina foi previamente centrifugada em 10000 min^{-1} durante 10 min, e apenas o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

As definições das temperaturas e das agitações circulares de cultivo, assim como a definição das melhores condições de soro de queijo e das fontes de nitrogênio, no intervalo testado, visando a produção de enzima, foram feitas utilizando-se delineamento experimental do tipo Plackett & Burman, empregando o *software* STATISTICA 7.0, com 12 ensaios para as cinco variáveis de entrada, com o ponto central em triplicata, conforme mostrado nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1: Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no delineamento experimental.

Níveis	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
-1	30	120	125	3	0
0	37	180	250	6	2,5
1	44	220	375	9	5

Sendo X_1 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$), X_2 = agitação (min^{-1}), X_3 = soro de queijo (mL.L^{-1}) / 72 g/L de lactose , X_4 = milhocina (g.L^{-1}) e X_5 = prodex (g.L^{-1}).

Tabela 3.2. Matriz Plackett & Burman com 12 ensaios e ponto central em triplicata.

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (min ⁻¹)	Lactose (g.L ⁻¹)	Milhocina (g.L ⁻¹)	Prodex (g.L ⁻¹)
S ₁	44	120	26,7	3	0
S ₂	44	220	8,9	9	0
S ₃	30	220	26,7	3	5
S ₄	44	120	26,7	9	0
S ₅	44	220	8,9	9	5
S ₆	44	220	26,7	3	5
S ₇	30	220	26,7	9	0
S ₈	30	120	26,7	9	5
S ₉	30	120	8,9	9	5
S ₁₀	44	120	8,9	3	5
S ₁₁	30	220	8,9	3	0
S ₁₂	30	120	8,9	3	0
S ₁₃	37	180	17,8	6	2,5
S ₁₄	37	180	17,8	6	2,5
S ₁₅	37	180	17,8	6	2,5

Além dos experimentos, foi realizado o cultivo controle, em triplicata. No controle foi utilizado o meio YPL (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 10 g.L⁻¹ e lactose 20 g.L⁻¹) a 37°C e agitação circular em 180 min⁻¹. Nos experimentos e na condição controle, a amostragem foi de 5 mL (2 mL para peso seco, 2 mL para concentração de lactose e etanol e 1 mL para leitura da absorbância), nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 h do cultivo.

3.4 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa foi medida por turbidimetria. Leituras de absorbância das suspensões de células provenientes das fermentações foram realizadas em espectrofotômetro (LKB Biochron – Novaspec II), medindo-se a absorbância a 600 nm e convertidas em concentração celular (g.L⁻¹) por meio de uma curva de calibração.

Para a construção da curva de correlação entre a absorbância e a concentração celular, células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foram

cultivadas em YPL. Após atingir uma absorvância de aproximadamente 2, a suspensão sofreu várias diluições. Cerca de 7mL da suspensão de células provenientes do mesmo cultivo foram filtrados a vácuo, em membranas de poliamida (0,45µm) previamente secas e pesadas. Após a filtração, as membranas foram novamente secas até peso constante (24h a 90°C). A massa resultante da diferença de peso das membranas com e sem células foi dividida pelo volume filtrado e a curva foi construída (Apêndice A) correlacionando-se a absorvância com a concentração celular (g/L).

3.5 DETERMINAÇÃO DE LACTOSE E DE ETANOL

As determinações da lactose e de etanol foram obtidas por meio de análises em HPLC (*High performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência), para tanto realizou-se uma curva de calibração de lactose, variando-se a concentração entre 0 e 20 g.L⁻¹. O equipamento utilizado foi da marca Merck-Hitachi, modelo D-7000 IF, equipado com detector de índice de refração da marca Merck, modelo RI-71 e colunas da marca transgenomic ICsep ICE-ÍON-300, fortemente trocadora de prótons de comprimento 300 mm por 7,8 mm de diâmetro interno. O eluente utilizado foi H₂SO₄ com concentração 8,5 mM, de modo isocrático com fluxo de 0,4 mL.min⁻¹, com a temperatura do forno de 70 °C e volume de injeção de 20 µL. No Apêndice B está apresentado um cromatograma típico, obtido com as análises dos experimentos em HPLC .

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.1 Rompimento celular

Um volume de 2,0 mL de amostra foi centrifugado por 6 minutos em 7000 x g em centrífuga Eppendorf. As células recuperadas foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Após, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de água destilada gelada e então homogeneizadas, empregando vórtex. Foram acrescentadas a esta suspensão 1,25 g de pérolas de

vidro de diâmetro variando entre 0,50 e 0,75 mm. As células foram rompidas em Moinho Retch por 20 min a 120 rpm. Após, foram retirados 110 μL do sobrenadante para o teste enzimático (adaptado SONG *et al.*, 2010).

3.6.2 Determinação da atividade enzimática

Em um microtubo foram colocados 780 μL de tampão fosfato pH 7,6 (tampão K) e 110 μL da solução da enzima. O tubo foi agitado durante 5min em termomixer a 30 $^{\circ}\text{C}$, até o equilíbrio da temperatura. Adicionou-se 110 μL de ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) 35 mM e após 1 min de reação adicionou-se 220 μL de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) 1M. A seguir, a absorbância foi lida em 405 nm.

3.6.2.1 Atividade enzimática volumétrica (AE)

Uma unidade de β -galactosidase (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ONP (*o*-nitrofenol) por minuto de reação nas condições da análise. O cálculo da atividade enzimática foi feito partindo-se da lei de Lambert-Beer (Equação 1).

$$AE = \frac{\Delta A \cdot V_f \cdot F}{\epsilon \cdot L \cdot V_a \cdot t}$$

(1)

Onde:

AE: atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)

ΔA : diferença da absorbância entre o branco e amostra

V_f : volume final do teste (mL)

ϵ : coeficiente de extinção molar do produto da reação ($\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)

L: caminho ótico (cm)

V_a : volume da amostra (mL)

t: tempo de reação (min)

F: fator de diluição

Sendo:

ϵ_{ONP} : 3,1 cm². μmol^{-1}

F: ¼

L: 1 cm

V_f: 1,22 mL

V_a: 0,11 mL

t: 1 min

Tem-se então:

$AE = 0,894 \cdot \Delta A \cdot D$, sendo D a diluição prévia da amostra.

3.6.2.2 Atividade enzimática específica (Equação 2)

$$AET_{\text{esp}} = \frac{AET_{\text{max}}}{X'} \cdot 10^3$$

(2)

Onde:

AET_{esp} : atividade enzimática específica (U.g⁻¹)

AET_{max} : atividade volumétrica máxima (U.mL⁻¹)

X': concentração celular correspondente à AET_{max} (g.L⁻¹)

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

3.7.1 Estabilidade com o tempo

Os testes da atividade enzimática (conforme descrito no item 3.6.2) para averiguar a estabilidade da enzima com o tempo foram feitos em duplicata, para cada armazenamento: temperatura ambiente (25 °C), refrigerada (+/- 4 °C) e congelada (+/- -18 °C), nos tempos de 0, 1 e 8 dias.

3.7.2 Estabilidade com a temperatura

Adicionou-se 110 μL do caldo enzimático devidamente diluído a 780 μL de tampão K e incubou-se sob diferentes temperaturas (30, 37, 45, 55, 60 e 70 $^{\circ}\text{C}$) e tempos (5, 10, 30 e 60 minutos). Após cada intervalo de tempo, a solução foi colocada em banho de gelo, para encerrar o efeito da temperatura, e o teste de determinação da atividade enzimática foi realizado. Os testes foram realizados em duplicata.

3.7.3 Estabilidade com o pH

Foram adicionados 200 μL de caldo enzimático devidamente diluído a 200 μL de tampão com diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) e incubou-se por 24 h em 30 $^{\circ}\text{C}$. Os tampões foram preparados misturando-se Na_2HPO_4 (fosfato de sódio) 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M. As proporções para se obter cada valor de pH, foi feita de acordo com McIlvaine (1921). Os testes foram realizados em duplicata.

3.7.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Adicionou-se 780 μL de tampão K a 110 μL de ONPG e incubou-se durante 10 min em diferentes temperaturas (30, 37, 45, 55, 60 e 70 $^{\circ}\text{C}$). Após este intervalo de tempo adicionou-se a enzima β -galactosidase e após 1 min, a reação foi interrompida com a adição de 220 μL de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) 1 M. Depois desta etapa, realizou-se a leitura das absorbâncias, em 405 nm.

3.8 METODOLOGIA DE CÁLCULO

3.8.1 Fatores de conversão

*Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) (Equação 3)

$$Y_{X/S} = \frac{(X_{\max} - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (3)$$

*Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) (Equação 4)

$$Y_{P/S} = \frac{(AET_{\max} - AET_0)}{(S_0 - S_f)} \cdot 10^3 \quad (4)$$

Onde:

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células ($g \cdot g^{-1}$)

X_{\max} : concentração celular máxima ($g \cdot L^{-1}$)

X_0 : concentração celular inicial ($g \cdot L^{-1}$)

$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produtos ($U \cdot g^{-1}$)

S_0 : concentração inicial de substrato ($g \cdot L^{-1}$)

S_f : concentração final de substrato ($g \cdot L^{-1}$)

AET_{\max} : atividade enzimática máxima ($U \cdot mL^{-1}$)

AET_0 : atividade enzimática inicial ($U \cdot mL^{-1}$)

3.8.2 Produtividade celular máxima $P_{X_{\max}}$ (Equação 5)

$$P_{X_{\max}} = \frac{X_{\max}}{t} \quad (5)$$

Onde:

$P_{X_{\max}}$: produtividade celular máxima ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

X_{\max} : concentração celular máxima ($g \cdot L^{-1}$)

t: tempo de cultivo onde X é máximo (h)

3.8.3 Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) (Equação 6)

$$\mu_{\max} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})

X: concentração celular ($g.L^{-1}$)

(dX/dt): velocidade instantânea de crescimento celular ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, AGITAÇÃO, SORO DE QUEIJO, PRODEX E MILHOCINA, NO CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE.

4.1.1 Crescimento celular

Os experimentos foram realizados basendo-se no delineamento experimental Plackett & Burman, com 12 ensaios e ponto central em triplicata. Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados de concentração celular máxima (X_{max}), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), produtividade em células máxima (P_{Xmax}), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), produção de β -galactosidase (AET_{max}), fator de conversão de substrato em enzima ($Y_{P/S}$), atividade enzimática específica (AET_{esp}).

Tabela 4.1: Resultados dos parâmetros testados.

Exp	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_{max} (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	P_{Xmax} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	AET_{max} (U.mL ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (U.g ⁻¹)	AET_{esp} (U.g ⁻¹)
S ₁	44	120	26,7	3	0	3,0	0,09	0,375	0,291	2,4	78,6	815,4
S ₂	44	220	8,9	9	0	3,2	0,35	0,162	0,311	4,3	518,6	1323,4
S ₃	30	220	26,7	3	5	4,7	0,16	0,431	0,556	3,6	129,1	800,3
S ₄	44	120	26,7	9	0	3,1	0,10	0,387	0,332	3,2	83,2	1030,0
S ₅	44	220	8,9	9	5	3,6	0,27	0,167	0,540	4,6	488,3	1248,9
S ₆	44	220	26,7	3	5	3,7	0,16	0,208	0,542	3,4	100,5	916,4
S ₇	30	220	26,7	9	0	5,0	0,16	0,367	0,725	3,3	105,2	676,9
S ₈	30	120	26,7	9	5	3,3	0,16	0,253	0,700	3,2	175,9	992,2
S ₉	30	120	8,9	9	5	2,5	0,32	0,156	0,264	2,4	341,0	965,5
S ₁₀	44	120	8,9	3	5	2,4	0,28	0,160	0,306	3,0	342,3	1205,8
S ₁₁	30	220	8,9	3	0	4,1	0,41	0,170	0,862	2,5	243,5	629,6
S ₁₂	30	120	8,9	3	0	2,6	0,32	0,13	0,656	1,8	274,4	709,8
S ₁₃	37	180	17,8	6	2,5	4,5	0,22	0,189	0,437	3,4	169,9	761,2
S ₁₄	37	180	17,8	6	2,5	4,2	0,21	0,212	0,415	3,7	168,9	874,8
S ₁₅	37	180	17,8	6	2,5	4,5	0,22	0,187	0,433	3,6	183,6	811,8
Cont	37	180	20	-	-	4,6	0,21	0,383	0,695	2,6	160,0	581,2

X_1 : temperatura (°C), X_2 : agitação (min⁻¹), X_3 : lactose (g.L⁻¹), X_4 : milhocina (g.L⁻¹) e X_5 : prodex (g.L⁻¹).

*valor equivalente da concentração de lactose comercial à concentração de soro de queijo.

A seguir, na Figura 4.1, está apresentado um gráfico típico da velocidade específica de crescimento, com o tempo.

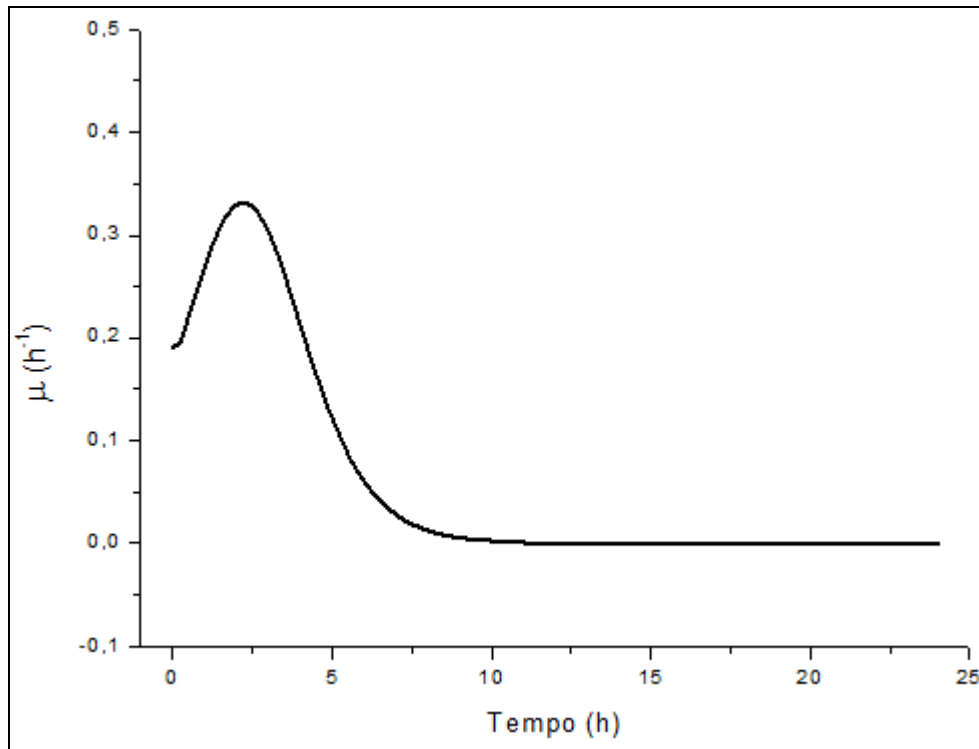


Figura 4.1: Velocidade específica de crescimento (μ) do cultivo contendo soro de queijo 375 mL.L⁻¹, milhocina 9 g.L⁻¹ e sem prodex, conduzido em 44°C e 120 min⁻¹.

De acordo com a Figura 4.1, verifica-se que na condição S₄, a levedura passou por uma fase de adaptação, chegando à sua velocidade específica máxima de crescimento após 2,5 h de cultivo. De todos os experimentos o maior valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi de 0,862, na condição S₁₁. Rech *et al.* (1999), estudando a utilização da proteína hidrolisada de soro de queijo para a produção de β -galactosidase, empregando *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e 6556, obtiveram $\mu_{\max} = 0,61 \text{ h}^{-1}$. Já Rajoka *et al.* (2003) a cinética de *Kluyveromyces marxianus* NIBGE Y-1 em diferentes fontes de carbono, obtiveram valor inferior, com $\mu_{\max} = 0,36 \text{ h}^{-1}$ ao utilizar lactose como substrato.

Os resultados relacionados ao crescimento celular foram tratados utilizando-se o software STATISTICA 7.0 do delineamento Plackett & Burman, conforme mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Efeitos calculados no delineamento PB sobre a concentração celular máxima.

Fatores	Efeito	p
(1) Temperatura (°C)	-0,525000*	0,007253
(2) Agitação (min ⁻¹)	1,258333*	0,000027
(3) Soro de Queijo (mL.L ⁻¹)	0,741667*	0,000991
(4) Milhocina (g.L ⁻¹)	0,025000	0,869091
(5) Prodex (g.L ⁻¹)	-0,125000	0,419556

*efeitos significativos.

Os valores de p menores que 0,05 são fatores significativos para o estudo, sendo assim, de acordo com a Tabela 4.2, verifica-se que as variáveis temperatura, agitação e concentração de soro de queijo foram estatisticamente significativas para a concentração celular máxima de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

A influência da temperatura sobre a concentração celular máxima da levedura, foi verificada testando este parâmetro em 30, 37 e 44 °C. A temperatura apresentou um efeito negativo para o crescimento da levedura, ou seja, ao passar do nível -1 (30 °C) para o nível +1 (44 °C), houve diminuição do crescimento celular. De acordo com Reddy e Reddy (2011), o aumento da temperatura é refletido no aumento da fluidez da membrana, aumentando a sensibilidade celular ao efeito tóxico do etanol. Ghaly *et al.* (2003), verificando o efeito da temperatura no crescimento de *Kluyveromyces fragilis* NRS 5790, obtiveram melhor resultado de crescimento celular em temperatura de 28 °C.

A influência da agitação sobre a concentração máxima de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, foi verificada testando este parâmetro em 120, 180 e 220 min⁻¹. A agitação apresentou um efeito positivo para o crescimento da levedura, indicando que ao passar do nível -1 (120 min⁻¹) para o nível +1 (220 min⁻¹), houve aumento do crescimento celular da levedura. Altos níveis de oxigenação aumentam o crescimento celular, uma vez que favorecem o metabolismo oxidativo (FONSECA *et al.*, 2008). Diniz (2009) e Silveira *et al.* (2005), empregando *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, obtiveram maior crescimento celular em condição aerada, com agitação de 250 min⁻¹, quanto em situação hipóxica, com agitação de 40 min⁻¹.

A influência da concentração inicial de soro de queijo sobre o crescimento celular de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, foi verificada testando este parâmetro em 8,9; 17,8 e 26,7 g.L⁻¹. Este resíduo, apresentou um efeito positivo para o crescimento da levedura, ao passar do nível -1 (8,9 g.L⁻¹) para o nível +1 (26,7 g.L⁻¹), favorecendo o crescimento celular da levedura. Santiago *et al.* (2004),

empregando *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, também obtiveram melhor crescimento celular em concentrações mais elevadas de soro de queijo, com lactose correspondente a 50 g.L⁻¹.

Os parâmetros milhocina e Prodex não foram estatisticamente significativos sobre a concentração de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

4.1.2 Produção de β -galactosidase

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados dos tratamentos dos dados feitos utilizando-se o *software* STATISTICA 7.0 do delineamento Plackett & Burman, relacionados à produção da enzima.

Tabela 4.3: Efeitos calculados no delineamento PB sobre a produção máxima de enzima (AETmax).

Fatores	Efeito	P
(1) Temperatura (°C)	0,645000*	0,009180
(2) Agitação (min ⁻¹)	0,948333*	0,001029
(3) Soro de Queijo (mL.L ⁻¹)	0,091667	0,640623
(4) Milhocina (g.L ⁻¹)	0,715000*	0,005360
(5) Prodex (g.L ⁻¹)	0,425000	0,054652

*efeitos significativos

De acordo com a Tabela 4.3 é possível observar que os parâmetros temperatura, agitação e milhocina são estatisticamente significativos para a produção de β -galactosidase.

A temperatura apresentou um efeito positivo para a produção de β -galactosidase, ao passar do nível -1 (30 °C) para o nível +1 (44 °C), condição que favoreceu a produção da enzima. Esta tendência pode estar relacionada com a permeação da membrana ser mais efetiva em altas temperaturas, facilitando o transporte do substrato contido no meio de cultivo para a enzima situada no interior da célula.

Os estudos sobre a produção de β -galactosidase por micro-organismos vêm sendo realizados em temperaturas mais baixas do que o melhor resultado deste trabalho: Rech *et al.* (1999) utilizaram 37 °C, empregando *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e 6556., Rajoka *et al.* (2003), empregando *K. marxianus* NIBGE Y-1,

utilizaram a temperatura de 35 °C; enquanto Furlan *et al.* (2001) e Schneider *et al.* (2001), utilizaram a temperatura de 30 °C, a partir de *Kluyveromyces marxianus* CDB 002. Assim como Manera *et al.* (2011), utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, e Marquez *et al.* (2005) e Santiago *et al.* (2004), a partir da *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, que também utilizaram a temperatura de 30 °C.

A agitação também apresentou um efeito positivo para a produção de β -galactosidase, ao passar do nível -1 (120 min⁻¹) para o nível +1 (220 min⁻¹). Devido ao fato de a β -galactosidase ser uma enzima intracelular, sua produção está ligada com o crescimento celular. Logo, como a agitação promove o crescimento celular, reflete também na produção da β -galactosidase. Schneider *et al.* (2001) e Furlan *et al.* (2000), estudando o efeito da transferência de oxigênio na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, constataram que a aeração influenciou na produção da enzima, onde, a limitação de oxigênio diminuiu a produção de β -galactosidase.

A concentração de milhocina também apresentou um efeito positivo para a produção de β -galactosidase, ao passar do nível -1 (3 g.L⁻¹) para o nível +1 (9 g.L⁻¹). Manera *et al.* (2011), no estudo da utilização de resíduos agroindustriais para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, também obtiveram a milhocina como um efeito positivo para a produção de β -galactosidase, com concentração de 65 g.L⁻¹. De acordo com Furlan *et al.* (2000), a milhocina pode ser utilizada como única fonte de nitrogênio e vitaminas para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*.

4.2 ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

O substrato estudado neste trabalho foi a lactose presente no soro de queijo, exceto na condição controle, cujo substrato foi a lactose comercial. Em todos os experimentos a lactose foi rapidamente consumida por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, variando o consumo total entre 4 e 6 h, mesmo nas concentrações mais elevadas de substrato. Apenas a condição controle demorou mais para o consumo total do substrato, 12 h. Na Figura 4.2 são apresentadas as curvas de consumo de lactose nos diferentes experimentos e na condição controle.

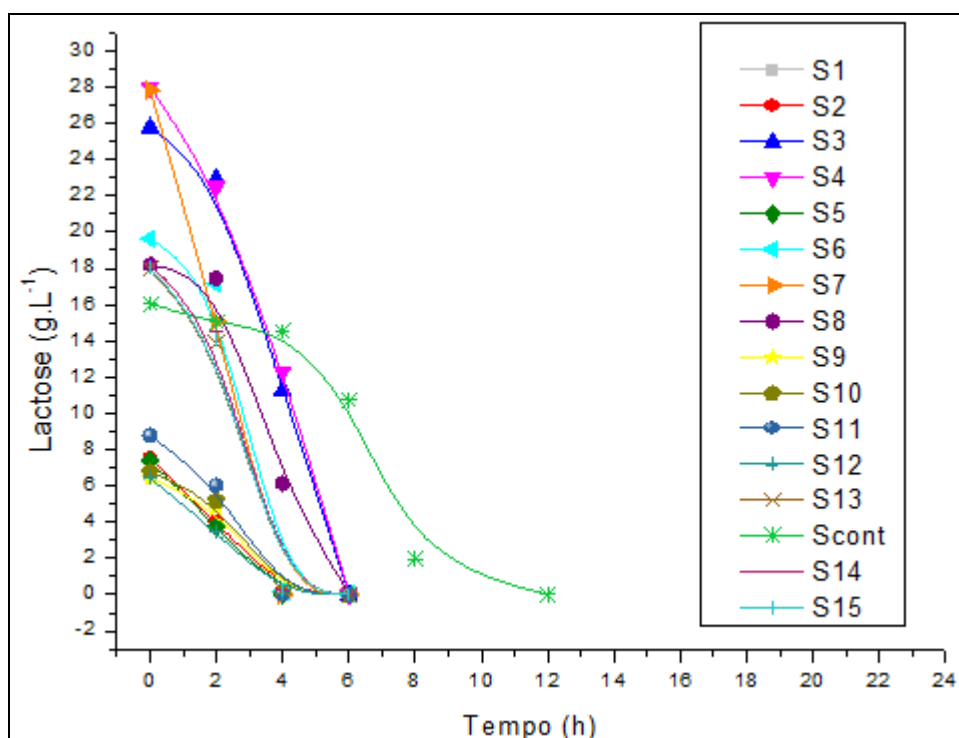


Figura 4.2: Consumo de lactose por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 nos experimentos conduzidos em frascos agitados em diferentes condições de cultivo.

De acordo com Silveira (2006), o maior tempo necessário para o consumo do substrato na condição controle, em relação aos demais experimentos, pode estar relacionado com os nutrientes presentes no soro de queijo (8 g.L^{-1} de proteínas, 8 g.L^{-1} de lipídeos e 10 g.L^{-1} de sais minerais e vitaminas). A presença destes constituintes pode facilitar o metabolismo do soro de queijo pelo micro-organismo, tornando-o mais facilmente consumido que o metabolismo da lactose pura.

Foi observado em todos os experimentos produção de etanol em paralelo ao crescimento celular. As curvas de consumo de lactose e produção de etanol e biomassa de todos os experimentos estão apresentadas no Apêndice C. Embora o oxigênio dissolvido não tenha sido monitorado ao longo dos experimentos, pode-se presumir que não houve aeração suficiente para manter a saturação de oxigênio no meio de cultivo, necessária à realização do metabolismo oxidativo pelas leveduras.

Schneider (1996) estudando diferentes coeficientes de transferência de oxigênio ($K_L a$) (21 , 36 e 89 h^{-1}) em biorreator, constatou que o oxigênio era exaurido nas primeiras horas (2 , 5 e 9 h , respectivamente) de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Esta condição leva a uma parcela das células a realizar o metabolismo fermentativo, levando a produção de etanol.

A seguir, na Figura 4.3 está apresentada uma curva típica de consumo de lactose e produção de células e etanol.

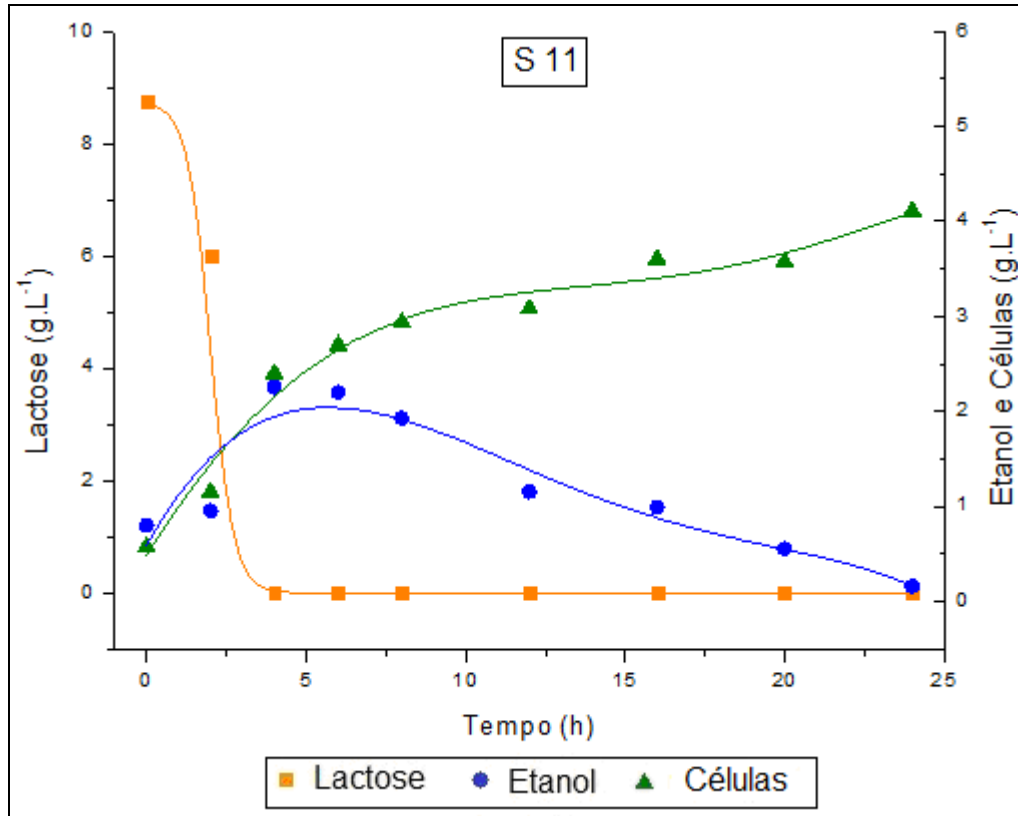


Figura 4.3: Curvas do consumo de lactose e produção de etanol e células no experimento cultivado em 30°C e 220 min⁻¹, contendo lactose (8,9 g.L⁻¹), milhocina (3 g.L⁻¹) e sem Prodex.

De acordo com a Figura 4.3, é possível observar que após o consumo da lactose, a produção de etanol atinge seu ponto máximo, entre 4 e 6 h, e a partir deste ponto passar a ser consumido, sendo utilizado como substrato para a produção de células.

O experimento S₁₁ foi a condição mais favorável ao crescimento celular, pois apresentou maior velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max} = 0,862 \text{ h}^{-1}$) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S} = 0,41 \text{ g.g}^{-1}$). Estes resultados podem estar relacionados com a agitação e concentração de lactose. A maior aeração favorece a respiração celular, fato tal que, promove o crescimento celular.

Nas Figuras 4.4 e 4.5 estão apresentadas curvas típicas referentes ao consumo de lactose e produção de células, etanol e β -galactosidase, do experimento S₁. Condição menos favorável para o crescimento celular e produção de enzima, e o

experimento S₂, melhor condição para a produção de β -galactosidase, respectivamente.

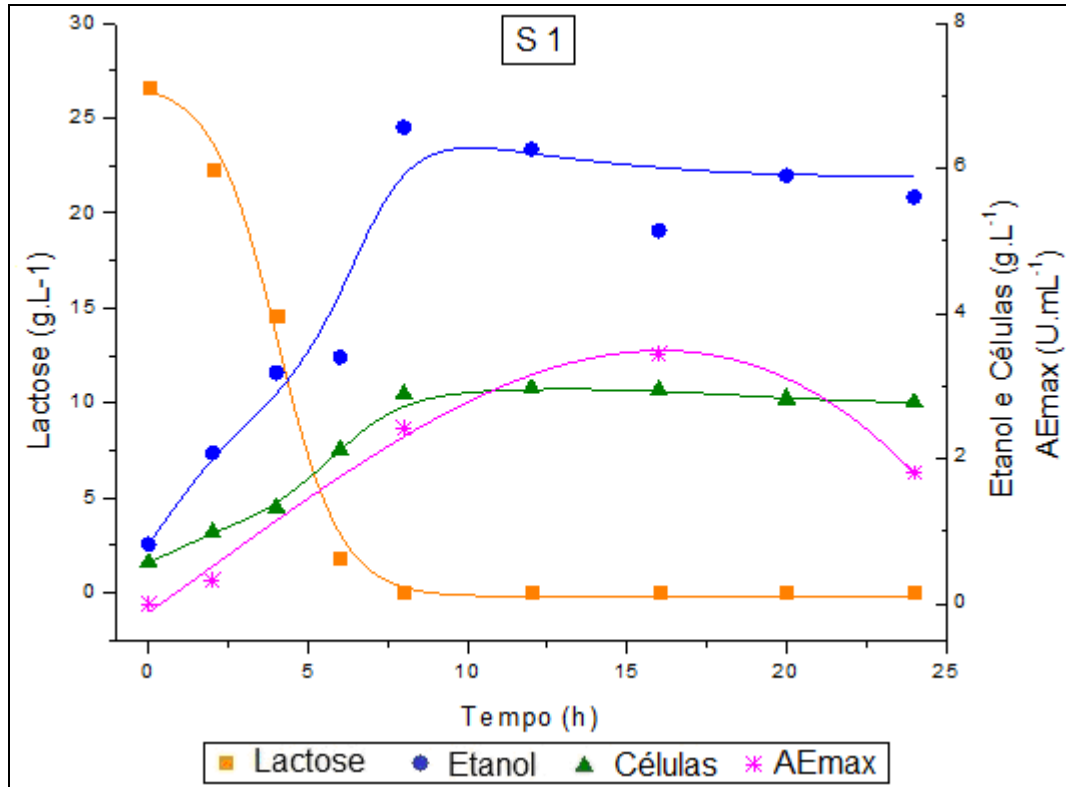


Figura 4.4: Curvas de consumo de lactose e produção de etanol, células e β -galactosidase (AE_{max}) no cultivo conduzido em 44 °C e 120 min⁻¹, contendo soro de queijo (26,7 g.L⁻¹), milhocina (3 g.L⁻¹) e sem Prodex.

De acordo com a Figura 4.4, observa-se que em 8 h, após o consumo do substrato, a produção de etanol e células, atingiram a fase estacionária. A partir de 18 h de cultivo, a atividade enzimática foi reduzida. Este fato pode estar relacionado com o etanol produzido em concentração mais elevada, ter inativado a enzima, assim como relatado por Korkoutas *et al.* (2001).

O experimento S₁, foi a condição menos favorável ao crescimento celular, pois apresentou menor fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S} = 0,09 \text{ g.g}^{-1}$) e também para a produção de enzima, apresentando o fator de conversão de substrato em produto de $Y_{P/S} = 78,57 \text{ U.g}^{-1}$. Estes fatos podem estar relacionados com a elevada temperatura (44 °C), baixa agitação (120 min⁻¹) ou com a concentração inicial de lactose (26,7 g.L⁻¹). Baixas agitações, promovem a via fermentativa, desfavorecendo assim, o crescimento celular. A concentração mais elevada de substrato, pode acarretar em uma limitação de oxigênio, devido ao rápido consumo

do mesmo. Fato tal que inviabiliza a respiração celular, promovendo assim, a via fermentativa e consequente produção de etanol. A temperatura mais elevada pode ter favorecido a permeação da membrana, e, desta forma, ter aumentado a sensibilidade do micro-organismo a um efeito tóxico do etanol produzido, em concentração elevada.

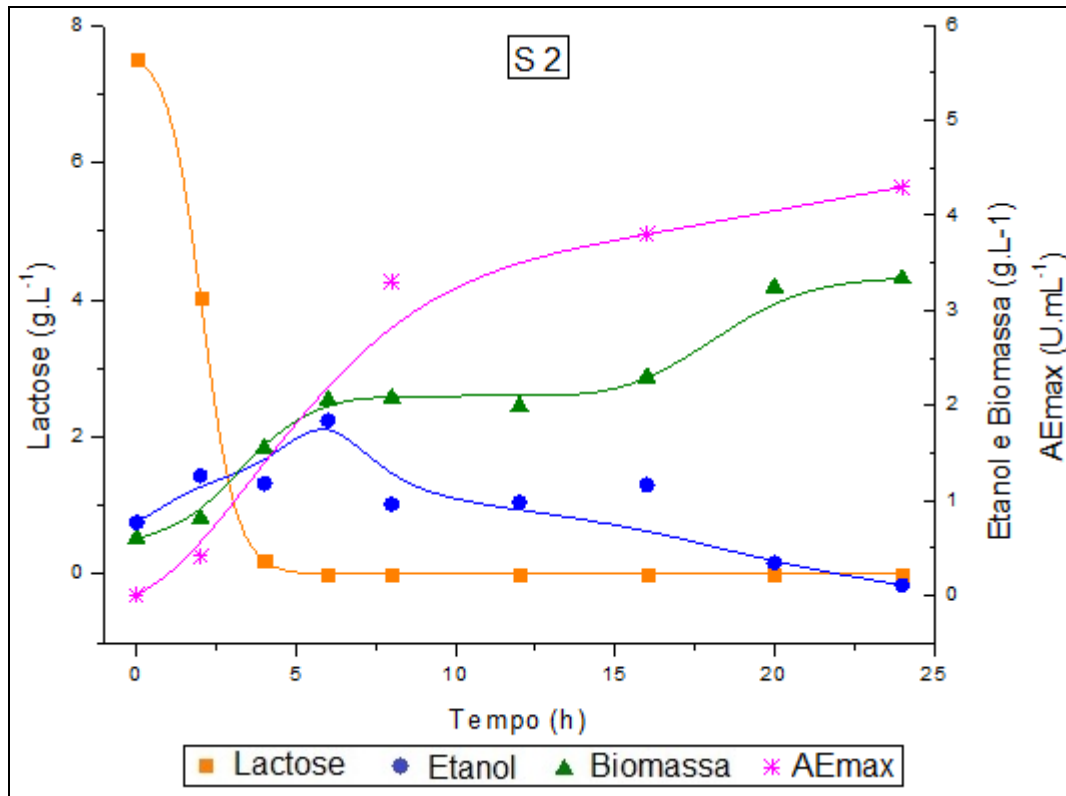


Figura 4.5: Curvas de consumo de lactose e produção de etanol, biomassa e β -galactosidase (Aemax) no experimento cultivado em 44°C e 220 min⁻¹, contendo soro de queijo (125 mL.L⁻¹), milhocina (9 g.L⁻¹) e sem Prodex.

De acordo com a Figura 4.5, é possível observar que após o consumo da lactose, a produção de biomassa atinge uma fase estacionária (entre 6 e 15h) e a partir de 16h, volta a apresentar uma fase exponencial. Esta segunda fase exponencial do micro-organismo, foi possível porque após o consumo da lactose, o etanol produzido em paralelo foi utilizado como substrato.

O experimento S₂ foi a condição mais satisfatória para a produção de β -galactosidase, apresentando o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$ = 518,6 U.g⁻¹). Este resultado pode ser atribuído à alta agitação (220 min⁻¹), que promoveu a respiração celular, bem como à menor concentração inicial de lactose (8,9 g.L⁻¹).

A influência da concentração de lactose sobre o fator de conversão de substrato em células e em produto podem ser observadas nas Figuras 4.6 e 4.7.

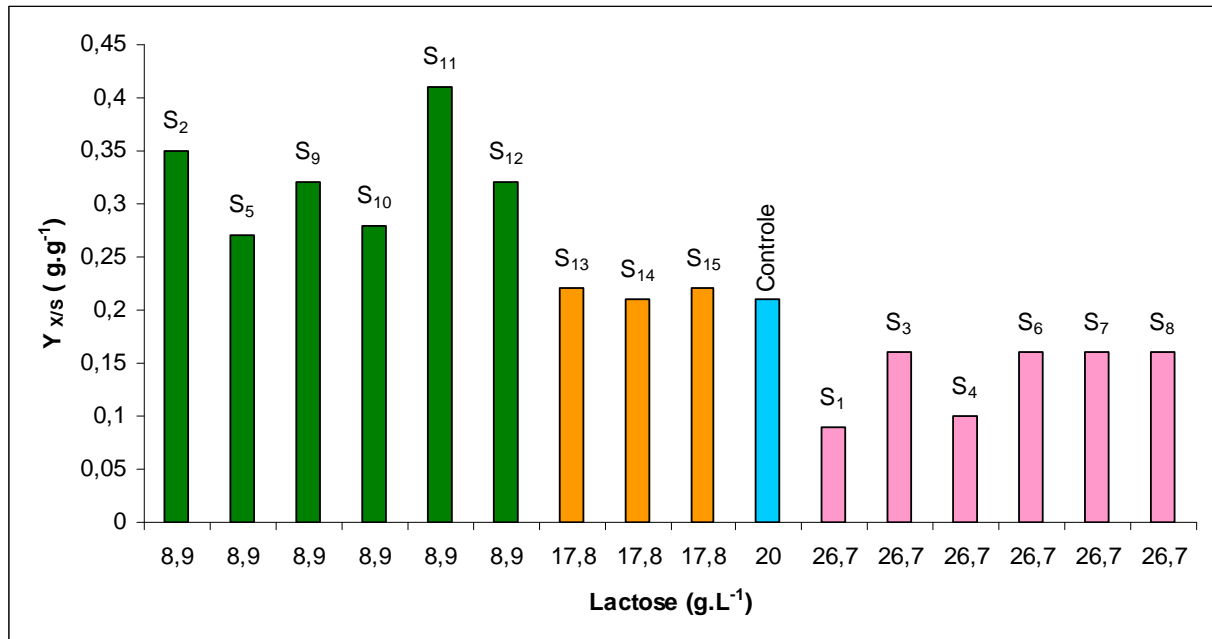


Figura 4.6: Gráfico relacionando a concentração de lactose dos cultivos com os respectivos fatores de conversão de substrato em células.

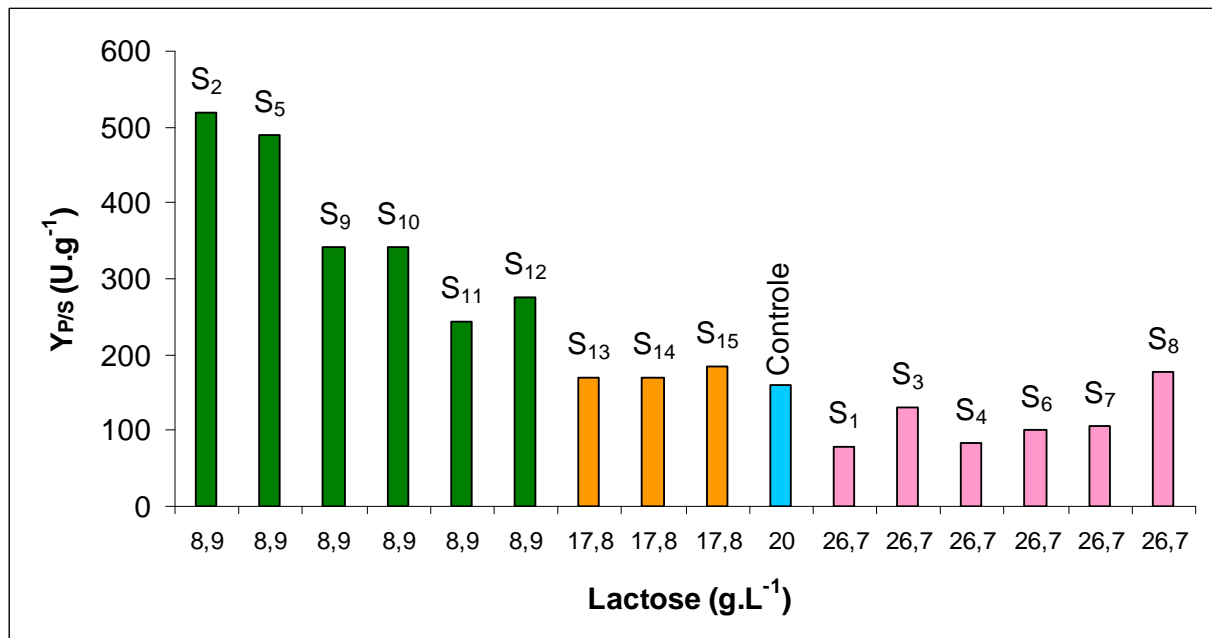


Figura: Gráfico relacionando a concentração de lactose dos cultivos com os respectivos fatores de conversão de substrato em enzima.

Observando as Figuras 4.6 e 4.7, verifica-se que os cultivos contendo o soro de queijo com concentração correspondente de lactose inicial em 8,9 g.L⁻¹, obtiveram

maior conversão do substrato células assim como, em produto, enquanto os cultivos com maior concentração inicial de lactose ($26,7 \text{ g.L}^{-1}$) obtiveram os valores mais baixos de conversão. Estas tendências semelhantes, evidenciam que a produção de β -galactosidase está relacionada ao crescimento do micro-organismo.

Silveira *et al.* (2005), estudando a produção de etanol por soro de queijo a partir de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, constataram que em situação limitada de oxigênio o aumento da concentração inicial de lactose diminuiu o crescimento celular, provavelmente porque o açúcar foi mais canalizado para a via fermentativa do que para a via oxidativa.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

As médias das duplicatas, bem como os valores de desvio padrão de cada resultado estão apresentados no Apêndice D.

4.3.1 Estabilidade com o tempo

Na Figura 4.8 estão mostrados os resultados da estabilidade com o tempo da β -galactosidase. A estabilidade da enzima com o tempo foi verificada em 0, 1 e 8 dias, em diferentes temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente (A), refrigerada (R) e congelada (C), aproximadamente de 25, 4 e $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

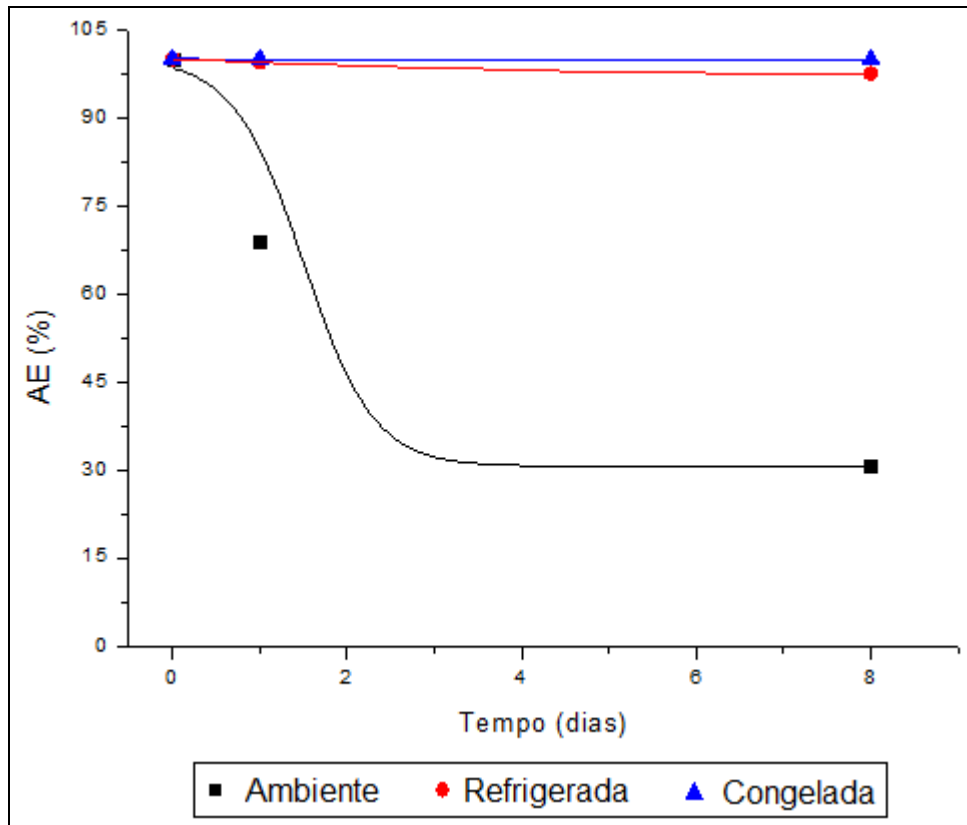


Figura 4.8: Curvas referentes à estabilidade da β -galactosidase com o tempo.

De acordo com a Figura 4.8, verifica-se que a enzima mantida em refrigerador e congelador permaneceu estável durante os dias de teste, permanecendo com a atividade enzimática em 97,5% e 99,9%, respectivamente. Enquanto que a enzima mantida em temperatura ambiente teve perda na atividade enzimática, apresentando no oitavo dia apenas 30,6% de atividade. Estes resultados indicam que a β -galactosidase quando armazenada em baixas temperaturas, sob refrigeração ou congelada, tende a se manter estável.

4.3.2 Estabilidade com a temperatura

A estabilidade da β -galactosidase com a temperatura foi estudada em 30, 37, 45, 55, 60 e 70°C e nos tempos de 5, 10, 30 e 60 min. A seguir, na Figura 4.9 estão apresentadas as curvas de atividade enzimática nas diferentes temperaturas e nos tempos testados.

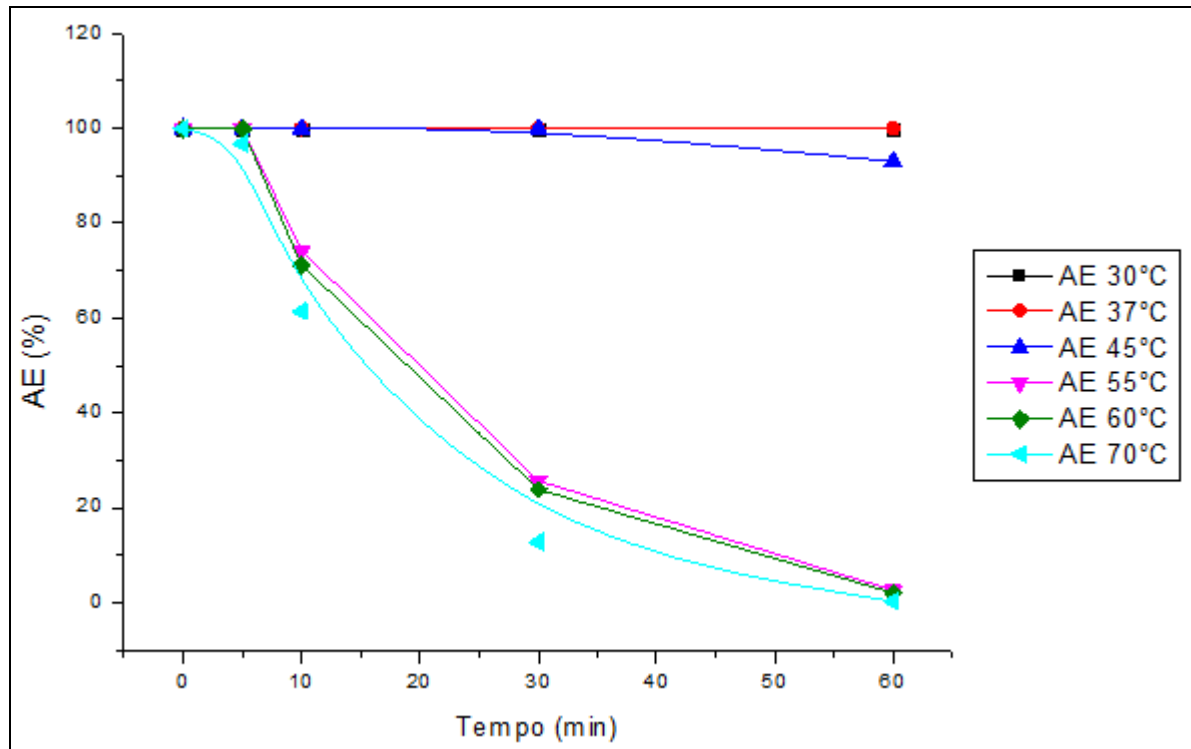


Figura 4.9: Curvas da estabilidade da β -galactosidase com a temperatura.

De acordo com a Figura 4.9, verifica-se que a β -galactosidase se manteve estável durante os 60 min de teste, apenas nas temperaturas de 30 e 37°C, permanecendo com 100% de sua atividade enzimática. Em 45°C a enzima ficou estável até 30 min, após este intervalo de tempo, a atividade enzimática teve uma diminuição, passando a ter 93,1% de sua atividade. Nas temperaturas de 55, 60 e 70°C, a redução na atividade enzimática ocorreu já a partir de 10 min de teste, onde em 70°C a redução foi mais drástica, chegando ao final do teste com apenas 0,25% da atividade. Braga *et al.* (2011), estudando as propriedades térmicas da β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082, obtiveram melhor estabilidade térmica em 30°C.

4.3.3 Estabilidade com o pH

A estabilidade da β -galactosidase com o pH foi testada em 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Na Figura 4.10 estão apresentados os valores dos testes da estabilidade da enzima com o pH.

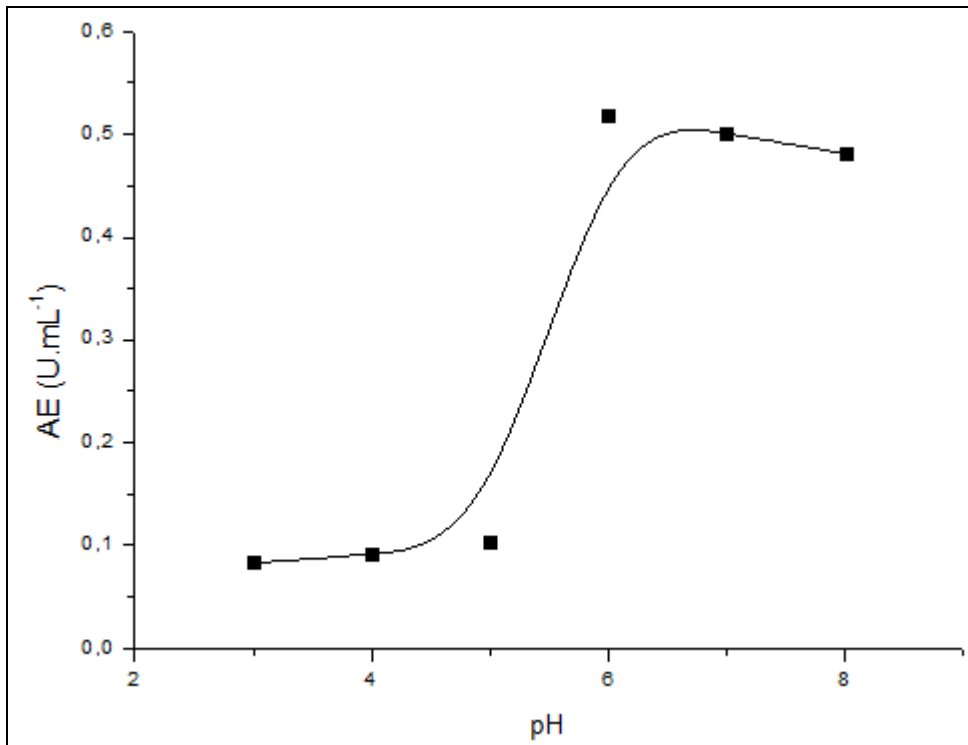


Figura 4.10: Estabilidade da β -galactosidase com o pH.

De acordo com a Figura 4.10, verifica-se que os testes com pH 3, 4 e 5, a atividade enzimática foi baixa, talvez devido a uma possível desnaturação da enzima, uma vez que condições ácidas podem desnaturar proteínas. Nos testes com pH 6, 7 e 8, a enzima apresentou atividade enzimática maior que nos valores de pH 3, 4 e 5. Os resultados evidenciam que a β -galactosidase é mais estável em condições próximas a neutralidade, pois em pH 6 e 7 a enzima apresentou os maiores valores de atividade enzimática. Esta tendência foi apresentada por Oliveira (2005), que relatou que β -galactosidasas obtidas a partir de leveduras têm preferência por pH entre 6,6 e 7,3. Os resultados, apresentaram valores de atividade baixos, talvez devido ao fato de este teste ter sido realizado durante 24 h em temperatura ambiente, condição que no estudo da estabilidade com o tempo se mostrou pouco favorável para manter a enzima estável. Adalberto (2005), também concluiu que a β -galactosidase apresentou maior estabilidade em valores de pH entre 6 e 7.

4.3.4 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -galactosidase

A verificação da temperatura ótima para atividade enzimática de β -galactosidase, foi realizada testando as temperaturas de 30, 37, 45, 55, 60 e 70 °C. Na Figura 4.11 estão apresentados os resultados.

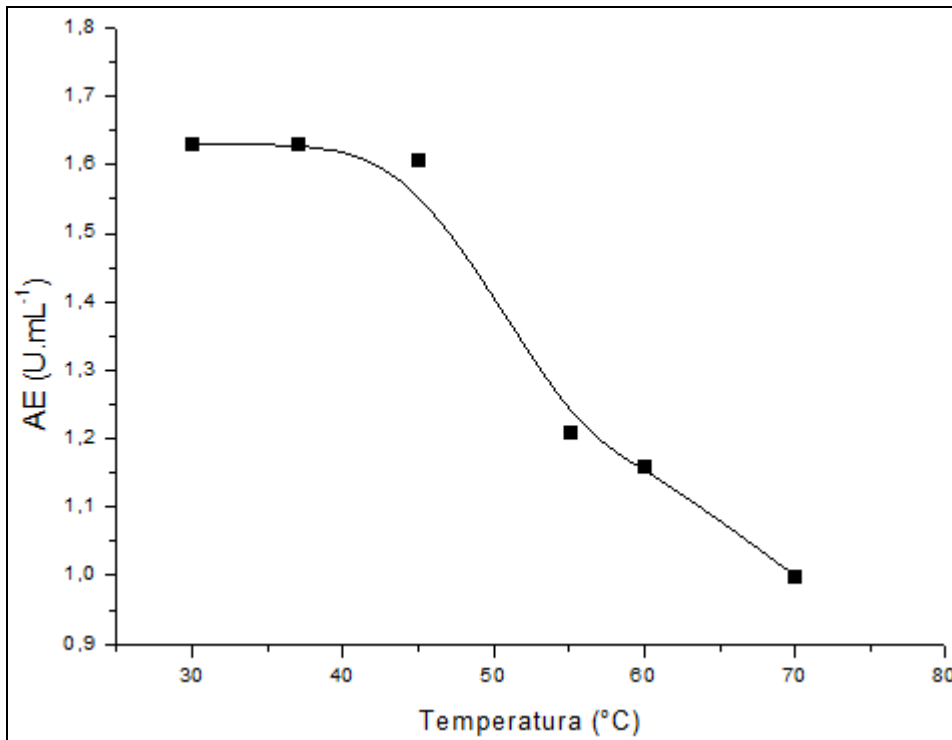


Figura 4.11: Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de β -galactosidase

Na Figura 4.11 verifica-se que a atividade enzimática de β -galactosidase diminuiu gradativamente com o aumento da temperatura. As temperaturas 55, 60 e 70 °C foram pouco favoráveis, apresentando baixa atividade enzimática. Enquanto as temperaturas de 30, 37 e 45 °C, foram favoráveis à atividade da enzima, se mostrando os melhores valores para a atividade da β -galactosidase produzida. Rech *et al.* (1999), empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e Song *et al.* (2010), empregando *Kluyveromyces lactis* JA6 obtiveram resultado semelhante ao deste trabalho, com temperatura ótima para atividade enzimática de β -galactosidase em 37°C.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

*Os resultados deste trabalho revelaram que as fontes alternativas de carbono e nitrogênio se mostraram eficientes para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e para a produção de β -galactosidase. Dentre estes destacando-se o soro de queijo líquido, como fonte de carbono, e a milhocina, como fonte de nitrogênio.

*Comparando o meio controle com os experimentos, o consumo de lactose foi mais rápido nos experimentos, evidenciando que o micro-organismo cresceu melhor diante de soro de queijo do que apenas com lactose comercial, devido provavelmente à acessibilidade de nutrientes no soro. De um modo geral, o substrato lactose presente no soro, foi rapidamente consumido em até no máximo 6h, em todos os experimentos.

*Em paralelo foi observada a produção de etanol, em diferentes concentrações, de acordo com a agitação, temperatura e a concentração inicial de lactose contida no soro de queijo. A produção de etanol em todos os experimentos indica que não se alcançou a aeração necessária para promover apenas a via respiratória.

*O tratamento dos dados do delineamento Plackett & Burman indicou que os parâmetros temperatura, agitação e soro de queijo foram estatisticamente significativos para o crescimento celular. Observando as curvas de crescimento e os valores dos fatores de conversão, assim como os parâmetros significativos apontados no tratamento dos dados, conclui-se que o experimento contendo lactose ($8,9 \text{ g.L}^{-1}$) e milhocina (3 g.L^{-1}) à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 220 min^{-1} de agitação, foi o mais indicado para o crescimento celular da levedura.

*Visando à produção de β -galactosidase, os parâmetros estatisticamente significativos foram temperatura, agitação e milhocina. De acordo com os resultados, conclui-se que o experimento contendo lactose ($8,9 \text{ g.L}^{-1}$) e milhocina (9 g.L^{-1}), em $44 \text{ }^\circ\text{C}$ e 220 min^{-1} de agitação, foi a melhor condição para a produção da enzima β -galactosidase.

* Estabilidade da β -galactosidase com o tempo: a enzima produzida permaneceu estável nos 8 dias de teste, quando armazenada em refrigerador e congelador. A β -galactosidase mantida em temperatura ambiente teve redução significativa da atividade enzimática no oitavo dia de estudo.

*Estabilidade da β -galactosidase com o pH: a enzima produzida permaneceu estável apenas nas condições de pH 6 e 7. Nas condições ácidas, a atividade enzimática foi muito baixa, enquanto que em pH 8, houve atividade enzimática satisfatória, porém, com valor inferior ao pH 6 e 7.

*Estabilidade da β -galactosidase com a temperatura: a enzima produzida permaneceu estável durante os 60 min de teste, apenas nas temperaturas de 30 e 37 °C. Em 45°C a enzima ficou estável até 30 min, após este intervalo de tempo, a atividade enzimática teve uma diminuição drástica. Na temperatura de 55 °C, em 30 min de teste a enzima perdeu a atividade enzimática. Enquanto que nas temperaturas de 60 e 70°C, a enzima perdeu a atividade já em 10 min de teste.

*Efeito da temperatura na atividade enzimática de β -galactosidase: verificou-se que a atividade enzimática da β -galactosidase diminuiu gradativamente com o aumento da temperatura, tendo como melhores temperaturas para atividade enzimática 30 e 37 °C.

*Os resultados da caracterização da β -galactosidase são referentes à enzima bruta, sendo assim, não se pode afirmar que após um processo de purificação, a enzima manteria o mesmo comportamento.

*Diante de todos os resultados, conclui-se que entre as condições de cultivo avaliadas, temperatura e agitação, ambas se mostraram relevantes para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e para a produção da β -galactosidase. Quanto às fontes alternativas avaliadas, o soro de queijo e milhocina foram relevantes nos resultados dos experimentos, enquanto o Prodex, não foi significativo.

*O experimento com melhor resultado para a produção da enzima β -galactosidase foi o S₂, contendo de lactose em 8,9 g.L⁻¹, milhocina 9 g.L⁻¹, conduzido em 44°C e com agitação de 220 min⁻¹.

Perspectivas

* Sugere-se a continuação deste trabalho, utilizando biorreator ao invés de shaker, onde pretende-se alcançar a aeração necessária para que a levedura siga apenas a via oxidativa.

*Sugere-se testar a utilização do soro de queijo sem desproteinizá-lo, visando a produção de β -galactosidase, pois a parte proteica pode contribuir para uma melhor produção da enzima.

REFERÊNCIAS

ADALBERTO, P. R. **Produção, isolamento e caracterização de β -galactosidase de *Trechoderma reesei*: interação de íons metálicos na atividade enzimática.** Tese de doutorado em Química, Universidade Estadual de Araraquara, 2005.

ALMEIDA, M.; PASTORE, G. M. **Açúcares funcionais Galactooligossacarídeos.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 32: 10 – 14, 2004.

AMMAM, M.; FRANSAER, J. **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, 148: 583 – 589, 2010.

ASKU, Z.; EREN, A. T. **Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source.** Process biochemistry, 40: 2985 – 2991, 2005.

BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. **Intolerância à lactose e suas conseqüências no metabolismo do cálcio.** Revista Saúde e Pesquisa, v. 4, n° 1: 81 – 86, 2011.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. **Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF8.** Journal of fermentation bioengineer, v. 77, n. 3, p. 320 – 323, 1994.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B. de; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. **Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess.** FENS yeast research, 4: 691 – 698, 2004.

BLANK, L. M.; LEHMBECK, F.; SAUER, U. **Metabolic-flux and network analysis on fourteen hemiascomycetous yeasts.** Federation of European Microbiological Societies Yeast Research, 5: 545 – 558, 2004.

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

BRADY, D.; MARCHANT, R.; McHALE, L.; McHALE, A. P. **Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media**. *Enzyme Microbiology Technology*, 17: 696 – 699, 1995.

BRAGA, A. R.; ORES, J. da C.; SALA, L.; MANERA, A. P.; MAUGERI, F; KALIL, S. J. **Propriedades térmicas de β -galactosidase bruta e purificada de duas cepas de *Kluyveromyces marxianus***. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

BRANDÃO, G.; CARVALHO, M. de; ROSSEI, A. A.; SILVA, J. B. A. **Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte, a fermentação**. *Revista analytica*, 26: 46 – 54, 2006.

BRANDÃO, S. C. C.; MATEDI, M. A. L.; CARDOSO, M. das G. L. O. **Alergia e intolerância ao leite de vaca**. *Nutricy*, 2010.

Disponível em: <<http://nutricy.com>>

Acesso em: 27/07/2011.

BRIÃO, V. B.; FOLLMER, L.; SOUZA, M. de; RODRIGUES, V. M. **Cinética do escurecimento não-enzimático com soluções modelo de açúcares e aminoácidos em pH neutro e ácido**. *Acta Scientiarum Technology Maringá*, v. 33, nº 1: 87 - 93, 2011.

BURGER, J.; KIRCHNER, M.; BRAMANTI, B.; HAAK, W.; THOMAS, M.G. **Absence of the lactase-persistence associated allele in early Neolithic Europeans**. *PNAS*, v. 104, nº10: 3736 – 3741, 2007.

CABRAL, J. M. S.; BARROS, M. R. A.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.

CASTRO, R. C. de A.; ROBERTO, I. C. **Avaliação da fermentação de glicose por linhagens de *Kluyveromyces marxianus* visando sua aplicação em sacarificação e fermentação simultânea (SFS)**. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. D. M. **Separation of proteins and lactose from dairy wastewater**. Chemical engineering and processing, 46: 398 - 404, 2007.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. de F.; FURTADO, A. A. L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde**. B. Ceppa, v. 19, nº1: 33 – 42, 2001.

COELHO, M. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Petrópolis: Epub, 2008.

COGHETTO, C. C.; SILVA, M. F.; GOLUNSKI, S. M.; OLIVEIRA, J. V. de; LUCCIO, M. Di; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H. **Utilização de suporte inorgânico para imobilização da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

DANIEL, R. M. **The upper limits of enzyme thermal stability**. Enzyme and Microbial Technology, 19: 74 – 79, 1996.

DEVLIN, T. M. (Coord.). **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2008.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2009.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺ - ATPase da membrana plasmática**. Tese de doutorado em Biologia, com especialidade em Microbiologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008.

FISCHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L. **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 Zootecologia, v. 31, nº1: 402 – 410, 2002.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts.** FEMS Microbiology Reviews, 24: 507 – 529, 2000.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. **Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source.** Federation of European microbiological societies, Blackwell, 2007.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. **The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential.** Applied Microbiol Technology, 79: 339 – 354, 2008.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. **Estudo de estabilidade de *Aspergillus oryzae* livre e imobilizada em alginato, gelatina e glutaraldeído.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. dos S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. de F. JONAS, R. **Formulation of a lactase-free, low-cost culture medium for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*.** Biotechnology letters, 22: 589 – 593, 2000.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. dos S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. de F.; JONAS, R. **Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium.** Acta Biotechnology, 21: 57 – 64, 2001.

GARAVAGLIA, J.; Flôres, S. H.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. do C.; AYUB, M. A. Z. **Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures.** World Journal Microbiology Biotechnology, 23: 1273 – 1279, 2007.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; AVERY, A. **Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 741 – 749, 2003.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; CORREIA, L. R. **Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production.** Bioresource Technology, 96: 1143 – 1152, 2005.

GONÇALVES, J. A.; CASTILLO, F. J.; **Partial purification and characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*.** Journal Dairy Scientific, 65: 2088 – 2094, 1982.

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, 28: 375 – 384, 2010.

GUZMAN, J. J.; LEOS, C. S.; CRUZ-GUERRERO, A. E.; SERRANO, G. M. R.; MUNGUÍA, A. L.; RUIZ, L. G.; GARIBAY, M. G. **Interaction between β -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity.** International Dairy Journal, 16: 1169 – 1173, 2006.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E.; HANG, L. E. **Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*.** Bioresource Technology, 86: 305 – 307, 2003.

HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. **Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulose genes.** Journal of Biotechnology, 130: 114 – 123, 2007.

JIA, J.; WHEALS, A. **Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus***. *Current Genetic*, 38: 264 – 270, 2000.

JURADO, E; CAMACHO, F.; LÚZON, G.; VICARIA, J. M. **A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n° 3: 300 – 309, 2002.

KIELING, D. D. **Enzimas, aspectos gerais**. Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, 2002.

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

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

KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F.; RODRIGUES, R. da C.; NINOW, J. L. **Immobilization of β -galactosidase onto chitosan macro and nanoparticles**. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

KORKOUTAS, Y.; DIMITROPOULOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. **High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material**. *Bioresource Technology*, 82: 177 – 181, 2001.

KREBS, N. F. **Nutritive value of milk and alternative sources**. National Institutes of Health (NIH) – Consensus Development Conference: Lactose Intolerance and health: 35 - 37, 2010.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA-OCHOA, F. **Activity over lactose and ONPG of a genetically of an engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized kinetic modeling.** *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 181 – 193, 2001.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. ***Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow.** *Fungal Biology Reviews*, 24: 17 – 26, 2010.

LEISTNER, L. **Basic aspects of food preservation by hurdle technology.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 55: 181 – 186, 2000.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus*.** Tese doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

LEMOS, A. C.; FAGUNDES, A. da S.; MOLON, F. de O.; LUCCIO, M. Di; KALIL, S. J. **Estratégias para obtenção de β -galactosidase purificada.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011 a.

LEMOS, A. C.; MOLON, F. de O.; FAGUNDES, A. da S.; LUCCIO, M Di; KALIL, S. J. **Ultrafiltração de β -galactosidase: influência do pH e da massa molar de corte da membrana no processo.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011 b.

LEWANDOWSKA, M.; KUJAWSKI, W. **Ethanol production from lactose in a fermentation / pervaporation system.** *Journal of Food Engineering*, 79: 430 – 437, 2006.

LIBARDI JR, N. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos.** Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da região de Joinville, 2010.

LIMA, A. F.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; CAVALCANTE, K. F.; GONÇALVES, L. R. B. **Seleção de espécies de *Kluyveromyces* para produção de β -galactosidase em soro de leite.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011

LISBOA, C. R. **Síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose e soro de leite.** Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande / RS, 2008.

LISTIOHADI, Y.; HOURIGAN, J. A.; SLEIGH, R.W.; STEELE, R.J. **Moisture sorption, compressibility and caking of lactose polymorphs.** International Journal of Pharmaceutics, 359: 123 – 134, 2008.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. **Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities.** Alimentary, pharmacology & therapeutics, 27: 93 – 103, 2008.

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. **A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 35 – 40, 2004.

McILVAINE, T. C. **A buffer solution for colorimetric comparasions.** Journal Biology Chemistry, 49: 185 – 186, 1921.

MADDIPATI, P.; ATIVIEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. **Ethanol production from syngas by *Clostridium* P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract.** Bioresource technology, 102: 6494 – 6501, 2011.

MANERA, A. P.; ORES, J. da C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. **Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.** Acta Scientiarum Technology, v.33, n. 2: 155 – 161, 2011.

MAO, X.-Bing; EKSRIWONG, T.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG, J. J. **Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivations of medicinal mushroom *Cordyceps militaris***. Process biochemistry, 40: 1667 – 1672, 2005.

MARQUEZ, L. D. S.; SOUSA, G. D. B.; ASSIS, A. J.; RIBEIRO, E. J. **Synthesis of β -galactosidase in aerobic fermentation by *Kluyveromyces marxianus***. 2° Mercosur Congress on chemical engineering, 2005.

MARTINDALE the complete drug reference. Pharmaceutical Press, 32^a ed, 1999.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. **Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos**. Brazilian Journal of Food and Technology, v. 12, n°3: 230 – 240, 2009.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. de C. **Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular**. Revista Associação Médica Brasileira, v. 56, n°2: 230 – 236, 2010.

MESSIA, M. C.; CANDIGLIOTA, T.; MARCONI E. **Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk**. Food chemistry, 104: 910 – 917, 2007.

MICHALSKI, E. Z.; MENEGOL, D.; REIS, L.; BETTIO, M.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. **Efeito da suplementação de Prodex na produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em cultivos em estado sólido**. XVI Encontro de Jovens Pesquisadores, Universidade de Caxias do Sul: setembro, 2008.

MILESSI, T. S. dos S.; BRANCO, R. de F.; SILVA, S. S. da. **Efeito de tensoativo natural na permeabilidade de células de *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086 utilizando glicerol de biodiesel como fonte de carbono**. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

MIRZA, M. A.; MUSHTAQ, T. **Effect of supplementing different levels of corn steep liquor on the post-weaning performance of pak-karakul lambs.** Pakistan Vet. Journal, 26: 135 – 137, 2006.

MONTALTO, M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; VASTOLA, M.; CAMMAROTA, G.; MANNA, R.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. **Management and treatment of lactose malabsorption.** World Journal of Gastroenterology, v. 12, nº 2: 187 - 191, 2006.

MUNIZ, M. **Confusão no diagnóstico da intolerância à lactose,** 2010

Disponível em: <<http://www.wallstreetfitness.com.br>>

Acesso em: 01/07/2011.

NEU, J.. **Early feeding, human Milk and the transition.** National Institutes of Health (NIH) – Consensus Development Conference: Lactose Intolerance and health: 33 – 34, 2010.

NONKLANG, S.; ANO, A.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; SAITO, Y.; HOSHIDA, H.; AKADA, R. **Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation.** Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 73, nº5: 1090 – 1095, 2009.

NORO, G. **Síntese e secreção do leite.** Seminário da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

OBINU, D. A.; ENATTAH, N. S.; PEDRONI, A.; PELTONEN, L.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; DORE, M. P. **Prevalence of lactase persistence and the performance of a non-invasive genetic test in adult Sardinian patients.** e-SPEN, the European e-Journal of clinical nutrition and metabolism, 5: e1 – e5, 2010.

OLIVEIRA, C. C. de. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – desenvolvimento de um sistema de produção estável.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade do Minho, Portugal, 2005.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. **Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates.** Food Biotechnology and Technology, v. 41, n° 4: 315 – 320, 2003.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; AYUB, M. A. Z. **Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*.** Journal of Industrial Microbiology & biotechnology, 23: 91 – 96, 1999.

RECH, R.; AYUB, M. A. Z. **Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey.** Process Biochemistry, 42: 873 – 877, 2007.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. **Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice.** Food and bioproducts processing, 89: 487 – 491, 2011.

REVILLION, J. P. de P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. **Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 46, n°1: 121 – 127, 2003.

RICHETTI, A.; MUNARETTO, C. B.; LERIN, L. A.; OLIVEIRA, V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de. **Imobilizaçãp de inulinase fr *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

ROWENHORST, R. J.; VISSER L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DJIKEN, J. P. **Production, distribuction and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.** Applied Environmental Microbiology, 54: 1131 – 1137, 1988.

ROWENHORST, R. J.; RITMEESTER, W. S.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DJIKEN, J. P. **Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species.** Applied Environmental Microbiology, 56: 3329 – 3336, 1990.

SANTIAGO, P.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. *Ciência e tecnologia alimentícia*, v. 24, n. 4: 567 – 572, 2004.

SANTIN, J. **Intolerância à lactose: parte 1 - etiologia, epidemiologia e prevalência**. *Revista Milkpoint*, 2005.

Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/outras-secoes/leite-saude/intolerancia-a-lactose-parte-1-etilogia-epidemiologia-e-prevalencia-25559n.aspx>

Acesso em: 30/04/2011.

SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ACAR, J.; MUTLU, M. **The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: immobilized pectinase for mash treatment**. Department of Food Engineering, Hacettepe University Ankara – Turkey, 2000.

SCHNEIDER, A. L. dos S. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.

SCHNEIDER, A. L. dos S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. de F.; JONAS, R.; FURLAN, S. A. **Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source**. *Biotechnology letters*, 23: 547 – 550, 2001.

SCHULTZ, N.; CHANG, L.; HAUCK, A.; REUSS, M.; SYLDATK, C.. **Microbial production of single-cell protein from desproteinized whey concentrates**. *Applied Microbiol Biotechnology*, 69: 515 – 520, 2006.

SERPA, L.; CARMINATTI, C. A.; CESCA, K.; TURRA, G. M.; ANTÔNIO, R. V.; PETRUS, J. C. C. **Produção de biopolímero por *Escherichia coli* recombinante utilizando lactose, uma alternativa para o aproveitamento do soro de queijo**. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

SIBLEY, E. **Cellular and molecular biology of lactase**. National Institutes of Health (NIH) – Consensus Development Conference: Lactose Intolerance and health: 39 – 43, 2010.

SILVA, M. C. F. da; SOUZA, P. M.; ANTUNES, A. A.; LINS, C. I.; RIBEIRO, D. L. R.; SILVA, N.R. A.; BERGER, L. R.; SILVA, C. A. A.; TAKAKI, G. M. Campos. **Utilização de milhocina e óleo pós-fritura para a produção de biossurfactante por *Mucor mucedo***. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011.

SILVEIRA, M. M.; WISBECK, E.; JONAS, e. **Production of glucose–fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 55: 442 – 445, 2001.

SILVEIRA, R. F. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo**. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2006.

SILVEIRA, W. B. da. **Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa / MG, 2004.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L. **Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels**. Enzyme and Microbial Technology, 36: 930 – 936, 2005.

SONG, Y. S.; LEE, J. H.; KANG, S. W.; KIM, S. W. **Performance of β -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during enzyme immobilization process**. Food chemistry, 23: 1 – 5, 2010.

SRICHUWONG, S.; FUJIWARA, M.; WANG, X.; SEYAMA, T.; SHIROMA, R.; ARAKANE, M.; MUKOJIMA, N.; TOKUYASU, K. **Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol.** Biomass and bioenergy, 33: , n. 5, 890 – 898, 2009.

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. **Lactose intolerance.** American family physician, v. 65, n°9: 1845 – 1850, 2002.

TAMURA, A.; SHIOMI, T.; HACHIYA, S.; SHIGEMATSU, N.; HARA, H. **Low activities of intestinal lactase suppress the early phase absorption of soy isoflavones in Japanese adults.** Clinical nutrition, 27: 248 – 253, 2008.

TÉO, C. R. P. A. **Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional.** Ciência e saúde UNIPAR, 6: 135 – 140, 2002.

THE CORN REFINERS ASSOCIATION. **Assessment plan of corn steep liquor in accordance with the USEPA high production volume chemical challenge program.** Washington, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRENKLE, A.; RIBEIRO, C. **Evaluation of a Mixture of Corn Steep Liquor and Distillers Solubles as a Replacement for Corn and Supplement in Cattle Finishing Diets.** Beef Research Report : Iowa State University, 1999.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado.** Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Di. **Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides.** Química Nova, v. 30, n°8: 1860 – 1866, 2007.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; DIJKEN, J. P. V. **Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation.** *Yeast*, 8: 501 – 517, 1992.

VRESE, M. de; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. **Probiotics – compensation for lactase insufficiency.** *American Journal Society for Clinical Nutrition*, 73: 421S – 429S, 2001.

WAITES, M. J.; MORGAN, N. L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. **Industrial microbiology: an introduction.** Estados Unidos: Blackwell Science, 2001.

YANASE, S.; HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. **Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 381 – 388, 2010.

ANEXOS

ANEXO A: ORÇAMENTO DE MATÉRIAS PRIMAS.

cotação

2 mensagens

ROSE <vendas@quilab.com.br>

1 de junho de 2011 09:42

Responder a: ROSE <vendas@quilab.com.br>

Para: elizascholz@gmail.com

Bom dia

Segue cotação

Lactose 500g PA; R\$ 33,00

Bactopeptona ou Peptona R\$ 160,00

Extrato de levedura R\$ 153,00

Sulfato de amônio 1000g PA.R\$ 12,00

Ureia 500g PA R\$ 8,20

Roselene Pedri

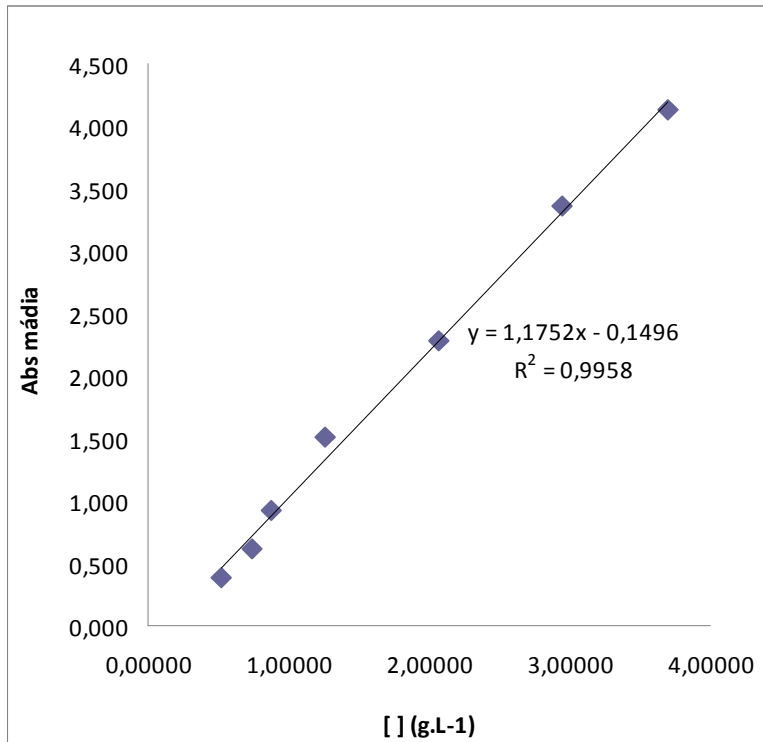
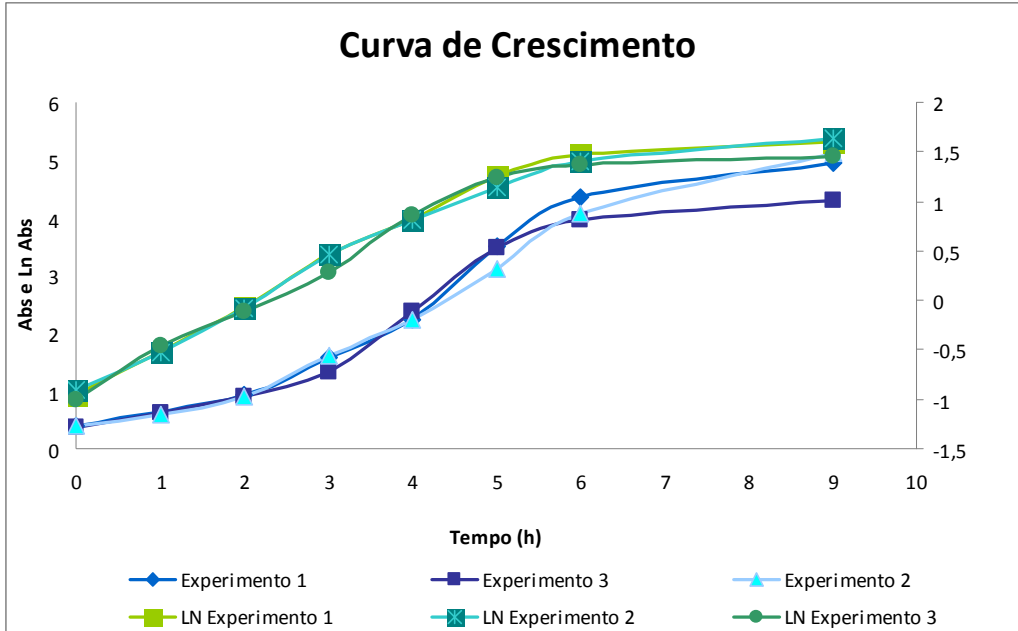
Depto de vendas

(47) 3422-8787

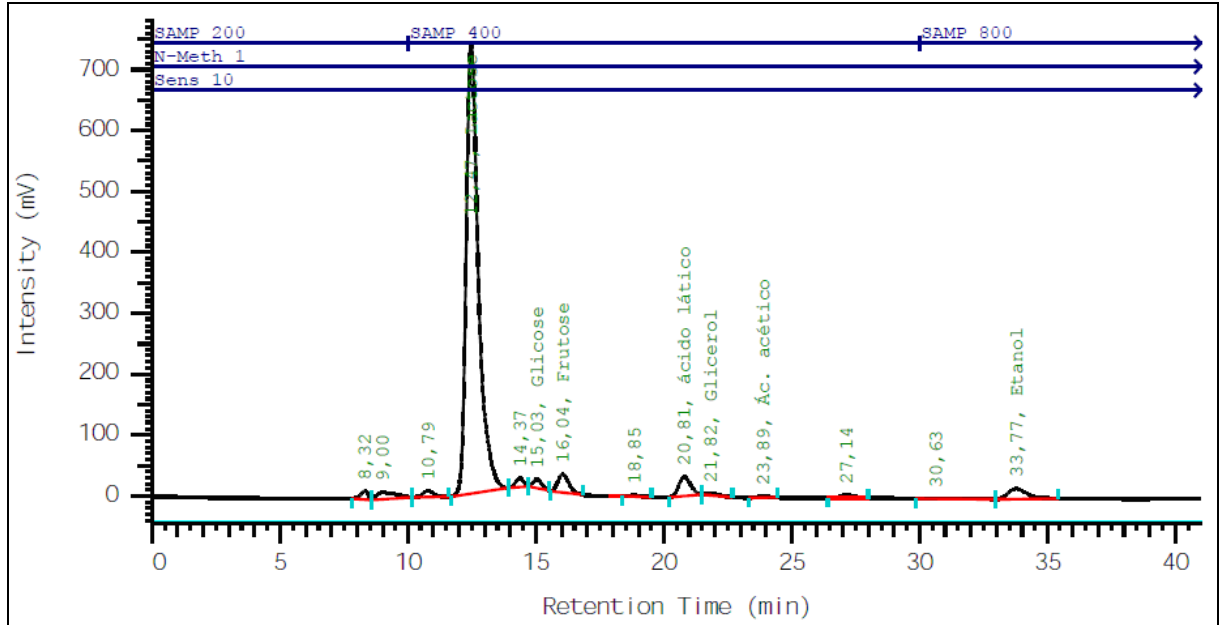
vendas@quilab.com.br

APÊNDICES

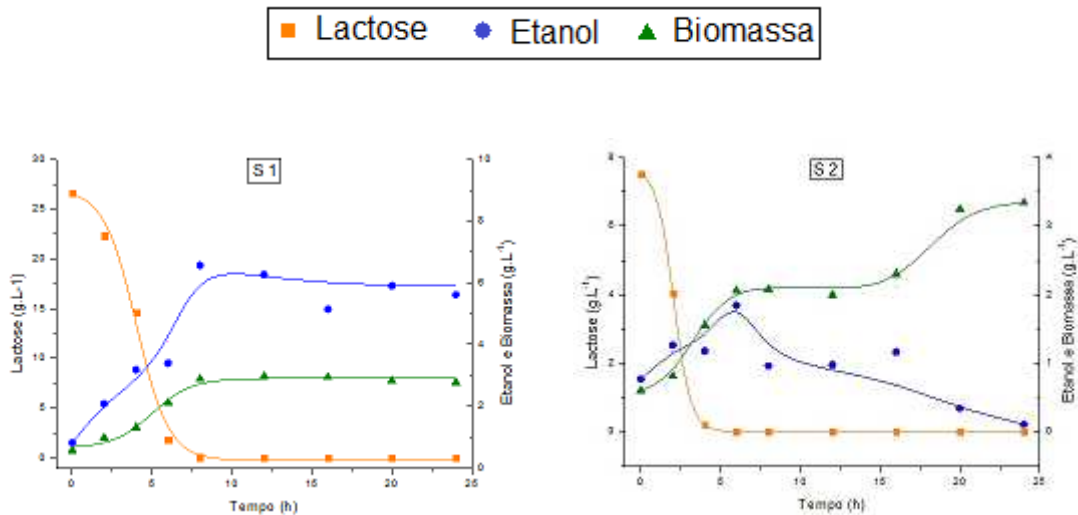
APÊNDICE A: CURVA DE CALIBRAÇÃO

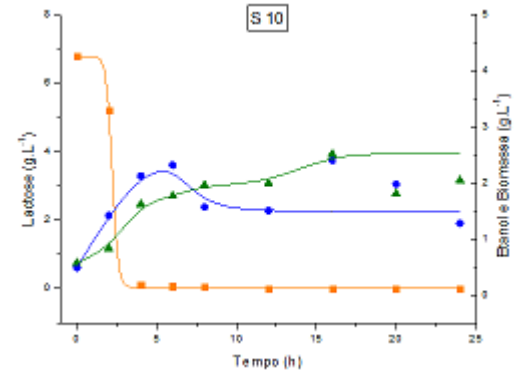
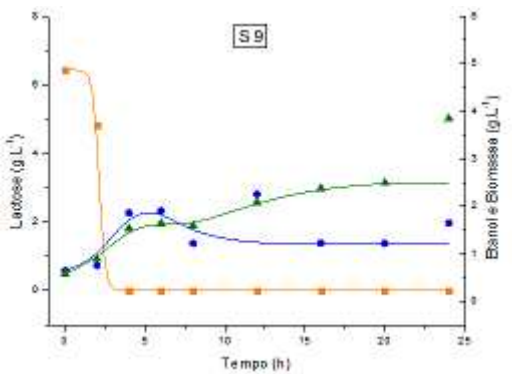
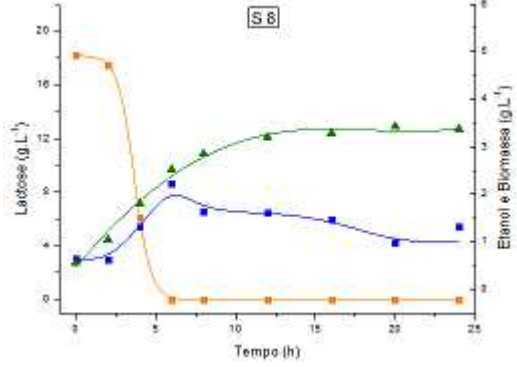
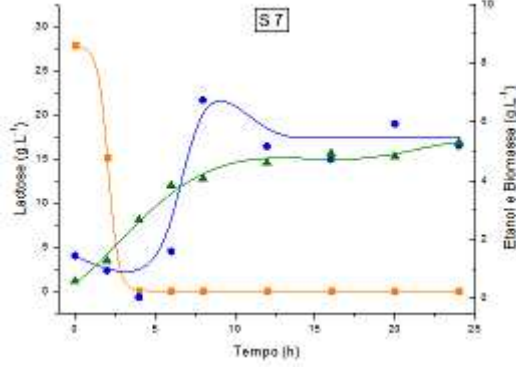
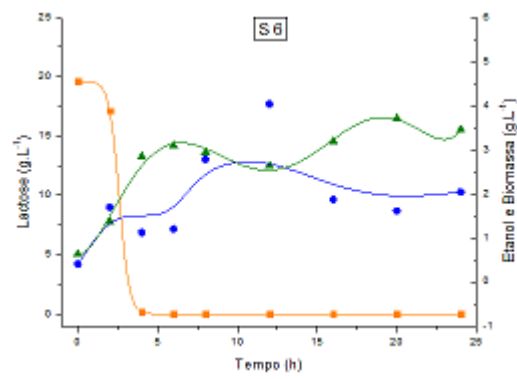
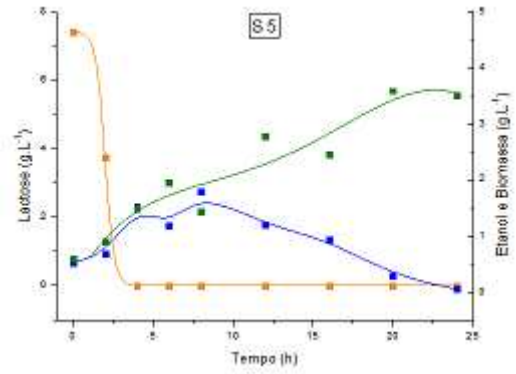
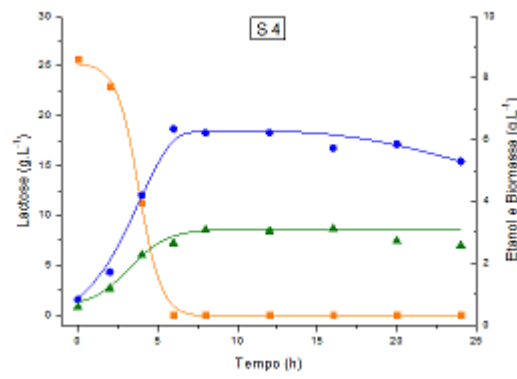
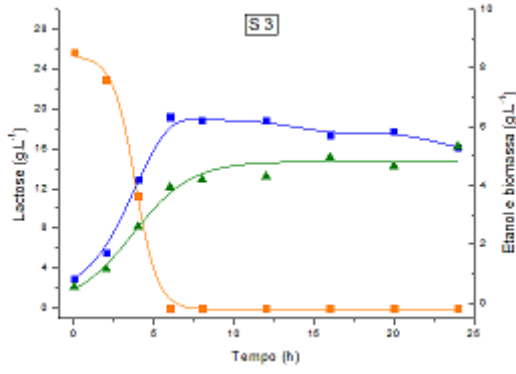


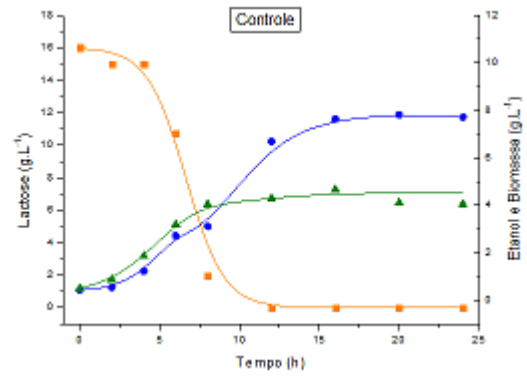
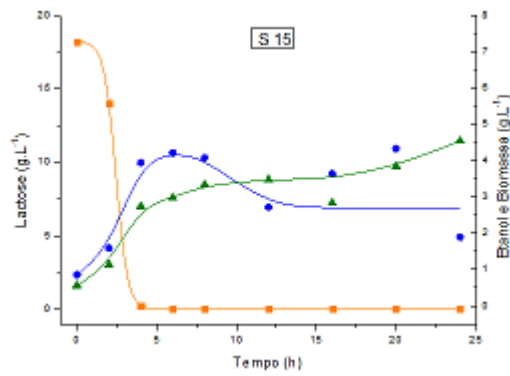
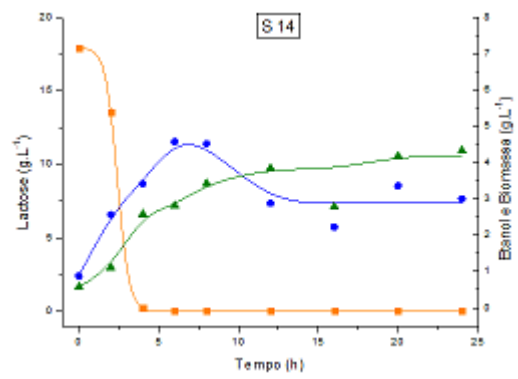
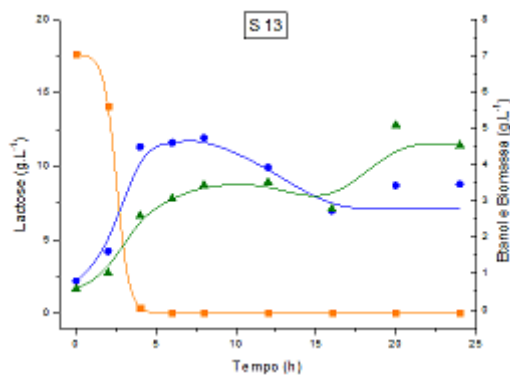
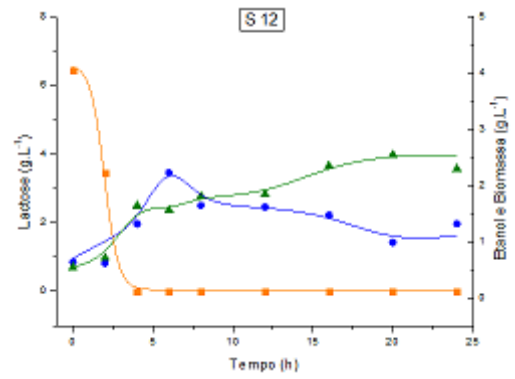
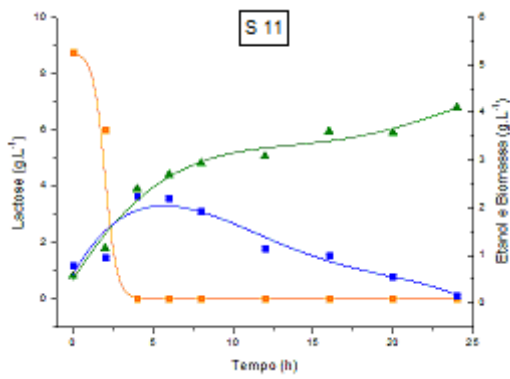
APÊNDICE B: CROMATOGRAMA TÍPICO.



APÊNDICE C: CURVAS DO CONSUMO DA LACTOSE, PRODUÇÃO DE ETANOL, BIOMASSA E β -GALACTOSIDASE NO EXPERIMENTOS.







APÊNDICE D: MÉDIAS E VALORES DE DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS DE CARACTERIZAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE.

*A: ambiente, R: refrigerada e C: congelada.

-Estabilidade com o tempo

	Tempo								
	0 dia			1 dia			8 dias		
Condição	A	R	C	A	R	C	A	R	C
Média	1,632	1,634	1,632	1,121	1,603	1,630	0,500	1,371	1,569
Desvio padrão	+/- 0,0025	+/- 0,0026	+/- 0,0015	+/- 0,0017	+/- 0,0026	+/- 0,002	+/- 0,0041	+/- 0,0025	+/- 0,0025

-Estabilidade com a temperatura

30°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,631	1,632	1,632	1,632
Desvio padrão	+/- 0,0007	+/- 0,0007	+/- 0,0007	0,0014

37°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,631	1,632	1,630	1,631
Desvio padrão	+/- 0,0007	0	+/- 0,0007	0,0014

45°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,630	1,632	1,630	1,519
Desvio padrão	+/- 0,0007	+/- 0,0007	0	+/- 0,0014

55°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,630	1,211	0,420	0,042
Desvio padrão	0	+/- 0,0014	+/- 0,0007	+/- 0,0042

60°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,629	1,160	0,353	0,033
Desvio padrão	+/- 0,0014	+/- 0,0028	+/- 0,046	+/- 0,0014

70°C

Tempo (min)	5	10	30	60
Média	1,580	1,002	0,209	0,004
Desvio padrão	+/- 0,0007	+/- 0,0014	+/- 0,0028	+/- 0,0007

-Estabilidade com o pH

pH	3	4	5	6	7	8
Média	0,083	0,091	0,103	0,519	0,501	0,481
Desvio padrão	+/-0,0028	+/-0,0014	+/-0,0007	+/-0,0014	+/-0,0014	+/-0,0021

-Efeito da Temperatura na atividade enzimática

Temperatura (°C)	30	37	45	55	60	70
Média	1,6305	1,630	1,607	1,210	1,161	1,000
Desvio padrão	+/-0,0007	0	+/-0,0014	+/-0,0007	+/-0,0021	+/-0,0028