

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE COM *Kluyveromyces marxianus***

**CBS 6556 A PARTIR DE SORO DE QUEIJO**

BRAYAM LUIZ BATISTA PERINI

JOINVILLE

2013

BRAYAM LUIZ BATISTA PERINI

**PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE COM *Kluyveromyces marxianus*  
CBS 6556 A PARTIR DE SORO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Andréa Lima dos Santos Schneider.

JOINVILLE

2013

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

P445p Perini, Brayam Luiz Batista  
Produção de  $\beta$ -Galactosidase com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de soro de queijo / Brayam Luiz Batista Perini; orientadora Andréa Lima dos Santos Schneider – Joinville: UNIVILLE, 2013.

76 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1.  $\beta$ -galactosidase. 2. *Kluyveromyces marxianus*. 3. Soro de queijo 4. Milhocina. 5. Intolerância à lactose. Schneider, Andréa Lima dos Santos. (orient.). II. Título.

CDD 660.281

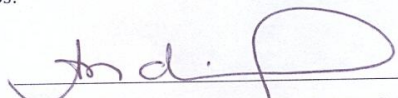
## Termo de Aprovação


“Produção de  $\beta$ -galactosidase com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de soro de queijo”

por

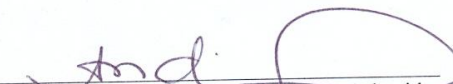
Brayam Luiz Batista Perini

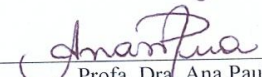
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.


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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
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 Manera  
(UNIPAMPA)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de agosto de 2013.

**Dedicatória**

À minha noiva Mireya, que me incentivou a realizar este trabalho, pelo apoio, compreensão e paciência.

À minha família por todo incentivo e suporte nesta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me guiando, presente em todos momentos da minha vida;

À minha família: Sílvio, Iliete, Sebastiam e Paola, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão na minha ausência;

À minha noiva Mireya, por ser tão prestativa, compreensiva, amorosa, confiante e por todo apoio que me deu nestes anos que estamos juntos.

À Prof<sup>a</sup> Andréa Schneider, pela orientação deste trabalho, por toda a confiança, pelo incentivo, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela amizade e pela parceria;

À Prof<sup>a</sup> Ana Paula Testa Pezzin, pela amizade, pelos valiosos conselhos, pelo apoio e incentivo;

À banca examinadora, professoras Ana Paula Manera e Regina Maria Miranda Gern, pelas contribuições e sugestões;

À Prof<sup>a</sup> Giannini Apati pela ajuda na aplicação do delineamento experimental, pela paciência e pelo carinho;

À minha sogra, Meri, pela ajuda e pela compreensão;

À Michele Garcia, pelos conselhos, pela paciência, pela generosidade e por toda a ajuda;

À Harádia Souza, pelo auxílio no desenvolvimento de toda parte experimental deste trabalho, pela amizade e por toda a ajuda;

Aos meus amigos de laboratório, Maikon, Gustavo e Bruna, pelo valioso auxílio, por toda a ajuda e pelo incentivo;

À Prof<sup>a</sup> Noeli Sellin pela parceria no desenvolvimento de trabalhos paralelos;

À UNIVILLE, em especial à secretaria e todo o corpo docente do Mestrado em Engenharia de Processos, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelo incentivo e por todo suporte prestado;

Aos meus colegas de classe do mestrado Diego, Elton, Juliano, Cláudia, Michele e Bianca, pela amizade e pelo companheirismo.

## RESUMO

A enzima  $\beta$ -galactosidase hidrolisa a lactose presente no leite e derivados lácteos, aos seus monômeros constituintes. A hidrólise da lactose via enzimática vem sendo uma alternativa para as indústrias alimentícias, visto que os açúcares resultantes deste processo, glicose e galactose, são mais solúveis e doces. Por outro lado, a deficiência na produção da  $\beta$ -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 às pessoas com esta deficiência é a ingestão de suplementos de lactase ou a ingestão de produtos lácteos sem lactose. Devido ao aumento da demanda industrial da  $\beta$ -galactosidase e considerando que a maior parte da  $\beta$ -galactosidase consumida no Brasil é importada, há a necessidade de intensificar os estudos de produção da enzima visando a obtenção de processos industrialmente viáveis. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio bem como o efeito da temperatura, da agitação e da aeração sobre a produção da enzima, como sendo soro de queijo, milhocina e temperatura. A fim de otimizar a produção da enzima, foi realizado um planejamento experimental (DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional) tendo como variáveis soro de queijo (100 a 1000 mL L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, milhocina (0 a 18 g L<sup>-1</sup>) como fonte de nitrogênio e temperatura (25 a 45 °C). Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio de cultivo, por 24 h com agitação de 220 min<sup>-1</sup>. Observando os valores de atividade enzimática, assim como os parâmetros significativos apontados no tratamento dos dados, conclui-se que o experimento contendo soro de queijo (820 mL L<sup>-1</sup>) e milhocina (14,36 g L<sup>-1</sup>) conduzidos a 31°C, foi o mais indicado para a produção de  $\beta$ -galactosidase atingindo uma atividade enzimática de 9,8 U mL<sup>-1</sup>. Através da metodologia de superfícies de resposta o modelo para produção da enzima foi estabelecido e validado em triplicata sob as condições de soro de queijo (1000 mL L<sup>-1</sup>), milhocina (18 g L<sup>-1</sup>) e 31°C alcançando um valor médio de atividade enzimática volumétrica 9,1% menor, do que o valor previsto pelo modelo gerado. Nos ensaios seguintes, em nova condição foi avaliada a influência da agitação e da aeração na produção da enzima por cultivo submerso em biorreator Biostat B de 2 L, onde as condições estudadas foram 200 min<sup>-1</sup> e 1,33 vvm (K<sub>La</sub> = 19 h<sup>-1</sup>), e 400 min<sup>-1</sup> e 2,67 vvm (K<sub>La</sub> = 53 h<sup>-1</sup>). Neste estudo verificou-se que a agitação e a aeração, exerceram influência na produção da enzima, sendo a condição mais favorável 400 rpm e 2,67 vvm, respectivamente, atingindo uma atividade enzimática de 6,59 ± 0,20 U mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Kluyveromyces marxianus*,  $\beta$ -galactosidase, soro de queijo, milhocina, agitação, aeração.

## ABSTRACT

The enzyme  $\beta$ -galactosidase produced by microorganisms hydrolyzes sugar present in milk and dairy foods, lactose. The enzymatic hydrolysis of lactose has been an alternative to the food industries, because the result sugars of this process, glucose and galactose, are more soluble and sweet. On the other hand, deficient production of  $\beta$ -galactosidase can cause a syndrome known as lactose intolerance, with symptoms such as bloating, cramping, diarrhea, headaches, among other discomforts. Lactose intolerance is associated with a deficiency on enzyme lactase production, which is an alternative for lactose-intolerant people is ingesting lactase supplements. Due to the increased of the industrial demand of  $\beta$ -galactosidase and most of the  $\beta$ -galactosidase consumed in Brazil is imported, there is a need of to study the agitation and aeration, to obtain a product of high activity. In this context, the aim of this work, was to study the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 using alternative sources of carbon and nitrogen aiming in evaluating the effect of concentrations of substrates, temperature, agitation and aeration on enzyme production. Preliminary results from an experimental design ( $2^{5-1}$ ) showed that Prodex-lac<sup>®</sup> and agitation weren't significant variables. For the purpose of optimizing the enzyme production, a new factorial design was used. The central composite rotational design (CCRD) had cheese whey (100 to 1,000 mL L<sup>-1</sup>) as a carbon source, corn steep liquor (0 to 18 g L<sup>-1</sup>) as an nitrogen source and temperature (25 to 45 °C) as independent variables. The experiments were conducted in Erlenmeyer flasks containing finned 1000 mL, with 300 mL of culture medium for 24 h with agitation of 220 min<sup>-1</sup>. Observing the the values of  $\beta$ -galactosidase activity, as well as significant parameters indicated in the treatment of the data, it's conclude that the experiment containing cheese whey (1,000 mL L<sup>-1</sup>) and corn steep liquor (14.36 g L<sup>-1</sup>) carried out at 31°C, was the most suitable for the production of  $\beta$ -galactosidase obtaining 9.8 U mL<sup>-1</sup> for the enzymatic activity. Through response surface methodology, the optimal condition for enzyme production has been established and validated in triplicate under the conditions cheese whey (1000 mL L<sup>-1</sup>) and corn steep liquor (18 g L<sup>-1</sup>) and 31 °C reaching an average volumetric activity enzyme, 9.1% lower than the value predicted by the model generated. In the following tests, under the same condition the influence of the agitation and the aeration was evaluated in the enzyme production by submerged fermentation in Biostat B fermenter of 2 L, the study conditions were: 200 min<sup>-1</sup> together 1.33 vvm ( $K_{La} = 19 \text{ h}^{-1}$ ), and 400 min<sup>-1</sup> together 2.67 vvm ( $K_{La} = 53 \text{ h}^{-1}$ ). In this study the agitation and aeration, influenced in the  $\beta$ -galactosidase production, and the favorable condition was 400 rpm and 2.67 vvm, respectively, obtaining  $6.59 \pm 0.20 \text{ U mL}^{-1}$  for the enzymatic activity.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*,  $\beta$ -galactosidase, cheese whey, corn steep liquor, agitation, aeration.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula da Lactose .....	16
Figura 2. Reação de Hidrólise da Lactose.....	17
Figura 3. Estrutura do substrato ONPG (a) e hidrólise do ONPG em galactose e O-NP	21
Figura 4. Fluxograma de obtenção do soro a partir da produção de queijo.....	29
Figura 5. Fluxograma de coleta e preparo das amostras.....	37
Figura 6. Biorreator utilizado no processo de cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 visando a produção de lactase.....	39
Figura 7. Curvas do consumo de lactose e produção de enzima e biomassa no experimento 4 cultivado em 31°C e 220 min <sup>-1</sup> , contendo lactose (39,43 g L <sup>-1</sup> ) e milhocina (14,36 g L <sup>-1</sup> )...	48
Figura 8. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima (U mL <sup>-1</sup> ) em função da concentração de milhocina (g L <sup>-1</sup> ) e da concentração de soro de queijo (mL L <sup>-1</sup> ).....	49
Figura 9. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima (U mL <sup>-1</sup> ) em função da concentração de soro de queijo (mL L <sup>-1</sup> ) e da temperatura (°C).....	50
Figura 10. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima (U mL <sup>-1</sup> ) em função da temperatura (°C) e da concentração de milhocina (g L <sup>-1</sup> ).....	50
Figura 11. Valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para atividade enzimática máxima (U mL <sup>-1</sup> ) .....	51
Figura 12. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática específica (U g <sup>-1</sup> ) em função da temperatura (°C) e da concentração de soro de queijo (mL L <sup>-1</sup> ).....	53
Figura 13. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática específica (U g <sup>-1</sup> ) em função da temperatura (°C) e da concentração de milhocina (g L <sup>-1</sup> ).....	54
Figura 14. Valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para atividade enzimática específica (U g <sup>-1</sup> ).....	54
Figura 15. Superfície de resposta e diagrama de contorno da produtividade máxima em células (L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) em função da concentração de milhocina (g L <sup>-1</sup> ) e da concentração de soro de queijo (mL L <sup>-1</sup> ).....	56
Figura 16. Perfil da fermentação em triplicata da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 na condição ótima para atividade enzimática volumétrica (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c) e atividade enzimática específica (d).....	57

Figura 17. Acompanhamento da produção de  $\beta$ -galactosidase para condição  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $2 \text{ L min}^{-1}$  para atividade enzimática volumétrica (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c), oxigênio dissolvido (d), produção de etanol (e) e atividade enzimática específica (f)..... 59

Figura 18. Acompanhamento da produção de  $\beta$ -galactosidase para condição  $400 \text{ min}^{-1}$  e  $4 \text{ L min}^{-1}$  para atividade enzimática volumétrica (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c), oxigênio dissolvido (d), produção de etanol (e) e atividade enzimática específica (f)..... 60

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação de enzima de acordo com o tipo de reação.....	19
Tabela 2. Micro-organismos produtores de $\beta$ -galactosidase classificados como GRAS.....	22
Tabela 3. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a produção de $\beta$ -galactosidase a partir de soro de queijo.....	31
Tabela 4. Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no delineamento experimental e DCCR .....	36
Tabela 5. Matriz DCCR com 14 ensaios e ponto central em triplicata.....	36
Tabela 6. Resultados dos parâmetros testados .....	47
Tabela 7. Efeitos estimados e análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a atividade enzimática volumétrica.....	48
Tabela 8. Efeitos estimados e análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a atividade enzimática específica.....	52
Tabela 9. Comparativo de aeração, agitação e atividade enzimática volumétrica entre as condições de cultivo em biorreator: (a), (b), 1, 2, 3, 4 e 5.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AE: atividade enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )
- AET<sub>0</sub>: atividade enzimática inicial ( $\text{U mL}^{-1}$ )
- AET<sub>esp</sub>: atividade enzimática específica ( $\text{U g}^{-1}$ )
- AET<sub>max</sub>: atividade enzimática máxima ( $\text{U mL}^{-1}$ )
- ATCC: American Type Culture Collection
- C\*: concentrações de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar
- CBS: Centraalbureau Voon Schimmelcultures
- C<sub>L</sub>: concentrações de oxigênio no meio
- DBO: demanda bioquímica de oxigênio
- DCCR: Delineamento composto central rotacional
- DNS: 3,5 ácido dinitrosalicílico
- DQO: demanda química 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*
- K<sub>L</sub>a: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
- L: caminho ótico (cm)
- OD: Oxigênio dissolvido ( $\text{g L}^{-1}$ )
- O-NP: *o*-nitrofenil
- ONPG: *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
- PA: reagente com pureza para análise
- P<sub>Xmax</sub>: produtividade máxima em células ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
- S<sub>0</sub>: concentração inicial de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ )
- S<sub>f</sub>: concentração de substrato onde concentração celular é máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )
- t: tempo de cultivo (h)
- V<sub>a</sub>: volume da amostra (mL)
- V<sub>f</sub>: volume final do teste (mL)
- vvm: volume de meio por volume de ar por minuto
- X: concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ )
- X': concentração celular correspondente à AET<sub>max</sub> ( $\text{g L}^{-1}$ )
- X<sub>0</sub>: concentração celular inicial ( $\text{g L}^{-1}$ )

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

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

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

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

$\Delta A$ : diferença da absorvância entre o branco e a amostra

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

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
OBJETIVOS .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1 LACTOSE .....	16
2.1.1 Hidrólise .....	17
2.1.2 Intolerância .....	18
2.2 ENZIMAS .....	18
2.2.1 Enzima $\beta$ -galactosidase .....	20
2.2.2 Aplicação da $\beta$ -galactosidase .....	20
2.2.3 Produção de $\beta$ -galactosidase .....	21
2.2.4 Influência do pH.....	23
2.2.5 Influência da Temperatura.....	23
2.2.6 Influência da agitação e da aeração em processos fermentativos .....	24
2.3 <i>Kluyveromyces</i> .....	25
2.3.1 Metabolismo .....	26
2.3.2 Crescimento Celular .....	27
2.4 FONTE DE NUTRIENTES .....	28
2.4.1 Soro de Queijo .....	28
2.4.2 Milhocina.....	30
2.5 ESTADO DA ARTE.....	31
3. METODOLOGIA .....	35
3.1 MICRO-ORGANISMO .....	35
3.1.1 Ativação da Cepa .....	35
3.2 SUBSTRATOS .....	35
3.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	36
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO – ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS .....	37
3.5 VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR.....	38
3.6 ENSAIOS EM BIORREATOR .....	38
3.6.1 Condições de Cultivo em Biorreator.....	38
3.6.2 Descrição do Biorreator.....	39
3.6.3 Preparo do Biorreator e do Meio de Cultivo .....	40
3.7 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA.....	40
3.7.1 Determinação da Biomassa.....	40

3.7.2 Determinação de Teor de Lactose.....	41
3.7.3 Determinação da Atividade Enzimática .....	41
3.7.4 Determinação do Etanol .....	42
3.8 METODOLOGIA DE CÁLCULO .....	42
3.8.1 Atividade Enzimática Volumétrica .....	42
3.8.2 Atividade Enzimática Específica .....	43
3.8.3 Fatores de Conversão .....	44
3.8.4 Produtividade Máxima em Células .....	44
3.8.5 Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio .....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) .....	46
4.2 ESTUDO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	56
4.3 ENSAIOS EM BIORREATOR .....	58
CONCLUSÃO .....	64
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	66
REFERÊNCIAS .....	67
ANEXO 1 – CURVA DE CORRELAÇÃO ABSORBÂNCIA X MASSA SECA DE CÉLULAS DE <i>K. marxianus</i> .....	74
ANEXO 2 – CURVAS DO CONSUMO DE LACTOSE, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E $\beta$ - GALACTOSIDASE NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR.....	75

## INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos científicos estão sendo desenvolvidos com o intuito de apresentar opções para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, a fim de otimizar as condições de cultivo para o aumento da produtividade, visando a aplicação industrial.

Sabe-se que a  $\beta$ -galactosidase é capaz de catalisar o processo de hidrólise da lactose presente no leite e seus derivados, gerando dois produtos de menor cadeia: glicose e galactose. Na área industrial, sua ação do ponto de vista tecnológico, contribui com a melhora na solubilidade e digestibilidade de leites e derivados lácteos, além de proporcionar alimentos com baixos teores de lactose.

A lactase, como também é conhecida esta enzima, é produzida naturalmente pelo intestino dos seres humanos, sendo responsável pela quebra das moléculas de lactose, possibilitando a digestão deste carboidrato. Diversas pessoas possuem deficiência na produção desta enzima, sendo esta uma síndrome conhecida como intolerância à lactose, de modo que não havendo a hidrólise, a lactose é fermentada por bactérias existentes no intestino, gerando ácidos graxos, gás carbônico e gás hidrogênio, que podem resultar em cólicas, diarreia, dores de cabeça entre outros sintomas.

Uma alternativa para os indivíduos intolerantes à lactose, é o tratamento da lactose presente no leite e seus derivados pela ação da  $\beta$ -galactosidase, tornando assim o alimento adequado para esses indivíduos. No entanto, o custo para obtenção destes produtos no Brasil é elevado, pois esta enzima somente é produzida no exterior, fato este que dificulta o acesso das pessoas intolerantes a estes alimentos tratados pela ação da lactase. Segundo Brasil (2012) as importações brasileiras de enzimas industriais, somaram USD 119 milhões no ano de 2011, apresentando um crescimento três vezes maior do que as importações obtidas no período de 2007 à 2011.

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam facilidade em sintetizar  $\beta$ -galactosidase a partir de fontes de carbono e nitrogênio. Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a utilização das espécies *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, reportando que as que têm apresentado maior facilidade em assimilar carbono e nitrogênio de fontes alternativas, são as do gênero *Kluyveromyces marxianus*.

No que se refere à produção da enzima, o estudo das melhores condições do meio de cultivo é importante, pois exerce grande influência no rendimento final. Quando se trata do uso de fontes comerciais de carbono e nitrogênio, como a lactose e a peptona, o custo com



matérias primas pode chegar a 75% do total do processo biotecnológico, enquanto que, com o uso de fontes alternativas, este valor pode ser consideravelmente reduzido.

Dentre os subprodutos disponíveis em elevadas quantidades, com elevados potenciais poluidores, encontram-se os resíduos das indústrias laticínias e queijarias. Estudos anteriores deste grupo de pesquisa, indicaram resultados positivos para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase a partir de *Kluyveromyces marxianus* cultivada em shaker com soro de queijo como fonte de carbono e milhocina (água de maceração de milho) como fonte de nitrogênio, compondo o meio. Embora a agitação não tenha sido considerada um parâmetro significativo pelos estudos preliminares, neste trabalho, este parâmetro foi considerado importante na obtenção de maiores valores de atividade da enzima.

Para continuidade dessas pesquisas verificou-se a necessidade do estudo das condições ótimas para produção de  $\beta$ -galactosidase, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Em um segundo momento, a condição ótima foi validada em triplicata, para que posteriormente, pudesse ser empregada em escala ampliada, variando as taxas de aeração em busca da maior produção da enzima  $\beta$ -galactosidase.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Estudar as melhores condições de produção de  $\beta$ -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio.

### Objetivos Específicos

- Estudar a influência da concentração de soro de queijo como fonte alternativa de carbono, milhocina como fonte alternativa de nitrogênio e temperatura na produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 através de um delineamento experimental;
- Validar os resultados do delineamento experimental;
- Verificar a influência da disponibilidade de oxigênio no meio, na produção de  $\beta$ -galactosidase, através do cultivo em bioreator.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Lactose

A lactose, constituída por uma molécula da  $\beta$ -D-galactose e uma molécula da  $\alpha$ -D-glicose unidas por uma ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica. Este dissacarídeo é considerado um açúcar redutor, porque o grupo anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, ficando livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). A molécula da lactose esta representada na Figura 1.

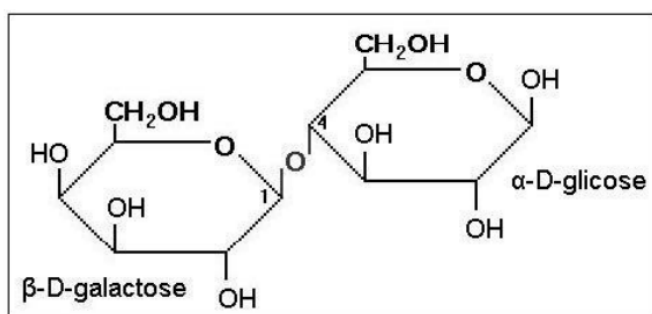


Figura 1. Molécula da Lactose

Fonte: CAMPBELL, 2000.

Alto nível de lactose é encontrado no leite das espécies de mamíferos, sendo que no leite humano a concentração de lactose é de aproximadamente  $72 \text{ g L}^{-1}$ , cerca de 53% mais concentrado do que a encontrada no leite de vacas (LOMER *et al.*, 2008). Quando comparada a outros açúcares como a glicose e a galactose, fica evidenciado o baixo poder adoçante, além de ter como característica a baixa solubilidade em água (15 a 20%) (TRONCO, 2003).

As aplicações deste açúcar compreendem um gama de produtos na indústria alimentícia a base de leite e seus derivados. A utilização da lactose em produtos assados promove a reação de Maillard, melhorando a coloração do alimento (MATTANNA, 2011), sendo este um importante fator agregado à produtos alimentícios (QUINTAS *et al.*, 2007).

A utilização da lactose pela microflora intestinal resulta na produção de ácido lático e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento da microflora intestinal lactofílica desejável, inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas (TRONCO, 2003).

### 2.1.1 Hidrólise

A reação de hidrólise da lactose, realizada na mucosa intestinal, é necessária para a digestão deste açúcar, sendo que a enzima responsável pela quebra da molécula de lactose em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, é a  $\beta$ -galactosidase (CAMPBELL, 2000), conforme demonstrado na Figura 2. Também classificados como hexoses, estes dois monossacarídeos formados, são mais facilmente absorvidos pelo organismo (BEYER, 2002).

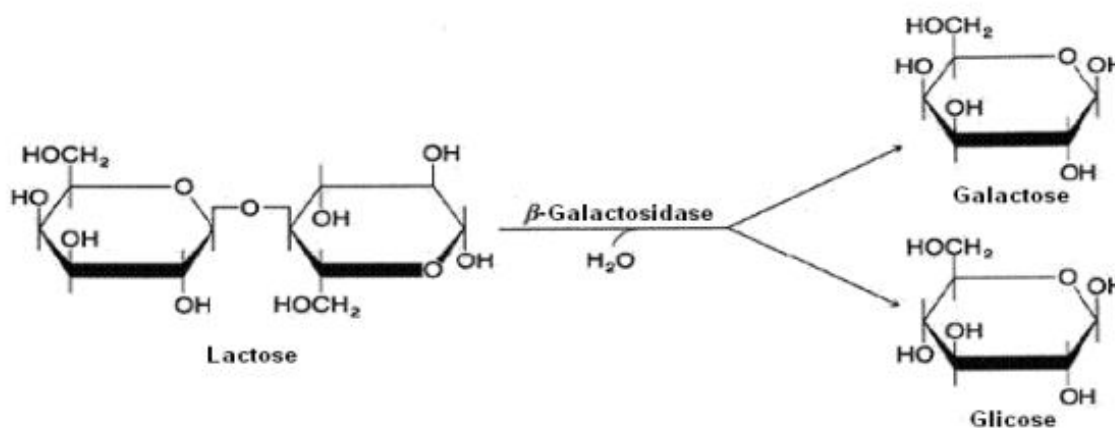


Figura 2. Reação de Hidrólise da Lactose

Fonte: VIEIRA, 2009.

Segundo Swagerty Jr *et al.* (2002) a enzima  $\beta$ -galactosidase, ou lactase, está localizada na superfície chamada de borda em escova, do intestino delgado. A enzima hidrolisa lactose em glicose e galactose, para serem absorvidos pela membrana celular do intestino, os enterócitos, de modo que a atividade enzimática e o tempo de passagem pela mucosa intestinal são importantes para a absorção adequada.

Do ponto de vista industrial, a reação de hidrólise catalisada pela enzima é um processo promissor na indústria de alimentos, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar dos produtos (VINHAL, 2001). Desta forma, possibilita a fabricação de novos produtos isentos ou com teores reduzidos de lactose, além de prevenir a cristalização em produtos fermentados (SANTIAGO *et al.*, 2004).

O processo de hidrólise da lactose pode ser realizado por dois métodos: o ácido e o enzimático. O método ácido envolve soluções diluídas de ácidos fortes e condições severas de

pH e temperatura, fatos estes que reduzem a aplicação comercial, enquanto que o método enzimático envolve a enzima lactase, podendo ser aplicado no leite sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria prima (LADERO *et al.*, 2000).

### 2.1.2 Intolerância

O termo intolerância à lactose refere-se a incapacidade de digestão da lactose, motivada pela falta ou deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase no sistema digestivo (SWAGERTY JR *et al.*, 2002). Nestes casos, não havendo a hidrólise em glicose e galactose, a lactose permanece no intestino e é fermentada por bactérias anaeróbias formando ácidos de cadeia curta, como o ácido láctico, ácidos graxos e gases como hidrogênio, metano e dióxido de carbono (BEYER, 2002). Estes gases formados podem resultar em flatulência, cólicas, diarreia, inchaço, dor de cabeça, entre outros sintomas (TÉO, 2002).

Segundo Trevisan (2008) esta é a reação adversa a carboidrato mais comum e afeta pessoas de todas as faixas etárias. Alguns estudos avaliaram a ocorrência desta síndrome sob a população mundial, sendo que Muniz *et al.* (2010) observou a incidência em 60% do povo brasileiro e em 70% da população mundial. Dados mais antigos de Ruzynyk e Still (2001) constataram que entre os africanos, árabes e chineses, a incidência era de 80%.

Uma alternativa para estas pessoas, deficientes de enzima lactase no intestino, é reduzir ou eliminar a ingestão de produtos lácteos. Porém, segundo Montalto *et al.* (2006), estes alimentos são fontes de nutrientes como cálcio e vitamina B3, sendo que, quando estes minerais e vitaminas não são ingeridos, pode ocasionar consequências graves como diminuição da densidade mineral óssea.

Considerando o acima exposto, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de produzir alimentos com baixo teor de lactose (TREVISAN, 2008; MATTANNA, 2011), para que possam futuramente ser produzidos por empresas alimentícias e destinados às pessoas portadoras da síndrome de intolerância à lactose.

## 2.2 Enzimas

As enzimas são formadas dentro da célula dos seres vivos, agindo como catalisadores de reações bioquímicas. São moléculas de proteínas, que tornam processos bioquímicos mais eficientes, controlam algumas funções vitais como processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células (LEHNINGER, 1997).

Outro potencial de utilidade das enzimas, além do alto poder catalítico, é devido ao seu alto grau de especificidade (LEHNINGER, 1997). Sendo assim, ao catalisar uma reação de conversão de substrato em produto, as enzimas são extremamente específicas, devido à excepcional seletividade e normalmente uma enzima catalisa apenas um só tipo de reação química (BON *et al.*, 2008).

Segundo Lehninger (1997), para a produção de uma determinada enzima, fatores como pH, temperatura e estabilidade devem ser considerados. As enzimas estão disponíveis de forma natural em tecidos animais e vegetais, ou podem ser sintetizadas por meio de cultivo microbiológico, de onde, podem ser extraídas. Segundo Hernalsteens (2006), as enzimas oriundas de cultivos microbianos são mais aplicadas e difundidas, por apresentar baixo custo de obtenção.

As enzimas são usualmente classificadas e nomeadas de acordo com a reação química que elas catalisam, sendo que a União Internacional de Bioquímica Molecular (IUBMB) adotou um esquema para a classificação sistemática funcional e nomenclatura de enzimas, conforme demonstrado na Tabela 1:

Tabela 1: Classificação de enzima de acordo com o tipo de reação

Classificação	Tipo de reação catalisada
Oxidoreduases	Reações de oxidação-redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólises
Liasas	Eliminação de grupos para formar duplas ligações
Isomerasas	Isomerização
Ligases	Formação de ligações com hidrólise de ATP

Fonte: Adaptado de SOUZA, 2010.

Dentre as diversas aplicações destas proteínas, um grande destaque está no uso das enzimas em processos industriais de alimentos (Hasan *et al.*, 2006), além de outras possibilidades, como por exemplo a aplicação nos curtumes em diversas etapas do processamento do couro (Guterres *et al.*, 2009).

### 2.2.1 Enzima $\beta$ -galactosidase

A enzima  $\beta$ -galactosidase, conhecida como lactase, é codificada pela Enzyme Commission pelo código E.C. 3.2.1.23, também denominada  $\beta$ -D-galactosídeo galactohidrolase (RICHMOND *et al.*, 1981). Esta enzima é classificada como hidrolase, acelerando o processo de hidrólise da molécula do açúcar lactose, gerando duas hexoses, a glicose e a galactose (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Segundo Richmond *et al.* (1981) a lactase pode ser encontrada nos vegetais, como amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs; e em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta, além de poder ser produzida por micro-organismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras.

### 2.2.2 Aplicação da $\beta$ -galactosidase

Partindo da ideia de que o avanço em novas tecnologias aplicadas a processos visa promover o aumento na qualidade dos alimentos para atender os consumidores, a indústria de alimentos passou a introduzir novas técnicas de processamento, envolvendo enzimas capazes de tornar o produto final apto ao consumo de toda a população (MARIOTTI *et al.*, 2008).

A utilização de micro-organismos para a produção de  $\beta$ -galactosidase tem atraído a indústria alimentícia (ALVES, 2008), uma vez que a enzima pode ser empregada na hidrólise da lactose do leite, visando obter um produto com baixo teor de lactose, ideal para consumidores intolerantes a este açúcar. Um exemplo do emprego desta enzima para obtenção de produtos derivados do leite com baixo teor de lactose, é a produção de requeijão (TREVISAN, 2008). Além deste aspecto, o emprego da enzima na fabricação de doce de leite proporciona uma melhora da textura do produto, devido o fato de se evitar a cristalização da lactose (KLEIN, 2010). Por outro lado, a indústria farmacêutica desenvolve produtos contendo lactase, capazes de garantir a reposição de  $\beta$ -galactosidase para suprir a deficiência dos organismos (MONTALTO *et al.*, 2006).

Além da aplicação para hidrolisar a lactose, a lactase pode agir sob outra via química de modo a transgalactosar a galactose, gerando galacto-oligossacarídeos – GOS (KLEIN *et al.*, 2011). Os GOS são formados por lactose e unidades de galactose e são compostos não digestíveis e não degradados pelas enzimas digestivas humanas, sendo hidrolisados anaerobicamente a pequenos oligômeros pelas bifidobactérias no cólon, gerando efeitos

saudáveis para órgãos como o intestino e o fígado, pois promovem o crescimento da microflora intestinal (GAUR *et al.*, 2006; MARTINS e BURKERT, 2009). Cabe salientar ainda que os GOS, ao facilitarem a digestão devido a ação das bifidobactérias, produzem ácidos graxos de cadeia curta que estimulam a absorção de cálcio, contribuindo com o aumento da mineralização óssea e a resistência contra fraturas (BROUNS e VERMER, 2000; MARTINS e BURKERT, 2009).

Para determinação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, um teste colorimétrico pode ser aplicado, a partir da reação de hidrólise da enzima com o substrato o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), que é um líquido incolor e após a reação de hidrólise produz galactose (incolor) e o o-nitrofenol (O-NP) que apresenta coloração amarela (NICHELE *et al.*, 2011). A Figura 3 mostra a reação de hidrólise do ONPG pela enzima  $\beta$ -galactosidase.

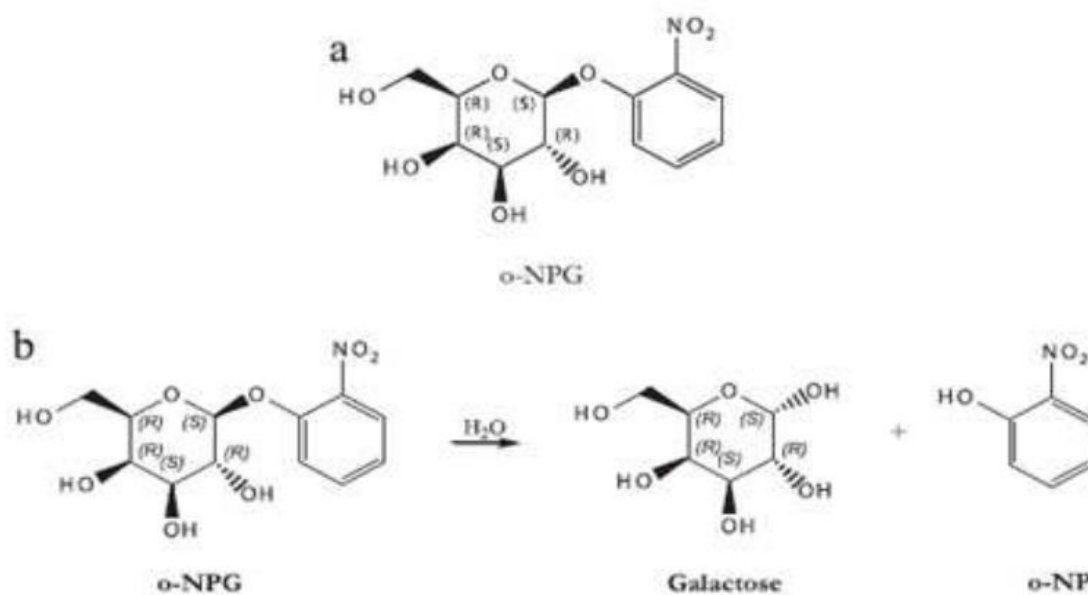


Figura 3. Estrutura do substrato ONPG (a) e hidrólise do ONPG em galactose e O-NP.

Fonte: NICHELE *et al.*, 2011.

### 2.2.3 Produção de $\beta$ -galactosidase

A  $\beta$ -galactosidase encontrada em alguns frutos e órgãos de animais tem elevado custo de extração e baixo rendimento, por apresentar baixa concentração de enzima. Em contrapartida, a partir de fungos e leveduras e com a utilização de substrato e nutrientes adequados, os cultivos microbianos são a principal forma de obtenção da enzima lactase (MONTALTO *et al.*, 2006). Geralmente as fontes de carbono são açúcares como sacarose,



glicose ou lactose, além da fonte de nitrogênio e outros nutrientes em menor quantidade que compõem o meio de cultivo (MANERA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2011)

Durante o cultivo submerso, o micro-organismo é inoculado passando a se desenvolver, sendo que a quantidade de enzima produzida depende de fatores como composição do meio de cultura, temperatura de cultivo, pH do meio, agitação e concentração de oxigênio dissolvido no meio (PAPAGIANNI, 2004; ALVES, 2008).

Segundo Lane e Morrissey (2010), as indústrias têm optado por micro-organismos que não tragam riscos à saúde, de modo que se utilize apenas os contidos na classificação do departamento do governo dos Estados Unidos, FDA (*Food and Drug Administration*) como GRAS (*Generally Recognized As Safe* – geralmente reconhecidos como seguros). Segundo a literatura, existe uma grande variedade de micro-organismos que apresentam a habilidade de produzir  $\beta$ -galactosidase, no entanto apenas alguns deles são classificados como GRAS. A seguir na Tabela 2, são apresentados alguns exemplos de micro-organismos, produtores de  $\beta$ -galactosidase segundo a literatura, considerados GRAS.

Tabela 2: Micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase classificados como GRAS

<b>Tipo</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>Referência</b>
Bactéria	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	VASILJEVIC e JELEN (2001).
Levedura	<i>Kluyveromyces lactis</i>	FREITAS (2013), LIMA <i>et al.</i> (2011), MANERA <i>et al.</i> (2008), KIM <i>et al.</i> (2004), NUMANOGLU e SUNGUR (2004), CARMINATTI (2001).
Levedura	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	BRAGA <i>et al.</i> (2012), MANERA <i>et al.</i> (2011), SCHOLZ (2011), SANTIAGO <i>et al.</i> (2004), FURLAN <i>et al.</i> (2001), SCHNEIDER <i>et al.</i> (2001), RECH <i>et al.</i> (1999).
Fungos Filamentosos	<i>Aspergillus niger</i>	DOMINGUES <i>et al.</i> (2005).

Como pode ser observado na Tabela 2, dentre os micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase e que não trazem riscos a saúde, classificados como GRAS, destacam-se as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que oferecem outras vantagens como: bom rendimento

de crescimento, crescimento em ampla faixa de temperatura e alta velocidade de crescimento (ALVES, 2008).

O gênero *Kluyveromyces marxianus* apresenta potencial industrial por fermentar a lactose de resíduos agroindustriais, como soro de queijo e soro de leite (SCHOLZ, 2011; MANERA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2012), sendo que quando lactose é utilizada como substrato, a atividade de  $\beta$ -galactosidase é mais alta do que quando são utilizadas cepas de outras leveduras (RECH, 1998).

#### 2.2.4 Influência do pH

Dentre os fatores que afetam a atividade enzimática, destaca-se a concentração de  $H^+$ (pH) que está associada à estrutura tridimensional da enzima. A partir da diminuição ou aumento do pH no meio reativo, é possível que ocorra alteração na estrutura da enzima, levando-a à desnaturação. Assim sendo, para cada enzima, haverá uma estreita faixa de pH onde a atividade desta é mais adequada, de modo que esta condição é conhecida como pH ótimo (KIELING, 2002).

Segundo Klein (2010) as  $\beta$ -galactosidases produzidas por bactérias e leveduras possuem pH ótimo em uma faixa próxima da neutralidade, de 6,0 à 8,0, enquanto que as originadas de fungos filamentosos possuem melhor rendimento em faixa de pH ácido, variando entre 2,5 à 4,5. Dados da literatura sugerem que a  $\beta$ -galactosidase obtida empregando *Kluyveromyces marxianus* possui atividade enzimática máxima quando o pH situa-se entre 6,5 e 7,0 (SCHOLZ, 2011).

#### 2.2.5 Influência da Temperatura

Um fator de grande relevância na velocidade da maioria das reações químicas é a temperatura, visto que está diretamente relacionada com a agitação das moléculas, de modo que baixas temperaturas desfavorecem, pela falta de energia suficiente, a ocorrência de uma reação química (KIELING, 2002). Por outro lado, as reações envolvendo enzimas podem apresentar efeito inverso como consequência do aumento da temperatura. Assim, pode-se visualizar uma diminuição da velocidade de reação, e dependendo do aumento da temperatura, é possível levar à desnaturação de enzima, fato este que comprova que, maiores

resultados na atividade da enzima em virtude do aumento da temperatura, são limitados pela estabilidade da proteína.

Segundo a literatura, as leveduras produtoras  $\beta$ -galactosidase apresentam boa estabilidade térmica, sendo que os testes de Rajoka *et al.* (2003) e Braga *et al.* (2011) resultaram em estabilidade térmica a 60°C e 30°C, respectivamente, quando utilizadas diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus*.

#### 2.2.6 Influência da Agitação e da Aeração em Processos Fermentativos

O estudo das condições de operação é de vital importância para compreensão de um processo fermentativo. Para as culturas aeróbias, tão importante quanto a composição do meio de cultivo, a temperatura e o pH e a quantidade de oxigênio dissolvido, que em uma concentração apropriada proporcionará uma operação eficiente do reator (RECH, 1998). Para manutenção do metabolismo celular, este substrato torna-se essencial e uma transferência contínua de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida faz-se necessária, devido a baixa solubilidade deste gás em soluções aquosas.

O fornecimento de oxigênio em processos de fermentação pode acontecer por meio da agitação e de aeração, contribuindo assim com o propósito de atingir as atividades metabólicas, além de manter os micro-organismos em suspensão (WANG *et al.*, 1979).

Segundo Alves (2008) *apud* Borzani *et al.* (2005), a transferência de oxigênio durante um processo fermentativo ocorre em três partes distintas:

- Transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida (meio de cultura), sendo que esta depende da interface gás-líquido ao redor das bolhas de ar;
- Distribuição do oxigênio até as células que depende de uma suficiente agitação do meio de cultura;
- Consumo de oxigênio pelas células: resistência pela película existente na superfície das células e, também, pela velocidade da reação de absorção do oxigênio.

Segundo Barberis e Segovia (1997), a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, em reator sob agitação de 800  $\text{min}^{-1}$  e 3,0 vvm, foi influenciada pela aeração do meio, de modo que o micro-organismo consumiu o substrato e utilizou o oxigênio dissolvido no meio, aumentando a atividade enzimática.

O aumento da taxa de transferência de oxigênio proporcionada pela aeração, em cultivos de espécies de *Kluyveromyces*, apresenta um efeito positivo no crescimento e no comportamento da levedura, porém em taxas elevadas, a diminuição na concentração celular é observada (PINHEIRO *et al.*, 2000). Em outros estudos Pinheiro *et al.* (2003), observaram que na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, a 330  $\text{min}^{-1}$  e 1,0 vvm, o aumento da concentração de oxigênio não provocava efeito tóxico e pode ser utilizado como parâmetro de otimização da atividade enzimática.

Experimentos de Schneider *et al.* (2001) com objetivo de otimizar a produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Kluyveromyces marxianus* CDB 002, verificaram que a relação aeração/agitação exerceu influência no rendimento da atividade enzimática, obtendo as melhores condições com uma agitação de 700 rpm e uma aeração de 0,66 vvm, de modo que um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio de 60  $\text{h}^{-1}$  levou a maior produção de enzima.

A influência da agitação e da aeração foi estudada sobre a produção de inulinase em cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, sendo que em baixos níveis, estas variáveis foram consideradas importantes, enquanto que em altos níveis, a agitação apresentou maior importância na atividade enzimática. Segundo Silva-Santisteban e Maugeri (2005), a diminuição na produção de inulinase quando a agitação ultrapassava os 450  $\text{min}^{-1}$ , mesmo com o incremento de oxigênio, estava acompanhada de uma queda na concentração celular, possivelmente, influenciada pelo fenômeno de estresse mecânico. A condição ótima observada foi com agitação de 450  $\text{min}^{-1}$ , em conjunto de aeração de 1,0 vvm.

### 2.3 *Kluyveromyces*

No século XIX, foi identificada a natureza biológica dos agentes responsáveis pelos processos fermentativos, as leveduras, que nos dias de hoje continuam sendo empregadas em fermentações artesanais e industriais. Há relatos de que entre duas a quatro semanas sejam necessárias para a renovação das culturas nestes processos, devido a redução e perda de atividade metabólica e da viabilidade das células destes micro-organismos (WALKER, 1998).

Observa-se que no contexto de fermentações aplicadas a processos industriais, as leveduras da fermentação alcoólica da sacarose de cana-de-açúcar são as mais empregadas atualmente no Brasil. Entretanto, as linhagens selvagens da levedura tradicional da fermentação alcoólica da sacarose, *Saccharomyces cerevisiae*, não assimilam ou fermentam

lactose. É certo que a hidrólise prévia do dissacarídeo seria necessária, ou a busca de outra levedura capaz de fermentar lactose, dentre as quais se destacam algumas espécies do gênero *Kluyveromyces* (DINIZ, 2009).

Segundo Lane e Morrisey (2010) as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* apresentam as vantagens de assimilar, tanto glicose, quanto lactose, frente a outras leveduras do gênero *Kluyveromyces* e a *Saccharomyces cerevisiae*; e de possuírem as maiores velocidade máxima de crescimento  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) quando comparadas a *Saccharomyces cerevisiae*. A espécie *Kluyveromyces marxianus* se destaca em relação à *Kluyveromyces lactis*, por apresentar produção de inulinase e suportar temperatura de até 52°C, enquanto que a *Kluyveromyces lactis* suporta apenas 37°C e não produz inulinase. Ambas as leveduras do gênero *Kluyveromyces* citadas destacam-se como micro-organismos produtores de  $\beta$ -galactosidase, sendo que a levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo estudada em processos biotecnológicos devido as vantagens que apresenta quando comparada com outras leveduras (SONG *et al.*, 2010).

*K. marxianus* apresenta também a vantagem de possuir *status* GRAS e tem sido utilizada como fonte de enzimas de interesse industrial como inulinase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -galactosidase e endopoligalacturoses (LANE e MORRISEY, 2010; RODRIGUES, 2012). Este micro-organismo de aplicação prática tem sido isolado de ambientes diversos, resultando em alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo específico. Segundo Fonseca *et al.* (2008) o gênero *Kluyveromyces* tem sido investigado para a produção de proteína celular (*single-cell protein*), de etanol, de componentes aromáticos, e para a redução de lactose em compostos lácteos e como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas.

### 2.3.1 Metabolismo

A capacidade de metabolizar a lactose, é uma característica apresentada somente por alguns gêneros de leveduras, e está diretamente relacionada com a capacidade de produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase. Segundo Lane e Morrisey (2010), dentre as leveduras que assimilam a lactose, destaca-se o gênero *Kluyveromyces*, que metabolizam este dissacarídeo tanto pela via fermentativa como pela via respiratória.

O metabolismo das leveduras está relacionado com a assimilação de açúcares, que se difere de acordo com cada tipo de levedura. Segundo Silveira *et al.* (2005), as leveduras do

gênero *Saccharomyces cerevisiae*, seguem determinada orientação metabólica, em função da concentração inicial de açúcar no cultivo, enquanto que as do gênero *Kluyveromyces*, tendem a escolher entre respiração e fermentação em função do nível de oxigênio disponível no meio de cultivo.

De acordo com Diniz (2009), as leveduras podem ser classificadas quanto a necessidade ou não de oxigênio como:

- aeróbias estritas, que necessitam de oxigênio para metabolizar carboidratos;
- facultativas, que crescem com ou sem oxigênio;
- anaeróbias facultativas, que suportam até uma baixa concentração de oxigênio; e
- anaeróbias estritas, que não suportam oxigênio.

A espécie *Kluyveromyces marxianus*, classificada como facultativa, consegue assimilar carboidratos, tanto por respiração, quanto por fermentação, no entanto segue preferencialmente a rota respiratória podendo produzir etanol em condições limitadas de oxigênio (LANE e MORRISSEY, 2010; FONSECA *et al.*, 2008). Na literatura, estudos de Silveira *et al.* (2005), reportaram que nas leveduras do gênero *Kluyveromyces*, as vias oxidativas e fermentativas podem ocorrer simultaneamente.

Um efeito a ser destacado neste gênero de leveduras é o chamado efeito *crabtree*, que ocorre quando a levedura tem a tendência de seguir a via fermentativa mesmo em condição aeróbica. As linhagens de *Kluyveromyces marxianus* são classificadas como *crabtree* negativa, pois em condições aeróbicas esta levedura segue a via respiratória (FONSECA *et al.*, 2008). Sendo que 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. Segundo Flores *et al.* (2000), a utilização de etanol como substrato é possível devido à presença da enzima álcool desidrogenase, enquanto que resultados práticos de Furlan *et al.* (2001) mostraram que em temperaturas em torno de 28 °C a 30 °C, o consumo de etanol ocorre mesmo na presença de substrato inicial.

### 2.3.2 Crescimento Celular

Segundo Ghaly *et al.* (2005), a manutenção e transporte dos nutrientes de cultivo para o interior da célula influenciam diretamente no crescimento celular, sendo que o meio de cultivo desempenha um papel muito importante na formação das células e produtos. Por estarem ligadas diretamente ao processo metabólico dos

micro-organismos, as fontes de carbono e nitrogênio são bastante significativas, de modo que a agitação e a temperatura podem influenciar no transporte de nutrientes (MAO *et al.*, 2005; DINIZ, 2009).

## 2.4 Fonte de Nutrientes

Os substratos usualmente utilizados para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por meio de processos fermentativos com a utilização de leveduras possuem preços elevados, sendo eles: lactose como fonte de carbono e extrato de levedura, peptona, sulfato de amônia e uréia como fonte de nitrogênio (SHOLZ, 2011).

Frente à estas fontes de nutrientes de alto custo, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, substituindo as fontes de carbono e nitrogênio por resíduos agroindustriais que fornecem a quantidade necessária destes nutrientes para o crescimento do micro-organismo e para a produção de  $\beta$ -galactosidase (MANERA *et al.*, 2011; SCHOLZ, 2011; BRAGA *et al.*, 2012). O resíduos agroindustriais empregados na produção de  $\beta$ -galactosidase são o soro de queijo como fonte de carbono e a milhocina como fonte de nitrogênio.

### 2.4.1 Soro de Queijo

O líquido residual da elaboração do queijo é chamado de soro de queijo, também conhecido como soro de leite, de modo que sua composição varia de acordo com a qualidade do leite utilizado e com o tipo de queijo produzido (TRINDADE, 2002).

Este subproduto do processo produtivo de queijo pode criar um grave problema ambiental em função da grande carga orgânica remanescente, de modo que em média apresentam elevados valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO entre 40 a 50 g L<sup>-1</sup>) e Demanda Química de Oxigênio (DQO entre 60 a 80 g L<sup>-1</sup>) (JOSHI *et al.*, 2011). Percebe-se portanto, a necessidade do tratamento deste subproduto para adequação dos parâmetros físico-químicos dispostos em legislação ambiental específica para descarte (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Segundo Prazeres *et al.* (2012), as formas de tratamento que vêm sendo empregadas consistem na digestão aeróbia, digestão anaeróbia, fermentação para obtenção de etanol, hidrogênio e ácido

lático, tratamento físico-químico por precipitação térmica e isoelétrica, por adição de agente coagulante, através da separação por membranas e com o uso agrícola. Por outro lado, o estudo das melhores condições em processos fermentativos aeróbios para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase também vêm sendo considerada uma alternativa viável para a destinação final do soro de queijo (MANERA *et al.*, 2011; SCHOLZ, 2011; BRAGA *et al.*, 2012).

A Figura 4 ilustra o processo fabricação de queijo, que gera quantidades significativas de soro após as etapas de corte de coalhada e dessoragem.

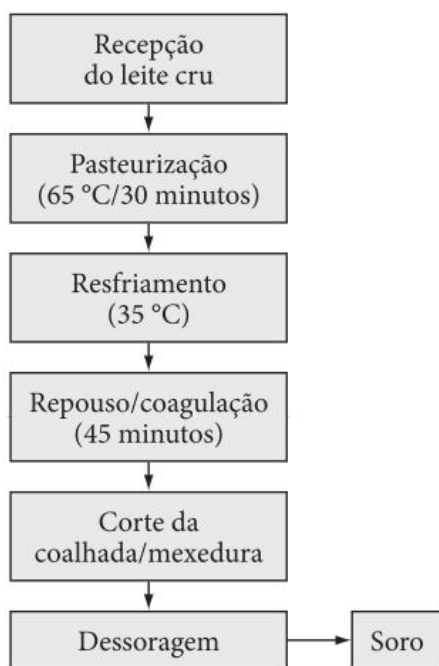


Figura 4. Fluxograma de obtenção do soro a partir da produção de queijo.

Fonte: Adaptado de LIRA *et al.*, 2009

A composição média do soro de queijo é de 93 a 94% de água, 4,5 a 6,0% de lactose, 0,6 a 1,1% de proteínas, 0,8 a 1,0% de minerais, 0,05 a 0,9% de ácido lático e 0,06 a 0,5% de gorduras (SILVEIRA (2006); PRAZERES *et al.*, 2012).

Este elevado teor de lactose torna o soro de queijo atrativo para o seu uso em processos biotecnológicos, principalmente no uso em fermentações submersas aeróbias para produção, principalmente, de etanol e  $\beta$ -galactosidase, quando se usa



micro-organismos capazes de assimilar a lactose, como, a levedura *K. marxianus* (SCHOLZ, 2011).

#### 2.4.2 Milhocina

A milhocina é um subproduto do beneficiamento de milho, também chamado de água de maceração de milho. Contém grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, sendo que sua composição pode variar de acordo com a condição e a qualidade do grão de milho utilizado (AZEREDO *et al.*, 2006). A sua destinação, na maioria dos casos, continua sendo principalmente como alimento complementar na fabricação de ração para aves e ruminantes, sendo que diversos estudos recentes estão sendo desenvolvidos para o seu uso como substrato em processos fermentativos, como fonte de nutrientes (MANERA *et al.*, 2011; SCHOLZ 2011).

De acordo com Iggett e Koffler (1998) as características físico-químicas da milhocina podem variar, de modo que o efluente bruto normalmente apresenta teores de pH de 3,5 a 4,1 e concentração de nitrogênio entre 3,8% a 4,5%. No entanto, Waites *et al.* (2001), encontraram teores de nitrogênio entre 4% a 7,5% em extrato concentrado de milhocina.

Maddipati *et al.* (2011), avaliaram a milhocina como substituta do extrato de levedura, na composição do meio de cultura como fonte de nitrogênio de baixo custo, e obtiveram excelentes resultados na produção de etanol. Para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, a milhocina já foi testada por alguns autores, utilizando a levedura *K. marxianus* (SCHNEIDER *et al.*, 2001, FURLAN *et al.*, 2001, MANERA *et al.*, 2011, SCHOLZ, 2011).

#### 2.5 Estado da Arte

A Tabela 3 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos por alguns autores que estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de soro de queijo com a utilização de *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*.

Tabela 3: Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de soro de queijo

Micro-organismo	<i>K. marxianus</i> CBS 712 e CBS 6556	<i>K. lactis</i> NRRL Y1564	<i>K. marxianus</i> CCT 7082	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	<i>K. marxianus</i> ATCC 16045
Tempo (h)	10	12	24	24	24
Temperatura (°C)	35 ~ 37	30	30	44	30
Agitação (min <sup>-1</sup> )	200	180	180	220	180
Soro de Queijo [Lactose] (g L <sup>-1</sup> )	70	50	70	8,9	120
Nitrogênio (g L <sup>-1</sup> )	10 (extrato de levedura)	Não utilizado	65 (milhocina)	9 (milhocina)	10 (extrato de levedura)
$\Delta ET_{\text{máx}}$ (U mL <sup>-1</sup> )	4 e 5	3,5	Não mencionado	4,6	10,4
$\Delta ET_{\text{esp}}$ (U g <sup>-1</sup> )	Não mencionado	1206,9	1400	1323,4	Não mencionado
Referência	RECH <i>et al.</i> , 1999	LIMA <i>et al.</i> , 2011	MANERA <i>et al.</i> , 2011	SCHOLZ, 2011	BRAGA <i>et al.</i> , 2012

Rech *et al.* (1999) foram os primeiros autores a estudar a utilização de soro de queijo compondo o substrato para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase. Seus experimentos foram realizados em shaker durante 24 horas, sob agitação de 200 min<sup>-1</sup> e pH mantido em 5,5, obtendo atividade enzimática máxima à temperatura de 37 °C. A amostra de soro de queijo continha 70 g L<sup>-1</sup> de lactose, enquanto que a fonte de nitrogênio utilizada foi o extrato de levedura na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>. Sob estas condições foram testadas duas linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, CBS 712 e CBS 6556, em uma aeração de 3 L min<sup>-1</sup> e rotação de 500 rpm em bioreator com 1,5 litros de meio de cultura, de modo que, as maiores atividades enzimáticas obtidas foram 4 U mL<sup>-1</sup> e 5 U mL<sup>-1</sup>, para cada linhagem de *K. marxianus* respectivamente. Rech e Ayub (2007) continuaram a estudar as melhores condições de meio de cultivo utilizando soro de queijo para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em biorreator e concluíram que em relação às espécies de *K. lactis*, *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, esta última possui maior capacidade de produzir a enzima, no entanto, apresentam uma demanda de oxigênio muito maior, que só pode ser alcançada em biorreator com o uso de ar enriquecido de oxigênio.

Lima *et al.* (2011) avaliaram uma seleção de espécies de *Kluyveromyces* para a produção de  $\beta$ -galactosidase, utilizando preliminarmente lactose PA como fonte de carbono, além de extrato de levedura e sulfato de amônio como principais fontes de nitrogênio. Dentre as espécies estudadas estavam *Kluyveromyces marxianus* LAMI CE 025, *K. marxianus* CCA 510, *K. lactis* NRRL Y1564 e *K. lactis* NRRL Y4087. Curiosamente, as cepas de *K. marxianus* não consumiram a lactose do meio sintético. Desta forma, foi selecionada a levedura *K. lactis* NRRL Y1564 para avaliar a produção de  $\beta$ -galactosidase em soro de leite, por ter apresentado os melhores resultados preliminares. A condição de fermentação adotada foi, soro de leite com concentração de  $50 \text{ g L}^{-1}$  de lactose, sendo os experimentos realizados em shaker a  $180 \text{ min}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$  por 24 h. Nestas condições foi constatada a atividade máxima de  $3,5 \text{ U mL}^{-1}$ , após 12 h de fermentação, a atividade específica de  $1206,9 \text{ U g}^{-1}$ , além da produção de etanol ( $16 \text{ g L}^{-1}$ ) com 25 h de cultivo.

Outros autores (Manera *et al.*, 2008) já haviam avaliado a composição do meio de cultivo para produção de  $\beta$ -galactosidase, de modo que observaram crescimento celular e consumo de lactose pelas seguintes linhagens de leveduras: *K. marxianus* CCT 7080, *K. marxianus* CCT 7081, *K. marxianus* CCT 7082, *K. marxianus* NCYC 587, *K. lactis* NRRL Y 8279, *K. lactis* NRRL Y 1564 e *K. marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045. Neste sentido, a *K. marxianus* CCT 7082 foi a que apresentou os maiores resultados de atividade enzimática, sendo avaliado o meio de cultivo em dois planejamentos experimentais. O resultado do primeiro planejamento indicou a lactose, o extrato de levedura e o sulfato de amônio como variáveis significativas. O segundo planejamento testado foi um delineamento central rotacional  $2^3$ , que obteve a maior atividade enzimática de  $10,6 \text{ U mL}^{-1}$ , sob as condições de 96 horas de fermentação à  $30^\circ\text{C}$  e  $180 \text{ min}^{-1}$  de rotação. Impulsionados pelos resultados obtidos neste trabalho, Manera *et al.* (2011) utilizaram a mesma linhagem de *K. marxianus*, CCT 7082, para avaliação da composição do meio de cultivo para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase com a utilização de fontes alternativas de carbono e nitrogênio, o soro de queijo e a milhocina, respectivamente, utilizando a técnica de delinamento experimental. A produção da enzima foi realizada em meio composto por soro de queijo, milhocina e Prodex-lac<sup>®</sup> e sais. Inicialmente foi realizado um planejamento experimental fracionário ( $2^{5-1}$ ) para determinar as variáveis significativas na produção da enzima, que apontou as variáveis concentração de lactose, milhocina e o pH com efeito estatisticamente significativo na atividade enzimática. Neste contexto, estas variáveis foram empregadas num delineamento composto central rotacional para otimizar a produção da enzima, sob as seguintes faixas: concentração de lactose de 40 a  $100 \text{ g L}^{-1}$ , milhocina de 10 a  $120 \text{ g L}^{-1}$  e pH de 3,5 a 6,5. Sob agitação de 180

$\text{min}^{-1}$ , a temperatura de 30 °C e em 24 h de fermentação, a condição de cultivo que resultou na maior atividade enzimática (1400 U  $\text{g}^{-1}$ ) foi na presença de 70 g  $\text{L}^{-1}$  de lactose contida no soro de queijo, 65 g  $\text{L}^{-1}$  de milhocina, 4 g  $\text{L}^{-1}$  de Prodex-lac e pH 5, alcançando a produtividade de 61 U  $\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Nesta concepção, Scholz (2011) estudou a cinética de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio, visando a produção de  $\beta$ -galactosidase, verificando a influência de uma fonte alternativa de carbono (soro de queijo), diferentes fontes de nitrogênio (Prodex Lac<sup>®</sup> e milhocina), agitação e temperatura, por meio de um delineamento experimental. Um delineamento fracionário  $2^{5-1}$ , Plackett & Burman indicou que os parâmetros temperatura, agitação e concentração de soro de queijo foram estatisticamente significativos para o crescimento celular máximo. Em contrapartida, visando à produção de  $\beta$ -galactosidase, os parâmetros estatisticamente significativos foram temperatura, agitação e milhocina, de modo que os melhores resultados para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase estavam associados ao experimento contendo lactose (8,9 g  $\text{L}^{-1}$ ) e milhocina (9 g  $\text{L}^{-1}$ ), em 44 °C e 220  $\text{min}^{-1}$  de agitação. Nesta condição a atividade enzimática máxima observada foi de 4,6 U  $\text{mL}^{-1}$ , enquanto que a atividade enzimática específica encontrada foi de 1323,4 U  $\text{g}^{-1}$ .

O trabalho mais recente disponível na literatura sobre o uso de soro de queijo utilizando *Kluyveromyces marxianus* para a produção de  $\beta$ -galactosidase, é o apresentado por Braga *et al.*, (2012), que inicialmente avaliou sete cepas de diferentes linhagens de *Kluyveromyces* para a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, sendo que a escolhida para otimização do meio de cultura foi a *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, por ter apresentado os melhores resultados de atividade da enzima. A metodologia utilizada para otimizar o meio de cultivo foi a de delineamento experimental e superfície de resposta. Além do uso do resíduo do processo de fabricação de queijo, o trabalho de Braga *et al.*, (2012) também avaliou, de forma inovadora na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, o uso do efluente de arroz parboilizado, a fim de aproveitar o nitrogênio disponível para o crescimento celular. Outras fontes de nutrientes também foram avaliadas na composição do meio de cultivo, como peptona,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura, visando aumentar a quantidade de nitrogênio disponível. Um delineamento fracionário  $2^{6-2}$  indicou que os parâmetros pH e efluente de arroz parboilizado não foram significativos para os maiores valores de atividade enzimática, sendo que as variáveis soro de queijo, peptona,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura foram consideradas, posteriormente, na aplicação de um delineamento composto central rotacional. O maior valor de atividade enzimática encontrado foi 10,4 U  $\text{mL}^{-1}$ , sendo o pH mantido em 4

e a concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de efluente de arroz parboilizado, em conjunto com  $120 \text{ g L}^{-1}$  de lactose no soro de queijo,  $15 \text{ g L}^{-1}$  de peptona,  $15 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura em 24 h de fermentação, à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $180 \text{ min}^{-1}$ .

### 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%) e ágar 20 g L<sup>-1</sup> mantidas em refrigerador a 4 °C.

##### 3.1.1 Ativação da Cepa

A ativação foi realizada a temperatura de 37°C, em frascos de Erlenmeyer não aletados (1000 mL), contendo 300 mL de meio YPL, em shaker com agitação circular de 180 min<sup>-1</sup> por aproximadamente 15 h.

#### 3.2 Substratos

Os substratos utilizados foram: soro de queijo líquido cedido pela Indústria Do Vale, como fonte de carbono, e a milhocina (água de maceração do milho) cedida pela Corn Products, como fonte de nitrogênio.

O soro de queijo foi desproteínizado, sendo mantido durante 15 min a 121°C. Após o aquecimento, o soro foi filtrado à vácuo em membrana de 0,2 µm. Após a desproteínização a concentração de lactose no soro de queijo foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). A concentração de lactose foi variável nos lotes de soro de queijo utilizado neste trabalho. O primeiro lote de soro de queijo utilizado no desenvolvimento do planejamento experimental, apresentou concentração de 48 g L<sup>-1</sup>, enquanto que o segundo lote, utilizado para validação do modelo, continha 43 g L<sup>-1</sup>, e o terceiro lote, utilizado nos ensaios em biorreator, continha 27 g L<sup>-1</sup> de lactose.

A milhocina foi previamente centrifugada em 10.000 min<sup>-1</sup> durante 10 min e apenas o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

A lactose PA utilizada nos meios de cultivo de ativação da cepa passou por pré-tratamento, que consistiu no processo de secagem para remoção da umidade, de modo que após 24 horas em estufa a 50°C e 30 min em dessecador, estava pronta para o uso.

### 3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Estudos de Scholz (2011) indicaram soro de queijo e milhocina como parâmetros significativos na produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de *K. marxianus* cultivada em shaker. Neste trabalho as definições das temperaturas e das concentrações de soro de queijo e milhocina, foram testadas utilizando-se delineamento experimental do tipo DCCR, com 17 ensaios para as três variáveis de entrada, com o ponto central em triplicata, conforme mostrado na Tabela 5. Os dados obtidos foram analisados pelo *software* STATISTICA 7.0.

Na Tabela 4 estão dispostas as concentrações das variáveis estudadas no delineamento experimental, sendo que  $X_1$  é a variável soro de queijo ( $\text{mL L}^{-1}$ ),  $X_2$  milhocina ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $X_3$  temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e na Tabela 5, a matriz do DCCR com 14 ensaios e ponto central em triplicata, em níveis codificados e em valores reais das variáveis analisadas.

Tabela 4: Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no delineamento DCCR.

Níveis	$X_1$	$X_2$	$X_3$
-1,68	100	0	25
-1	280	3,64	31
0	550	9	35
1	820	14,36	39
1,68	1000	18	45

Fonte: Primária, 2013.

Tabela 5: Matriz DCCR com 14 ensaios e ponto central em triplicata

Ensaio	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	-1	280	3,64	31
2	1	-1	-1	820	3,64	31
3	-1	1	-1	280	14,36	31
4	1	1	-1	820	14,36	31
5	-1	-1	1	280	3,64	39
6	1	-1	1	820	3,64	39
7	-1	1	1	280	14,36	39
8	1	1	1	820	14,36	39
9	-1,68	0	0	100	9	35
10	1,68	0	0	1000	9	35
11	0	-1,68	0	550	0	35
12	0	1,68	0	550	18	35
13	0	0	-1,68	550	9	25
14	0	0	1,68	550	9	45
15	0	0	0	550	9	35
16	0	0	0	550	9	35
17	0	0	0	550	9	35

Fonte: Primária, 2013.

### 3.4 Condições de Cultivo – Ensaio em Frascos Agitados

*Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foi cultivada em regime de batelada em frascos Erlenmeyers (não aletados) de 1000 mL, contendo um volume final de 300 mL, nos diferentes meios de cultura propostos. As culturas foram incubadas nas temperaturas delineadas pelo planejamento DCCR, sob agitação fixa de  $220 \text{ min}^{-1}$ , por 24 h. Para determinação da biomassa foram monitorados os tempos 0, 3, 6, 9, 14, 19 e 24 h durante o crescimento celular em cultivo submerso, de modo que em cada tempo foi coletado 1 mL para leitura da absorbância e determinação da concentração celular, 2 mL para posterior análise de concentração de lactose e atividade enzimática, além de outros 2 mL que serviram de contraprova. A Figura 5 ilustra o procedimento de coleta e preparo das amostras.

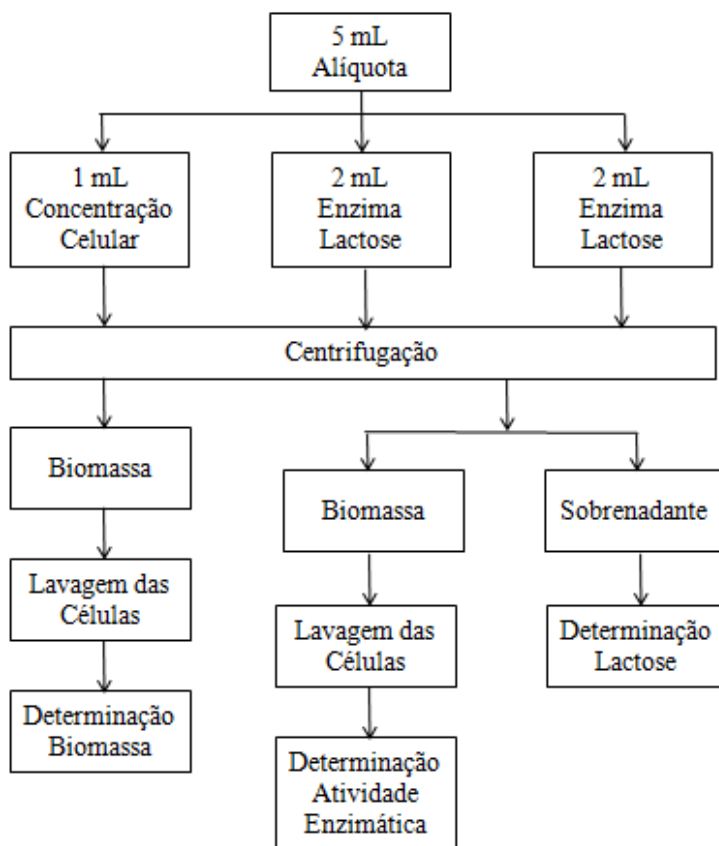


Figura 5. Fluxograma de coleta e preparo das amostras.



### 3.5 Validação do planejamento experimental DCCR

Culturas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foram cultivadas em regime de batelada em frascos Erlenmeyers (não aletados) de 1000 mL, contendo um volume final de 300 mL e uma fração de inoculo de 10%. Em função do reajuste aplicado à concentração do soro de queijo do segundo lote, a condição ótima em que foi realizado o cultivo em triplicata foi na presença de: 958 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo (46 g L<sup>-1</sup> de lactose), 18 g L<sup>-1</sup> de milhocina e temperatura de 31°C.

### 3.6 Ensaios em biorreator

Os ensaios, realizados em duplicatas, foram conduzidos em biorreator com objetivo de avaliar a agitação e aeração na produção da enzima. O meio de cultura e temperatura foram aqueles definidos conforme a melhor condição validada em experimento em *shaker*. No entanto, em virtude da concentração do terceiro lote de soro de queijo ter apresentado baixo valor de lactose, quando comparado aos dois primeiros, a condição de operação dos ensaios em biorreator foi diferente da melhor condição validada no planejamento experimental DCCR.

#### 3.6.1 Condições de Cultivo em Biorreator

Considerando o volume útil de 1,5 L sendo 10 % (v/v) de inóculo, foi utilizado 1350 mL de soro de queijo (concentração de 900 mL L<sup>-1</sup>, equivalente à 25 g L<sup>-1</sup> de lactose) e 27 g de milhocina (concentração de 18 g L<sup>-1</sup>). A temperatura de operação foi de 31°C, com duração de 24 h e intervalos de amostragem conforme os realizados nos experimentos anteriores. Duas condições de cultivo foram pré-estabelecidas com diferentes valores de agitação e aeração, sendo que na condição (a), de 200 min<sup>-1</sup> e 2 L min<sup>-1</sup>, o volume de meio por volume de ar por minuto equivalente foi de 1,33 vvm, resultando em um valor de K<sub>L</sub>a = 19 h<sup>-1</sup>, e na condição (b), de 400 min<sup>-1</sup> e 4 L min<sup>-1</sup> o volume de meio por volume de ar por minuto foi de 2,67 vvm, resultando em um valor de K<sub>L</sub>a = 53 h<sup>-1</sup>. Afim de evitar a formação de espuma, apenas na condição (b) foi utilizado 0,2 mL polipropilenoglicol 2000 (Fluka).

### 3.6.2 Descrição do Biorreator

Conforme ilustra a Figura 6, foi utilizado o biorreator (B-Braun), com dorna de vidro de borossilicato, com capacidade nominal de 2 L (volume útil igual a 1,5 L) e tampa de aço inox. Para medir o oxigênio dissolvido e o pH durante o cultivo, o biorreator possui um eletrodo polarográfico autoclavável modelo InPro 6110/220 (Mettler-Toledo, AlphavilleBarueri, Brasil), e um eletrodo de vidro esterilizável modelo 405-DPA-SC-K8S/225 (Mettler-Toledo, AlphavilleBarueri, Brasil), respectivamente. Para medir a temperatura, uma sonda foi acoplada internamente ao biorreator. A temperatura ajustada para o cultivo foi controlada com o auxílio do equipamento Julabo GmbH que promove o aquecimento e o resfriamento da água de circulação, no sistema de troca de calor, conectado ao sistema ao redor da dorna do biorreator.

A retirada de amostras foi realizada por uma saída própria, uma mangueira de silicone com sua extremidade conectada a um amostrador.



Figura 6. Biorreator utilizado no processo de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 visando a produção de lactase.

### 3.6.3 Preparo do Biorreator e do Meio de Cultivo

O eletrodo de pH foi calibrado preliminarmente. A dorna foi montada contendo 1350 mL de soro de queijo e esterelizada em autoclave a 121°C durante 30 min. Após o resfriamento da dorna, à temperatura ambiente, o eletrodo de medição de oxigênio dissolvido e a sonda de temperatura foram conectadas ao sistema de controle do biorreator. A milhocina foi esterelizada em frasco duran separado, sendo introduzida assepticamente para o interior da dorna. Após a introdução da milhocina no interior do biorreator, a sonda de oxigênio foi calibrada. O inóculo foi adicionado na quantidade equivalente a 150 mL, sob as mesmas condições de preparo dos experimentos em *shaker*.

## 3.7 Determinações Analíticas

### 3.7.1 Determinação da Biomassa

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

Para construção da curva de calibração, realizou-se o cultivo em quadruplicata de *Kluyveromyces marxianus* a 30°C, em meio YPL por 12 h, monitorando a cada hora a produção de biomassa por turbidimetria e por massa seca. Os valores médios foram plotados para determinação da fase de crescimento exponencial, até sete horas de cultivo. Os valores médios neste intervalo, originaram o gráfico da curva de correlação absorvância x Massa Seca, conforme ilustra o ANEXO 1.

Para determinação da massa seca, primeiramente Tubos Eppendorf de 2 mL foram secos em estufa da marca WTC BINDER a 60°C por 24 h e pesados em balança analítica da marca Mettler AT250. 2 mL da amostra foram colocados nesse tubo e centrifugados a  $9000 \text{ min}^{-1}$  por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. A água foi descartada após a centrifugação e as células foram secas na estufa a 60°C até massa constante. Essa massa foi então convertida em concentração celular em  $\text{g L}^{-1}$ .

### 3.7.2 Determinação do Teor de Lactose

A lactose foi determinada com a utilização do método DNS, que determina a concentração de açúcares redutores totais. O método baseia-se na redução, em meio alcalino, do 3,5-dinitrosalicilato (coloração amarela). O produto formado é estável, com coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) na proporção estequiométrica e máxima absorção da luz visível no comprimento de onda de 540 nm.

Para aplicação do método foi necessário, inicialmente, construir curva-padrão do açúcar que se deseja determinar, a lactose. Neste sentido, a lactose PA passou por pré-tratamento para remoção da umidade e posteriormente, preparou-se solução de 2 g L<sup>-1</sup> de lactose em água, sendo distribuída em Eppendorfs de 2 mL, e estes, mantidos congelados até as análises. As amostras de solução de lactose eram descongeladas minutos antes do uso, sendo que a partir delas, fez-se diluições obtendo-se os padrões que variaram de 0 a 2g L<sup>-1</sup>.

O procedimento experimental de reação do açúcar dos padrões e das amostras, consistiu na adição de 0,5 mL de amostra (devidamente diluída) à 0,5 mL de solução DNS em tubos de ensaios. Deixou-se reagir por 5 minutos em banho-maria de água fervente, e em seguida, colocou-se os tubos de ensaio em banho de gelo, até o resfriamento completo para interromper a reação. Em seguida adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se até a homogeneização. Procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.7.3 Determinação da Atividade Enzimática

Primeiramente, fez-se necessária a extração da enzima, realizada por meio do 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 min<sup>-1</sup>. Após, foram retirados 110 µL do sobrenadante para o teste enzimático (SCHOLZ, 2011).

A determinação da atividade enzimática foi realizada através do método analítico utilizando ONPG (*o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) conforme apresentado por Schneider *et al.* (2001). Em um microtubo foram colocados 780 µL de tampão fosfato pH 7,6 (tampão

K) e 110  $\mu\text{L}$  da solução da enzima. O tubo foi agitado durante 5min em termomixer a 30 °C, até o equilíbrio da temperatura. Adicionou-se 110  $\mu\text{L}$  de ONPG 35 mM e após 1 min de reação adicionou-se 220  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sódio) 1 M para interromper a reação. Em seguida, a absorbância foi lida em 405 nm.

### 3.7.4 Determinação de Etanol

As determinações de etanol foram obtidas por meio de análises em HPLC (*High performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência). 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentração 8,5 mM, de modo isocrático com fluxo de 0,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com a temperatura do forno de 70°C e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

## 3.8 Metodologia de Cálculo

### 3.8.1 Atividade Enzimática Volumétrica

Atividade enzimática volumétrica ( $\text{AET}_{\text{máx}}$ ) foi expressa em ( $\text{U mL}^{-1}$ ), na qual uma unidade de  $\beta$ -galactosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária a liberar 1 $\mu\text{mol}$  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).

$$\text{AE} = \frac{\Delta A \cdot V_f \cdot F}{\epsilon \cdot L \cdot V_a \cdot t} \quad (1)$$

Na qual:

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

$\Delta A$ : diferença da absorbância entre o branco e amostra

$V_f$ : volume final do teste (mL)

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

L: caminho ótico (cm)  
 V<sub>a</sub>: volume da amostra (mL)  
 t: tempo de reação (min)  
 F: fator de diluição

Sendo:

$\epsilon_{\text{ONP}}$ : 3,1 cm<sup>2</sup>μmol<sup>-1</sup>

F: ¼

L: 1 cm

V<sub>f</sub>: 1,22 mL

V<sub>a</sub>: 0,11 mL

t: 1 min

Tem-se então a Equação 2, onde  $\Delta A$  é diferença da absorbância entre o branco e amostra sendo D a diluição prévia da amostra, que determina a atividade enzimática volumétrica em uma unidade de β-galactosidase (U) por mililitro (mL).

$$AE = 0,894 \cdot \Delta A \cdot D \quad (2)$$

### 3.8.2 Atividade Enzimática Específica

Para a determinação da atividade enzimática específica, utilizou-se a Equação 3:

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

Onde:

AET<sub>esp</sub>: atividade enzimática específica (U g<sup>-1</sup>)

AET<sub>max</sub>: atividade volumétrica máxima (U mL<sup>-1</sup>)

X': concentração celular correspondente à AET<sub>max</sub> (g L<sup>-1</sup>)

### 3.8.3 Fatores de Conversão

\*Fator de conversão de substrato lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em células ( $Y_{X/S}$ ) (Equação 4)

$$Y_{X/S} = \frac{(X_{\max} - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (4)$$

\*Fator de conversão de substrato lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em produto ( $Y_{P/S}$ ) (Equação 5)

$$Y_{P/S} = \frac{(AET_{\max} - AET_0)}{(S_0 - S_f)} \cdot 10^3 \quad (5)$$

Onde:

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

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

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

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

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

$S_f$ : concentração de substrato onde concentração celular é máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )

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

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

### 3.8.4 Produtividade Máxima em Células ( $P_{X_{\max}}$ )(Equação 6)

$$P_{X_{\max}} = \frac{X_{\max}}{t} \quad (6)$$

Onde:

$P_{X_{\max}}$ : produtividade máxima em células ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

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

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

### 3.8.5 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ) foi realizada em triplicata, segundo Galaction *et al.* (2004), pelo método do borbulhamento, para cada combinação de agitação e aeração referentes à cada condição de cultivo em biorreator.

A partir da suposição da transferência de massa nas duas fases (gasosa e líquida), foi deduzida a forma de determinação do  $K_L a$  conforme as Equações 7 a 9. As concentrações de oxigênio no meio e de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar, foram consideradas  $C_L$  e  $C^*$ , respectivamente.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot (C^* - C_L) \quad (7)$$

$$\int_0^C \frac{dC}{(C^* - C_L)} = \int_0^t K_L a \cdot dt \quad (8)$$

$$-\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = K_L a \cdot t \quad (9)$$



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A utilização da metodologia de planejamento experimental, seguida de aplicação de delineamento composto central rotacional para investigação das melhores condições de produção de  $\beta$ -galactosidase na presença de soro de queijo por *K. marxianus*, tem sido aplicada por alguns autores (MANERA *et al.* 2011; BRAGA *et al.* 2012). Nestes estudos, avalia-se um grande número de variáveis em um primeiro momento, para em seguida, com base nos resultados obtidos, convergir para as variáveis consideradas significativas.

Este trabalho é uma sequência de outro trabalho realizado por Scholz (2011) que aplicou um delineamento experimental Plackett & Burman ( $2^{5-1}$ ), que apontou soro de queijo, milhocina e temperatura como parâmetros significativos para produção de lactase. No entanto a agitação e Prodex Lac<sup>®</sup>, variáveis também avaliadas, não foram consideradas significativas. Contudo foi observado que os maiores valores de atividade enzimática (4,3 e 4,6 U mL<sup>-1</sup>) foram encontrados nas maiores agitações (220 min<sup>-1</sup>), possivelmente, pela maior disponibilidade de oxigênio proporcionada durante o cultivo, favorecendo o mecanismo de respiração. Neste sentido, partindo das conclusões obtidas neste trabalho, verificou-se a necessidade de convergir para a condição ótima de cultivo da enzima, e avaliar a influência da oxigenação sobre a atividade enzimática.

A composição do meio de cultivo no processo de produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por cultivo submerso é determinante para a obtenção da maior quantidade de enzima produzida. O uso de substratos alternativos como fonte de carbono e nutrientes, é aplicado ao cultivo de *Kluyveromyces marxianus* para obtenção da lactase. No entanto, sabe-se que a quantidade de enzima produzida depende da capacidade de assimilar os nutrientes, os quais são fortemente influenciados pela temperatura e agitação durante o cultivo. Nesta concepção, os experimentos foram realizados baseando-se no delineamento composto central rotacional (DCCR), com 14 ensaios e ponto central em triplicata, tendo concentração de soro de queijo, concentração de milhocina e temperatura como variáveis. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de produção de  $\beta$ -galactosidase ( $AET_{m\acute{a}x}$ ), atividade enzimática específica ( $AET_{esp}$ ), fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), fator de conversão de substrato em enzima ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade máxima em células ( $P_{Xmax}$ ).

Tabela 6: Resultados dos parâmetros testados.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	AET <sub>máx</sub> (U mL <sup>-1</sup> )	AET <sub>esp</sub> (U g <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (U g <sup>-1</sup> )	P <sub>xmax</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	280	3,64	31	3,000	634,2	0,332	222,91	0,249
2	820	3,64	31	7,465	1136,8	0,152	175,64	0,346
3	280	14,36	31	4,224	837,6	0,325	280,88	0,265
4	820	14,36	31	9,800	1340,9	0,201	280,47	0,385
5	280	3,64	39	2,123	543,0	0,238	116,10	0,206
6	820	3,64	39	2,548	440,4	0,125	57,00	0,304
7	280	14,36	39	5,409	1440,7	0,262	433,24	0,198
8	820	14,36	39	7,200	1180,8	0,124	162,94	0,321
9	100	9	35	2,034	685,9	0,653	536,98	0,156
10	1000	9	35	4,900	680,6	0,163	120,56	0,379
11	550	0	35	3,777	439,3	0,330	147,94	0,453
12	550	18	35	6,996	1606,2	0,142	272,80	0,229
13	550	9	25	8,158	1028,3	0,287	320,04	0,418
14	550	9	45	3,554	736,6	0,131	134,55	0,254
15	550	9	35	6,400	810,7	0,260	222,97	0,415
16	550	9	35	6,213	972,8	0,229	239,82	0,336
17	550	9	35	6,500	944,9	0,229	237,52	0,362

Fonte: Primária, 2013.

X<sub>1</sub>: Soro de queijo (mL L<sup>-1</sup>), X<sub>2</sub>: milhocina (g L<sup>-1</sup>), X<sub>3</sub>: temperatura (°C)

A forma de expressar a produção de enzima, no caso da lactase de *K. marxianus* a partir de soro de queijo, varia de autor para autor, sendo que na literatura alguns tem optado por expressar em atividade enzimática volumétrica (RECH *et al.*, 1999; SANTIAGO *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2012), enquanto outros, em atividade enzimática específica (RECH e AYUB, 2007; MANERA *et al.*, 2011). Portanto, para efeito de comparação, este trabalho apresentou os resultados em ambas as formas, no entanto, a atividade enzimática volumétrica foi o parâmetro de resposta escolhido para determinar, posteriormente, as condições ótimas de produção da enzima.

De acordo com a Tabela 6, é possível verificar que o experimento 4 sob as condições de 820 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo (39,43 g L<sup>-1</sup> de lactose equivalente), 14,36 gL<sup>-1</sup> de milhocina à 31°C, apresentou o maior valor de atividade enzimática volumétrica, 9,80 U mL<sup>-1</sup>. Em contrapartida, o maior valor para atividade enzimática específica, 1606,20 U g<sup>-1</sup>, foi obtido no experimento 12 na presença de 550 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo (26,44 g L<sup>-1</sup> de lactose equivalente), 18 gL<sup>-1</sup> de milhocina a 35°C.

O gráfico da Figura 7 apresenta as curvas referente ao experimento 4, onde é possível observar o consumo total de substrato em 9h e a máxima produção de enzima a partir de 14h de cultivo. No ANEXO 2 encontram-se as demais curvas dos experimentos do DCCR.

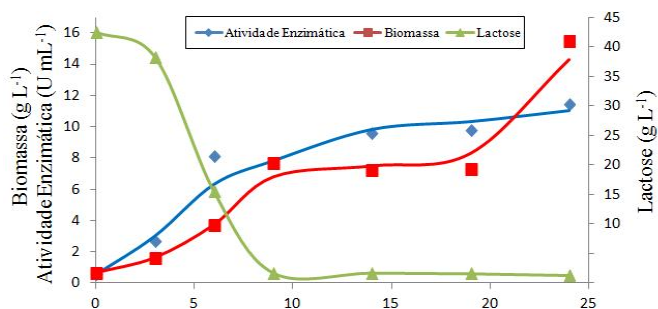


Figura 7. Curvas do consumo de lactose e produção de enzima e biomassa no experimento 4 cultivado em 31°C e 220 min<sup>-1</sup>, contendo lactose (39,43 g.L<sup>-1</sup>) e milhocina (14,36 g.L<sup>-1</sup>).

Os valores dos fatores de conversão foram calculados e determinados na tabela para efeito de comparação com aos valores encontrados na literatura, bem como os valores de produtividade máxima. No entanto, é certo que os valores de atividade enzimática são os de maior interesse, por se tratar de resíduos agroindustriais como substratos, disponíveis em grande quantidade e em baixo custo. Certamente uma preocupação maior com estes parâmetros deve ser observada, ao se utilizar fontes de nutrientes de alto custo, como lactose PA, extrato de levedura, peptona, entre outras, a fim de evitar menores produtividades relativas, ineficiência de conversões no processo e o desperdício.

A Tabela 7 apresenta a análise de variância realizada através da aplicação do teste ANOVA e os efeitos estimados na atividade enzimática volumétrica utilizada no DCCR.

Tabela 7: Efeitos estimados e análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a atividade enzimática volumétrica

Fatores/Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F <sub>Calculado</sub>	Valor p
<b>X<sub>1</sub></b>	<b>21,4041</b>	<b>1</b>	<b>21,4041</b>	<b>1008,532</b>	<b>0,000990*</b>
<b>X<sub>1</sub> X<sub>1</sub></b>	<b>9,8213</b>	<b>1</b>	<b>9,8213</b>	<b>462,768</b>	<b>0,002154*</b>
<b>X<sub>2</sub></b>	<b>20,9449</b>	<b>1</b>	<b>20,9449</b>	<b>986,898</b>	<b>0,001012*</b>
<b>X<sub>2</sub> X<sub>2</sub></b>	<b>0,8797</b>	<b>1</b>	<b>0,8797</b>	<b>41,450</b>	<b>0,023286*</b>
<b>X<sub>3</sub></b>	<b>17,0935</b>	<b>1</b>	<b>17,0935</b>	<b>805,426</b>	<b>0,001239*</b>
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0,2658	1	0,2658	12,524	0,071403
<b>X<sub>1</sub> X<sub>2</sub></b>	<b>0,7673</b>	<b>1</b>	<b>0,7673</b>	<b>36,155</b>	<b>0,026562*</b>
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	<b>7,6534</b>	<b>1</b>	<b>7,6534</b>	<b>360,620</b>	<b>0,002762*</b>
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	<b>2,3962</b>	<b>1</b>	<b>2,3962</b>	<b>112,905</b>	<b>0,008741*</b>
<b>Falta de ajuste</b>	<b>2,6447</b>	<b>5</b>	<b>0,5289</b>	<b>24,923</b>	<b>0,039020*</b>
Erro	0,0424	2	0,0212		
Total	83,3928	16			

\* = significante.

% de Variação explicada (R<sup>2</sup>) = 96,78

X<sub>1</sub>: Soro de queijo (mL L<sup>-1</sup>), X<sub>2</sub>: milhocina (g L<sup>-1</sup>), X<sub>3</sub>: temperatura (°C)

A obtenção de maiores valores de atividade enzimática volumétrica é fundamental para viabilizar a utilização dos resíduos agroindustriais como potencial fonte de produção de enzimas ou bioprodutos. Os principais efeitos dos fatores dependentes e suas interações de segunda ordem sobre a atividade enzimática volumétrica para um nível de confiança de 95% são apresentados na Tabela 7. O único fator que não foi considerado significativo foi a temperatura no fator de segunda ordem ( $X_3X_3$ ). Na aplicação do teste (ANOVA) para a análise de variância, todos os efeitos e fatores foram considerados. Foi utilizado o modelo, com um percentual de variação explicado ( $R^2$ ) de 96,78%. O modelo expresso pela Equação 10 foi gerado, representando a atividade enzimática volumétrica em função de todas as variáveis, em valores reais:

$$\beta - galactosidase \left( U \text{ mL}^{-1} \right) = -9,2189 + 0,04929(X_1) - 0,00001(X_1X_1) - 0,59757(X_2) - 0,01013(X_2X_2) + 0,36845(X_3) - 0,00469(X_3X_3) + 0,00021(X_1X_2) - 0,00091(X_1X_3) + 0,02553(X_2X_3) \quad (10)$$

Dessa forma, o modelo foi utilizado na construção das superfícies de resposta, permitindo a visualização da atividade enzimática volumétrica, expressa em seus valores máximos ( $AET_{\text{máx}}$ ), em função das variáveis.

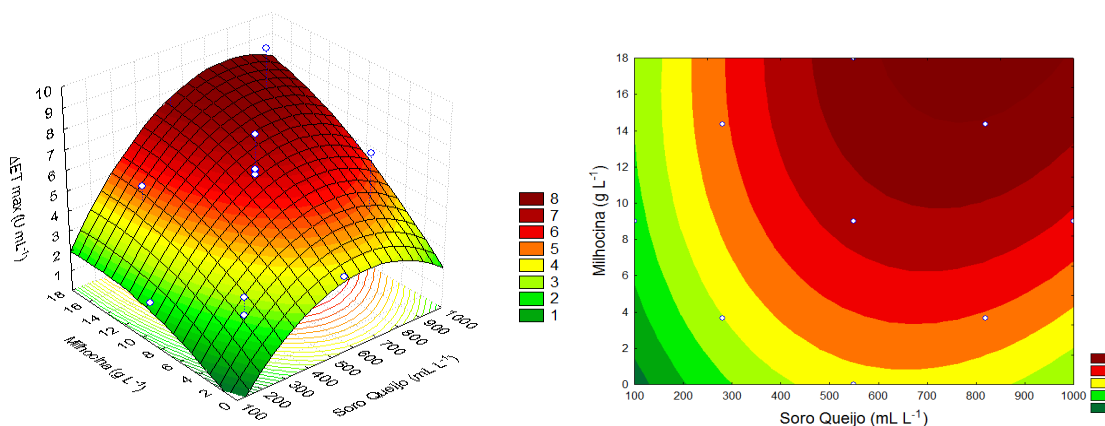


Figura 8. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima ( $U \text{ mL}^{-1}$ ) em função da concentração de melonina ( $g \text{ L}^{-1}$ ) e da concentração de soro de queijo ( $mL \text{ L}^{-1}$ )

Como pode ser observado na Figura 8 que apresenta o gráfico de superfície de resposta considerando duas das variáveis significativas, soro de queijo e melonina, os maiores valores de melonina ( $g \text{ L}^{-1}$ ) em conjunto com os maiores valores de soro de queijo

( $\text{mL L}^{-1}$ ) apontaram os maiores resultados de atividade enzimática volumétrica, como ilustra o diagrama de contorno.

A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície de resposta e o diagrama de contorno da atividade enzimática volumétrica em função das variáveis: soro de queijo e temperatura, enquanto que a Figura 10 apresenta o gráfico de superfície de resposta e o diagrama de contorno da atividade enzimática volumétrica em função das variáveis: milhocina e temperatura.

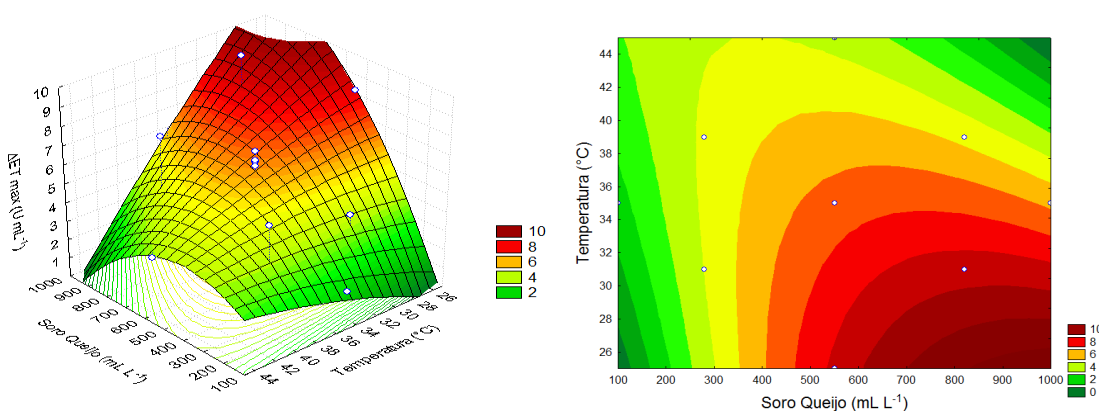


Figura 9. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima ( $\text{U mL}^{-1}$ ) em função da concentração soro de queijo ( $\text{mL L}^{-1}$ ) e da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

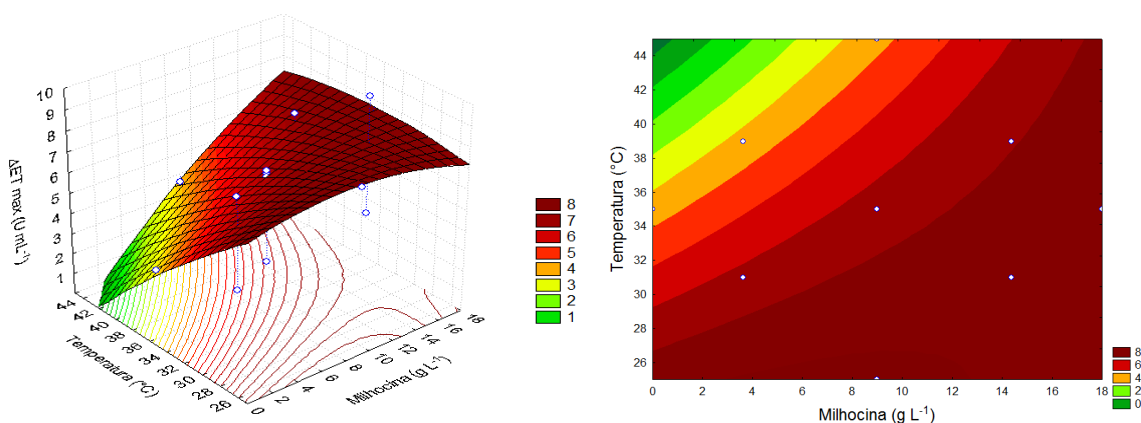


Figura 10. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática máxima ( $\text{U mL}^{-1}$ ) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e da concentração de milhocina ( $\text{g L}^{-1}$ )

No gráfico de superfície de resposta apresentado pela Figura 9, fica claro que nas temperaturas mais baixas em conjunto de maior concentração de soro de queijo, considerando o intervalo abordado neste DCCR, obtém-se os maiores valores de atividade enzimática volumétrica. Na Figura 10, que leva em consideração as variáveis milhocina e temperatura, a atividade enzimática volumétrica máxima foi obtida em uma ampla faixa de concentração de

milhocina e temperaturas. Por exemplo, ausência de milhocina e temperatura de 26°C, se equivale a condição de 18 g L<sup>-1</sup> de milhocina a 45°C, no que se refere a produção de enzima. Esta resposta pode estar relacionada com a sensibilidade da *Kluyveromyces marxianus* frente à temperatura, sendo que em 26°C não foi preciso de fonte de nitrogênio para maiores valores de atividade enzimática, enquanto que na temperatura de 45°C, a condição mostrou-se agressiva, sendo necessária a presença de nitrogênio para alcançar os mesmos valores de atividade enzimática. Nos trabalhos de Scholz (2011), a maior atividade enzimática volumétrica encontrada, 4,6 U mL<sup>-1</sup>, estava associada a 44 °C, 220 min<sup>-1</sup>, 8,9 g L<sup>-1</sup> de lactose do soro de queijo, em conjunto de 9 g L<sup>-1</sup> de milhocina e 5 g L<sup>-1</sup> de Prodex Lac<sup>®</sup>, como fontes de nitrogênio no meio de cultivo.

O gráfico da Figura 11 apresenta a relação dos valores experimentais *versus* os valores previstos pelo modelo para a atividade enzimática volumétrica, observando-se uma boa concordância entre eles, como era de se esperar, devido ao resultado da ANOVA, R<sup>2</sup>= 96,78%.

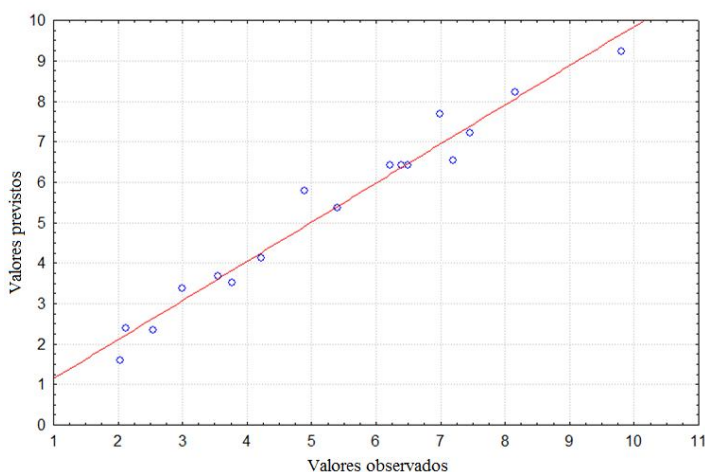


Figura 11. Valores observados *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática máxima (U mL<sup>-1</sup>).

O melhor resultado obtido por Braga *et al.*, (2012) foi de 10,4 U mL<sup>-1</sup>, cerca de 5, 8% maior do que o obtido na melhor condição deste planejamento experimental. No entanto, é importante destacar as condições com que estes resultados foram obtidos. Enquanto outros trabalhos disponibilizaram 120 g L<sup>-1</sup> de lactose do soro de queijo e 23,7 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, o meio de cultivo deste trabalho continha apenas 39,43 g L<sup>-1</sup> de lactose e 14,36 g L<sup>-1</sup> de milhocina. As temperaturas diferenciaram-se apenas por 1°C, 30 e 31°C respectivamente. Apesar do valor final encontrado por Braga *et al.* (2012) ter sido numericamente maior do que o obtido na melhor condição do DCCR deste trabalho, considerando todas as condições em

que a enzima foi produzida, fica evidente o ganho obtido, visto que com apenas 1/3 (um terço) da quantidade de lactose e utilizando outro resíduo agroindustrial como fonte de nitrogênio (milhocina), obteve-se praticamente os mesmos valores de atividade enzimática volumétrica. É importante destacar que o extrato de levedura é um substrato caro, muito utilizado em escala laboratorial, com o intuito de facilitar a absorção de nitrogênio pelo micro-organismo. No entanto, ao se vislumbrar uma aplicação em escala industrial, certamente a opção com um custo menor e com maiores produtividades irá prevalecer, como é o caso do uso do soro de queijo e a milhocina, ambos resíduos agroindustriais.

Outro parâmetro avaliado neste DCCR, foi a atividade enzimática específica. Na Tabela 8, são apresentados os efeitos estimados e a análise de variância realizada através da aplicação do teste ANOVA.

Tabela 8: Efeitos estimados e análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a atividade enzimática específica

Fatores/Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F <sub>Calculado</sub>	Valor p
X <sub>1</sub>	29.706	1	29.706	3,9546	0,185061
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	44.937	1	44.937	5,9823	0,134295
<b>X<sub>2</sub></b>	<b>1.176.015</b>	<b>1</b>	<b>1.176.015</b>	<b>156,5590</b>	<b>0,006327*</b>
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	30.805	1	30.805	4,1009	0,180133
X <sub>3</sub>	56.239	1	56.239	7,4869	0,111641
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	297	1	297	0,0395	0,860766
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	3.073	1	3.073	0,4091	0,587935
<b>X<sub>1</sub> X<sub>3</sub></b>	<b>234.092</b>	<b>1</b>	<b>234.092</b>	<b>31,1639</b>	<b>0,030622*</b>
<b>X<sub>2</sub> X<sub>3</sub></b>	<b>189.300</b>	<b>1</b>	<b>189.300</b>	<b>25,2009</b>	<b>0,037465*</b>
Falta de ajuste	78.040	5	15.608	2,0778	0,356057
Erro	15.023	2	7.512		
Total	1.896.772	16			

\* = significativo

% de Variação explicada ( $R^2$ ) = 95,09

X<sub>1</sub>: Soro de queijo (mL L<sup>-1</sup>), X<sub>2</sub>: milhocina (g L<sup>-1</sup>), X<sub>3</sub>: temperatura (°C)

Os principais efeitos dos fatores dependentes e suas interações de segunda ordem sobre a atividade enzimática específica para um nível de confiança de 95% são apresentados na Tabela 8. Os fatores que foram considerados estatisticamente significativos foram a concentração de milhocina (primeira ordem), as interações da concentração de soro de queijo com temperatura e a interação da concentração de milhocina com a temperatura. Na aplicação do teste (ANOVA) para a análise de variância, todos os efeitos e fatores foram considerados,

e o valor do coeficiente de correlação obtido foi de 0,95. O modelo expresso pela Equação 11 foi gerado, representando a atividade enzimática específica ( $AET_{esp}$ ) em função de todas as variáveis, em valores reais:

$$\beta - galactosidase (U g^{-1}) = -379,32 + 6,84(X_1) - 0,001(X_1 X_1) - 223,01(X_2) + 1,90(X_2 X_2) + 20,42(X_3) - 0,16(X_3 X_3) - 0,01(X_1 X_2) - 0,16(X_1 X_3) + 7,17(X_2 X_3) \quad (11)$$

O teste-F validou o modelo, sendo possível construir a superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento da atividade enzimática específica em função das variáveis analisadas. Neste sentido o gráfico apresentado na Figura 12 apresenta a superfície de resposta para analisar as melhores condições de temperatura ( $^{\circ}C$ ) e concentração de soro de queijo ( $mL L^{-1}$ ) para produção de  $\beta$ -galactosidase que conduzem a um maior valor de da atividade enzimática específica ( $U g^{-1}$ ):

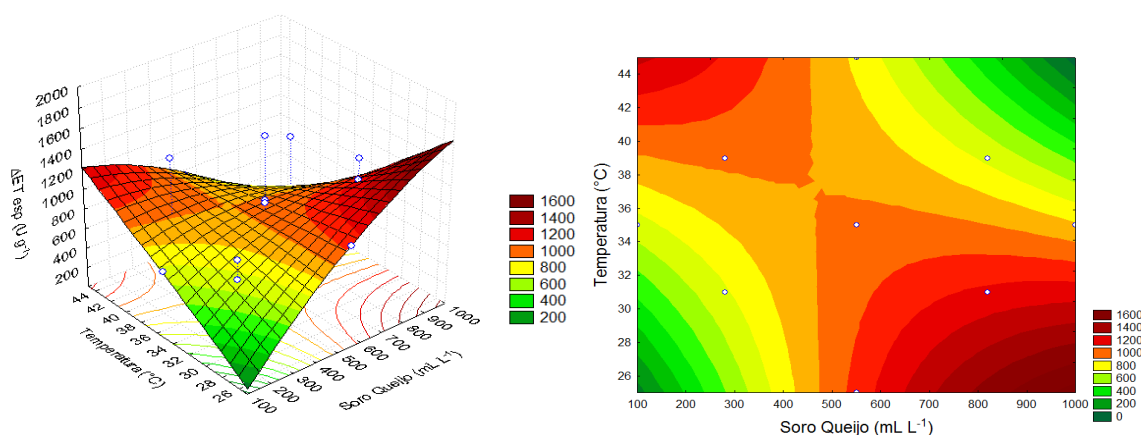


Figura 12. Superfície de resposta e diagrama de contorno da atividade enzimática específica ( $U g^{-1}$ ) em função da temperatura ( $^{\circ}C$ ) e da concentração de soro de queijo ( $mL L^{-1}$ )

Pode-se observar na Figura 12 que as concentrações de soro de queijo entre 900 e 1000  $mL L^{-1}$  e temperatura entre 25 e 26 $^{\circ}C$  conduzem a valores de atividade enzimática específica na faixa de 1600  $U g^{-1}$ . No entanto, o modelo também mostra que em concentrações de soro de queijo entre 100 e 200  $mL L^{-1}$  (4,8 a 9,6  $g L^{-1}$  de lactose) e temperatura entre 44 e 45 $^{\circ}C$ , é possível alcançar bons níveis de atividade enzimática específica, na faixa de 1200  $U g^{-1}$ . Apesar da *K. marxianus* demonstrar alguma sensibilidade nas temperaturas de 44 $^{\circ}C$ , quando em conjunto com baixas concentrações de soro de queijo,



apresentam bons resultados de atividade enzimática específica, assim como nos experimentos de Scholz (2011), que a 44 °C e 9 g L<sup>-1</sup> de lactose no cultivo, obteve 1323,4 U g<sup>-1</sup>.

A partir da equação 8 foi possível gerar a superfície de resposta (Figura 13) para analisar as melhores condições de concentração de milhocina e temperatura para produção da  $\beta$ -galactosidase, expressa em valores de atividade enzimática específica.

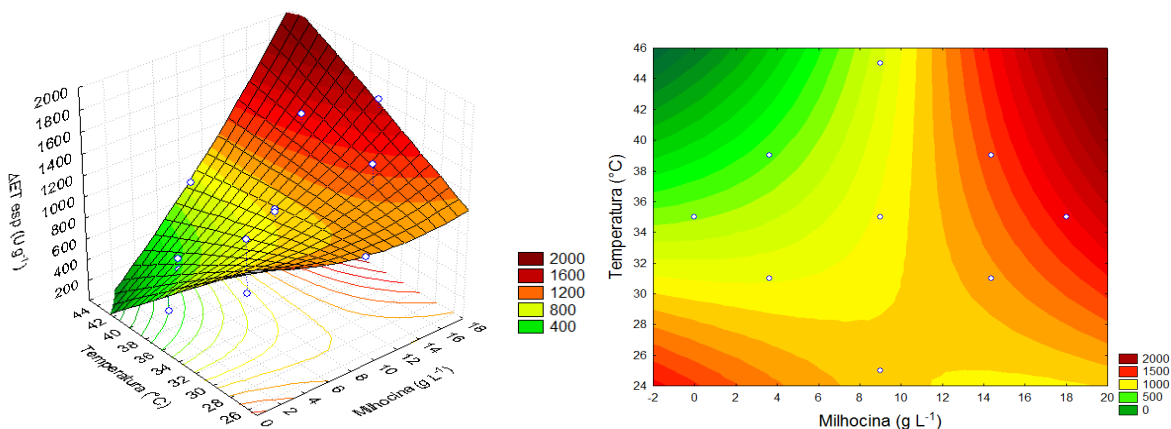


Figura 13. Superfície de resposta e diagrama de contorno atividade enzimática específica (U g<sup>-1</sup>) em função da temperatura (°C) e da concentração de milhocina (g L<sup>-1</sup>)

A Figura 13 indica que concentrações de milhocina acima de 18 g L<sup>-1</sup> e temperatura acima de 42°C propiciam altos valores de atividade enzimática específica, em torno de 2000 U g<sup>-1</sup>.

A Figura 14 apresenta os valores observados experimentalmente versus os valores previstos pelo modelo para a atividade enzimática específica.

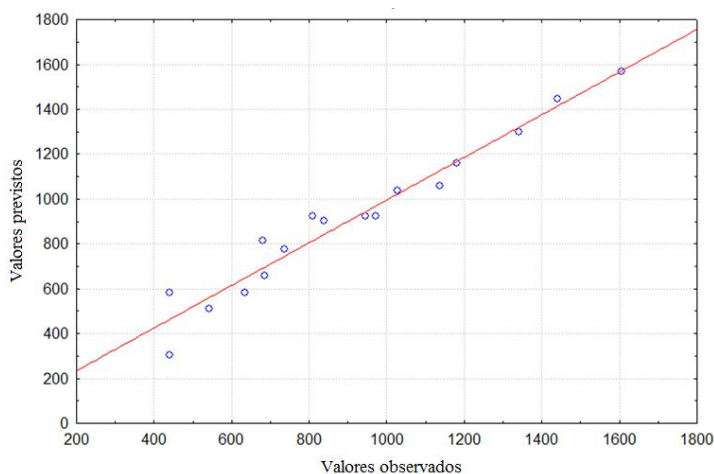


Figura 14. Valores observados *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática específica (U g<sup>-1</sup>)

Como pode ser observado no gráfico comparativo dos valores observado versus os valores previstos, para  $R^2 = 95,09\%$ , a distribuição dos resíduos se mostrou normal.

Com a composição de  $70 \text{ g L}^{-1}$  de lactose proveniente do soro de queijo e  $100 \text{ g L}^{-1}$  de milhocina a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , depois de 48 h de cultivo, Manera *et al.* (2011), obtiveram o valor máximo de  $1400 \text{ U g}^{-1}$  para atividade enzimática específica. Neste trabalho alcançamos um valor de atividade enzimática específica 12,84% maior, na metade do tempo de cultivo e em concentrações de nutrientes muito menores. Este fato pode estar relacionado com a agitação utilizada em cada um dos trabalhos, sendo que para atingir  $1400 \text{ U g}^{-1}$  utilizaram  $180 \text{ min}^{-1}$ , enquanto que para atingir  $1606,20 \text{ U g}^{-1}$  este trabalho utilizou  $220 \text{ min}^{-1}$ . De acordo com Wang *et al.* (1979), o fornecimento de oxigênio em processos de fermentação ocorre por meio da agitação e aeração, de modo ao se trabalhar ensaios em *shaker*, somente a agitação é responsável pela oxigenação do meio de cultivo. Para leveduras facultativas apresentarem tendência de seguir a via respiratória, a quantidade de oxigênio dissolvido deve estar em uma concentração apropriada, sendo que segundo Rech e Ayub (2007), no caso da *K. marxianus*, uma limitação de oxigênio leva a ocorrência da via fermentativa, ocasionando a produção de etanol e menor produção de enzima.

A escolha de uma rotação maior, adotada neste trabalho, foi definida em função dos resultados obtidos por Scholz (2011), que concluiu que a agitação não era uma variável estatisticamente significativa para produção da enzima, mas que na rotação de  $220 \text{ min}^{-1}$  obtinha-se os maiores valores de produção da enzima. Testes preliminares foram realizados neste trabalho, com rotações superiores a  $220 \text{ min}^{-1}$ , no entanto, por problemas operacionais, optou-se por manter em  $220 \text{ min}^{-1}$ . Nos trabalhos preliminares do grupo, pode-se constatar que a agitação está diretamente relacionada com a aeração, e conseqüentemente com a disponibilidade de oxigênio no meio.

A produtividade máxima em células também foi avaliada aplicando o teste ANOVA com 95% de confiabilidade, obtendo-se apenas a variável soro de queijo como estatisticamente significativa. O coeficiente de correlação obtido foi 0,78 e uma equação do modelo for gerada permitindo gerar superfícies de resposta para analisar as melhores condições de produtividade máxima.

A Figura 15 indica que concentrações de milhocina entre 2 e  $10 \text{ g L}^{-1}$  e concentrações de soro de queijo na faixa de 600 a  $800 \text{ mL L}^{-1}$  propiciam os maiores valores de produtividade máxima, acima de  $0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Conforme resultados da Tabela 6, com concentrações intermediárias de soro de queijo e sem milhocina, o experimento 11 obteve a maior

produtividade máxima em células,  $0,453 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , condição diferente a qual se obteve maior atividade enzimática volumétrica.

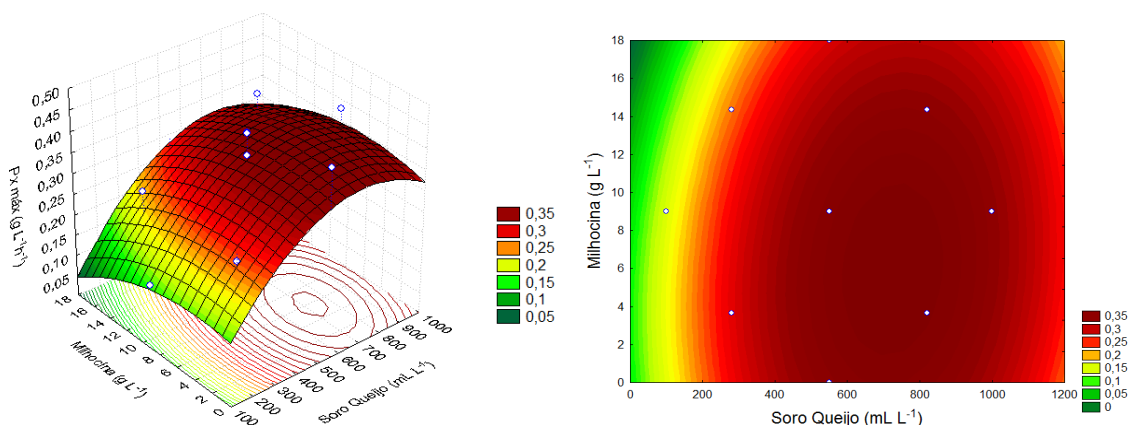


Figura 15. Superfície de resposta e diagrama de contorno concentração da produtividade máxima em células ( $\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em função da concentração de milhocina ( $\text{g L}^{-1}$ ) e da concentração de soro de queijo ( $\text{mL L}^{-1}$ )

A partir dos resultados obtidos neste planejamento fatorial, observou-se que a melhor condição para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, sob o parâmetro de resposta, atividade enzimática volumétrica ( $\text{U mL}^{-1}$ ), é obtida quando se utiliza os valores máximos da variável soro de queijo, em conjunto dos valores máximos de milhocina, conforme indica a superfície de resposta exposta na Figura 8. No entanto, com relação a variável temperatura, os resultados do modelo proposto pelo DCCR indicam os menores valores, de 31 a  $25^\circ\text{C}$ . A escolha da condição otimizada para produção da  $\beta$ -galactosidase, fundamentou-se nos resultados obtidos no planejamento, com algumas adequações com relação à variável temperatura e concentração de soro de queijo.

#### 4.2 Estudo da validação dos resultados obtidos no Planejamento Experimental

Para a segunda etapa deste trabalho, foi coletado novo lote de soro de queijo, fornecido pela mesma indústria que cedeu o primeiro lote, a Indústria Do Vale. Com relação à temperatura utilizada, constatou-se na literatura que os melhores resultados de produção de enzima  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* são reportados entre o intervalo de 30 a  $35^\circ\text{C}$  (FURLAN *et al.*, 2001, SCHNEIDER *et al.*, 2001; RECH e AYUB, 2007; MANERA, 2011; BRAGA *et al.*, 2012), enquanto que o planejamento indica a temperatura na condição ótima, de 31 a  $25^\circ\text{C}$ . Sendo assim, foi realizada uma triplicata, da condição  $958 \text{ mL L}^{-1}$  de

soro de queijo ( $46 \text{ g L}^{-1}$  de lactose),  $18 \text{ g L}^{-1}$  de milhocina e temperatura de  $31^\circ\text{C}$ . O gráfico da Figura 16 apresenta os valores das triplicatas e seus desvios padrões:

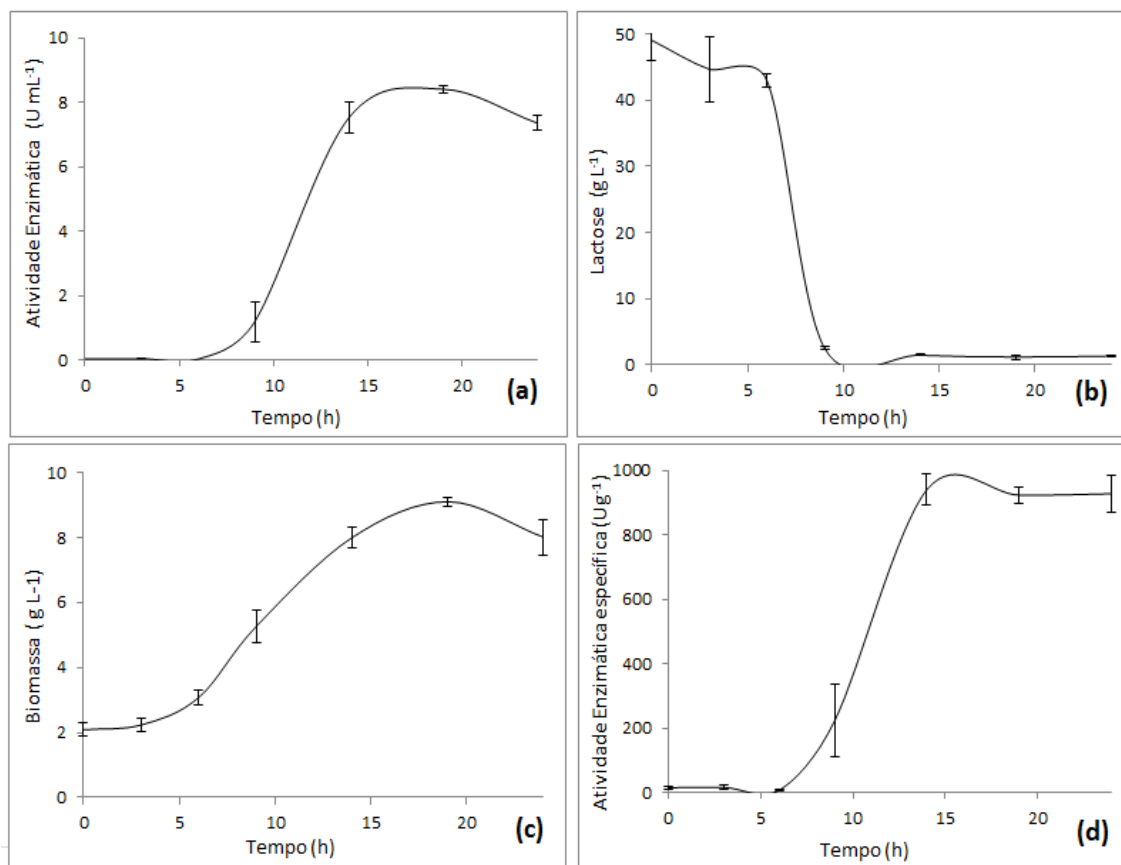


Figura 16. Perfil da fermentação em triplicata da *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 na condição ótima para atividade enzimática volumétrica (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c) e atividade enzimática específica (d).

A partir dos gráficos gerados na Figura 16, é possível verificar que o consumo de substrato acontece até o tempo de 9 horas de fermentação, enquanto que o crescimento celular e a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase apresentam caráter evolutivo até o tempo de 19 horas. Exatamente neste tempo de processo, foi determinada a atividade enzimática volumétrica igual a  $8,41 \pm 0,12 \text{ U mL}^{-1}$ , sendo que pelo o modelo proposto pela Equação 10 (aplicado aos valores reais das variáveis), a previsão da atividade enzimática máxima foi  $9,26 \text{ U mL}^{-1}$ , fato este que comprova a confiabilidade do modelo proposto para esta variável de resposta, apesar do valor encontrado estar 9,1% menor do que o previsto.

### 4.3 Ensaios em Biorreator

Por meio do acompanhamento do cultivo de *K. marxianus* em soro de queijo e milhocina realizado em biorreator Biostat B, foi possível estudar a influência da agitação e da aeração traduzida em termos do coeficiente de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ), bem como verificar o modelo proposto pelo planejamento experimental DCCR, na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase.

De acordo com Schneider *et al.* (2001), culturas de *Kluyveromyces marxianus* tornam-se limitadas pela concentração de oxigênio dissolvido no meio, deixando de produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase e passando a produzir etanol, paralelamente à produção de biomassa, sendo que a maior atividade enzimática obtida, não necessariamente, foi no maior valor de  $K_{La}$ . Neste mesmo trabalho os autores, após definirem o melhor valor de  $K_{La}$  para a produção da enzima, realizaram testes que combinaram diferentes valores de agitação e aeração, neste  $K_{La}$  pré-determinado, para a encontrar o maior valor de atividade enzimática. Os autores concluíram que para o mesmo valor de  $K_{La}$  ( $60 \text{ h}^{-1}$ ), o binômio agitação ( $700 \text{ min}^{-1}$ ) e aeração ( $0,66 \text{ vvm}$ ) forneceram os maiores valores de atividade enzimática volumétrica, igual a  $33 \text{ U mL}^{-1}$ .

Neste trabalho, as duplicatas dos cultivos foram realizadas em volume útil de 1,5 litros, a  $31^\circ\text{C}$ , com agitação e aeração variando em duas condições diferentes: (a)  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $2 \text{ L min}^{-1}$  de ar e (b)  $400 \text{ min}^{-1}$  e  $4 \text{ L min}^{-1}$  de ar, o que equivale a  $K_{La}$  de 19 e  $53 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. O meio de cultivo utilizado nos ensaios continha  $900 \text{ mL L}^{-1}$  de soro de queijo (equivalente à  $25 \text{ g L}^{-1}$  de lactose) e  $18 \text{ g L}^{-1}$  milhocina.

Na Figura 17 está demonstrada a produção da lactase por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 com monitoramento do oxigênio dissolvido, atividade enzimática, consumo de lactose, produção de biomassa e etanol, durante os cultivos realizados no biorreator para a condição (a)  $200 \text{ min}^{-1}$ ,  $2 \text{ L min}^{-1}$  e  $K_{La}$  de  $19 \text{ h}^{-1}$ . De modo geral, pode-se verificar que o consumo de substrato foi completo após 14 horas de cultivo, sendo que a partir deste tempo não houve mais produção de  $\beta$ -galactosidase, alcançado a valor máximo de  $4,53 \pm 0,46 \text{ U mL}^{-1}$  em 24 h de cultivo. Neste mesmo tempo, a quantidade máxima de biomassa,  $8,25 \pm 0,35 \text{ g L}^{-1}$  foi produzida, enquanto que a quantidade de oxigênio dissolvido disponível no meio reduziu-se consideravelmente até o tempo de 3 h de cultivo, mantendo-se constante até o fim do cultivo. Esta limitação de oxigênio no meio de cultivo, favoreceu o metabolismo anaeróbico da levedura levando à produção de etanol. Assim como observado por outros

autores, devido a presença de álcool desidrogenase (FLORES *et al.*, 2000). Após algumas horas de cultivo, o etanol passou a ser consumido, contribuindo, para a elevação da quantidade de biomassa produzida (FURLAN *et al.*, 2001).

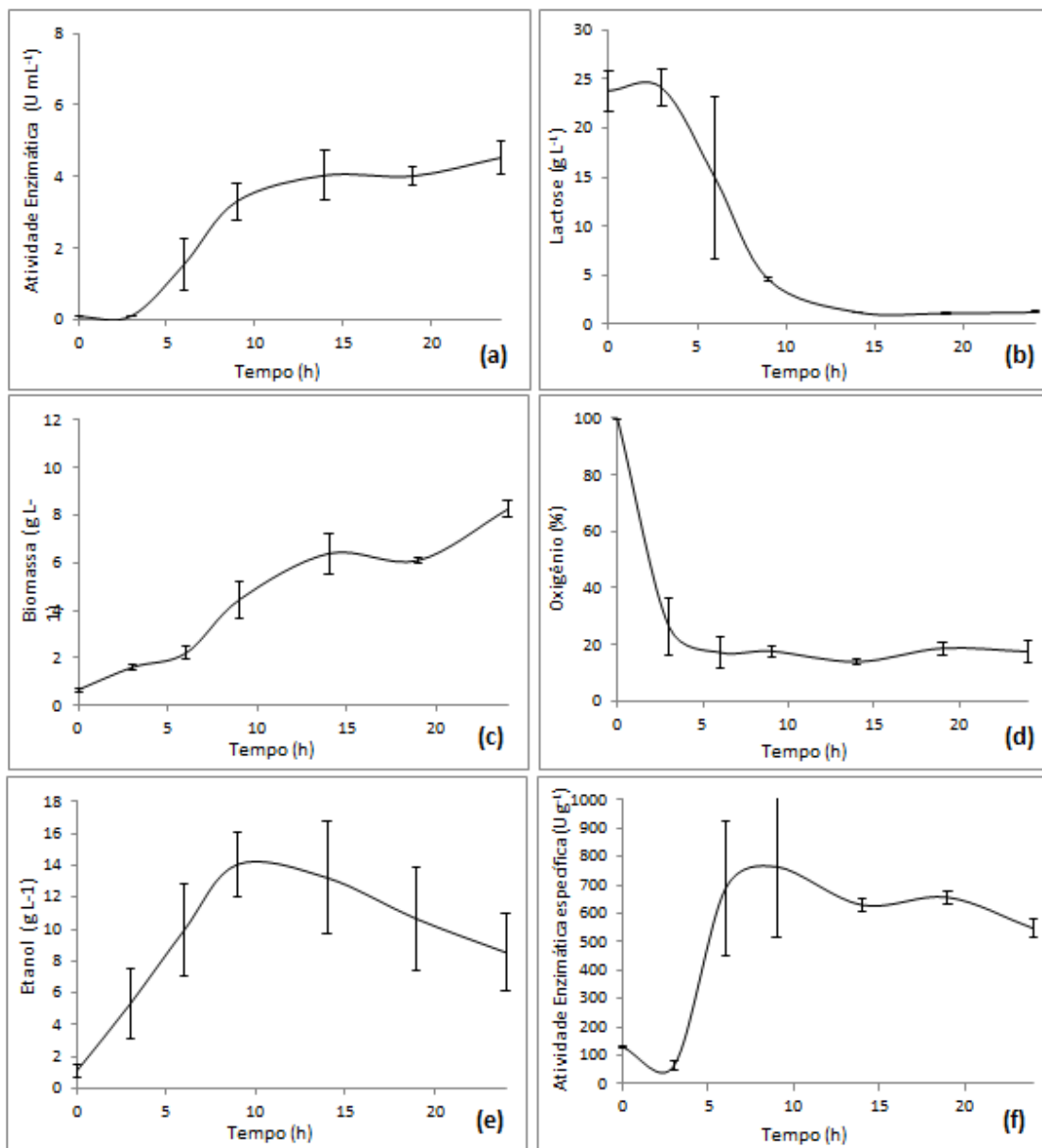


Figura 17. Acompanhamento da produção de  $\beta$ -galactosidase para condição  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $2 \text{ L min}^{-1}$  para atividade enzimática volumétrica (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c), oxigênio dissolvido (d), produção de etanol (e) e atividade enzimática específica (f).

Na Figura 18 está demonstrado o acompanhamento da produção da lactase por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 com monitoramento do oxigênio dissolvido, atividade

enzimática, consumo de lactose, produção de biomassa e etanol, durante as fermentações realizadas no biorreator para a condição (b)  $400 \text{ min}^{-1}$ ,  $4 \text{ L min}^{-1}$  e  $K_{La}$  de  $53 \text{ h}^{-1}$ .

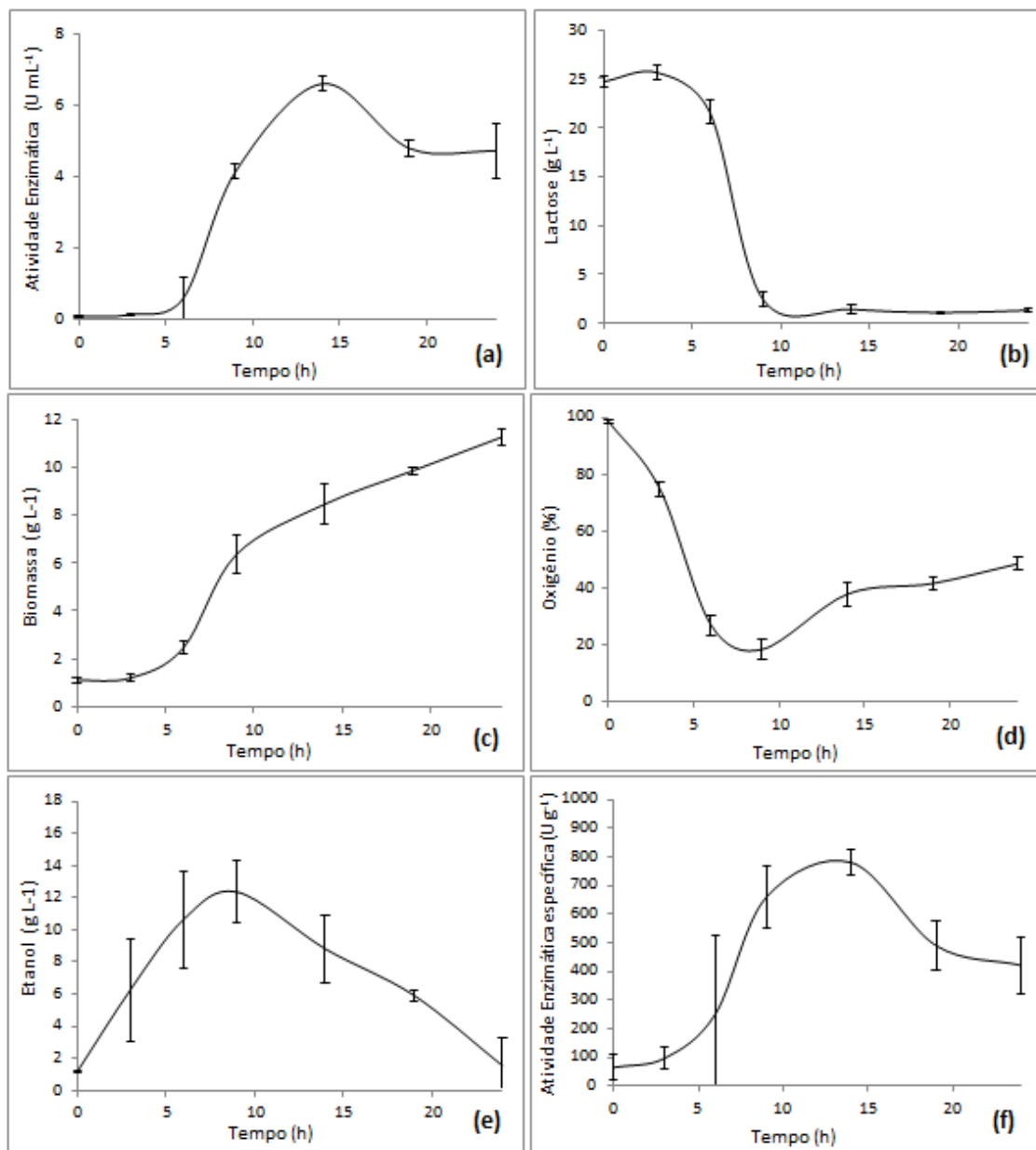


Figura 18. Acompanhamento da produção de  $\beta$ -galactosidase para condição  $400 \text{ min}^{-1}$  e  $4 \text{ L min}^{-1}$  para atividade enzimática (a), consumo de lactose (b), produção de biomassa (c), oxigênio dissolvido (d), produção de etanol (e) e atividade enzimática específica (f).

A atividade enzimática máxima foi encontrada no tempo de 14 horas de cultivo, alcançando  $6,59 \pm 0,20 \text{ U mL}^{-1}$ , enquanto que a produção de biomassa foi observada até o fim do cultivo, em virtude do consumo de etanol, tal como observado na condição anterior. No

entanto, devido a maior condição de oxigenação nesta condição, houve formação de menor quantidade de etanol permitindo seu consumo na sua totalidade em 24 horas de cultivo. O comportamento de consumo de substrato foi observado na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* em biorreator, havendo uma queda de forma significativa a partir de 6 horas de cultivo, assim como observado por outros autores (RECH *et al.*, 1999; LONGHI *et al.*, 2004; ALVES, 2008). Pode-se observar que a lactose foi praticamente consumida por completo até as 9 horas de cultivo, sendo acompanhada por uma ligeira queda no teor de oxigênio disponível no meio até 20% estabilizando em seguida em 40 % de O<sub>2</sub> após as 14 horas até o término do cultivo.

Rech *et al.* (1999) ao avaliar a produção da lactase pela mesma linhagem de *K. marxianus* em biorreator, a partir de 50 g L<sup>-1</sup> de lactose de soro de queijo em condições de agitação e aeração de 500 min<sup>-1</sup>, 3 L min<sup>-1</sup> e 2 vvm, obteve fator de conversão de substrato em células (Y<sub>X/S</sub>) de 0,287 g g<sup>-1</sup>, fator de conversão de substrato em enzima (Y<sub>P/S</sub>) de 129,7 U g<sup>-1</sup> e atividade enzimática de 5 U mL<sup>-1</sup>. Na condição (b) deste trabalho, com 25 g L<sup>-1</sup> da concentração de lactose contidas em soro de queijo, pode-se observar um fator de conversão de substrato em enzima duas vezes maior, de 266,7 U g<sup>-1</sup>, enquanto que o fator de conversão de substrato em células e a atividade enzimática foram de 0,300 g g<sup>-1</sup> e 6,59 ± 0,20 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes dados mostram que a condição proposta neste trabalho é interessante para produção da enzima, uma vez que os parâmetros cinéticos poderão ser utilizados no desenvolvimento de trabalhos, visando a viabilidade no emprego industrial.

Uma alternativa recente exposta na literatura, é o desenvolvimento de modelos matemáticos para aumento da atividade enzimática volumétrica da  $\beta$ -galactosidase no cultivo de *K. marxianus* em biorreator. Como exemplo, Choonia e Lele (2013) propuseram um modelo matemático para diferentes estratégias de cultivo. A partir de 10 g L<sup>-1</sup> de lactose PA em condições de agitação e aeração de 250 min<sup>-1</sup> e 0,5 vvm obtiveram 2,0 U mL<sup>-1</sup>, elevando este valor para 5,55 U mL<sup>-1</sup>, quando aplicado o cultivo semi-contínuo, executando quatro regenerações de 50% (v/v) do meio de cultivo.

Outros autores avaliaram os efeitos da agitação e aeração a fim de maximizar a produção de  $\beta$ -galactosidase de *K. marxianus* em biorreator, sob uma quantidade inicial de lactose, muito próxima à deste trabalho, contida no meio de cultivo (ALVES *et al.*, 2010). No entanto, estes autores utilizaram lactose PA (28,8 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, em conjunto de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, enquanto que neste trabalho, o meio de cultivo foi elaborado apenas pelos resíduos agroindustriais, soro de queijo, tendo a lactose como fonte de carbono (25 g L<sup>-1</sup>) e a milhocina, como fonte de nitrogênio. A fim de



ilustrar e comparar as condições (a) e (b) deste trabalho, com os resultados obtidos por Alves *et al.* (2010), a Tabela 9 demonstra os resultados das condições analisadas em biorreator para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Tabela 9: Comparativo de aeração, agitação e atividade enzimática volumétrica entre as condições de cultivo em biorreator.

	Condições deste trabalho		ALVES <i>et al.</i> (2010)				
	(a)	(b)	1	2	3	4	5
Agitação ( $\text{min}^{-1}$ )	200	400	200	500	200	500	350
Aeração ( $\text{L min}^{-1}$ )	2	4	0,75	0,75	2,25	2,25	1,5
vvm	1,33	2,67	0,5	0,5	1,5	1,5	1
$K_{La}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	19	53	48,8	79,8	61,4	167,2	91,6
Atividade Enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )	$4,53 \pm 0,46$	$6,59 \pm 0,20$	4,7	11,4	3,2	14,7	7,6

É interessante observar que a condição (a) deste trabalho que apresentou o menor valor de  $K_{La}$  ( $19 \text{ h}^{-1}$ ) corresponde aquela em que se obteve menor valor de atividade enzimática volumétrica, enquanto que a condição (b) com maior valor de  $K_{La}$  ( $53 \text{ h}^{-1}$ ) corresponde aquela em que se obteve maior produção de enzima. O mesmo comportamento pode ser observado nos experimentos 1 a 5 realizado por Alves *et al.*, (2010), sendo que no Ensaio 4, cujas condições de processo foram mais intensas ( $500 \text{ rpm}$  e  $1,5 \text{ vvm}$ ) com valor de  $K_{La}$  mais elevado obteve-se o melhor resultado para atividade enzimática.

No entanto, ao comparar experimentos de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio próximos, observou-se uma maior produção de enzima de  $6,59 \pm 0,20 \text{ U mL}^{-1}$  no Ensaio (b) de  $K_{La}$  igual a  $53 \text{ h}^{-1}$ , contra  $4,7 \text{ U mL}^{-1}$  do obtido no Ensaio 1, de  $K_{La}$  igual a  $48,8 \text{ h}^{-1}$ . Vale ressaltar no entanto que para alcançar este valor de  $K_{La}$ , este trabalho utilizou  $400 \text{ min}^{-1}$  e  $2,67 \text{ vvm}$ , enquanto Alves *et al.*, (2010) utilizaram  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $0,5 \text{ vvm}$ , evidenciando a dificuldade em alcançar altos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio neste trabalho, considerando o meio de cultivo utilizado, possivelmente em virtude da presença de íons do meio de cultivo formado unicamente por soro de queijo e milhocina, já que o tipo e tamanho do reator e do agitador foram os mesmos em ambos. A condição (a) se aproxima mais da agitação e aeração do Ensaio 1, com  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $1,33 \text{ vvm}$ , porém o  $K_{La}$  obtido foi de apenas  $19 \text{ h}^{-1}$ , bem distante dos  $48,8 \text{ h}^{-1}$ .

Segundo Borzani *et al.* (2005) a resistência associada à difusão do oxigênio até as células poderia ser desprezada, fazendo com que possa haver o transporte convectivo do oxigênio, quando o líquido está suficientemente agitado. No entanto, esta hipótese pode não se verificar em meios de cultivo com a presença de muitas substâncias dissolvidas, como

observado nos estudos de Arauz (2011) que ao avaliar a produção de inulinase, em biorreator, a partir de leite desnatado como meio de cultivo, sob condições de aeração e agitação de  $200 \text{ min}^{-1}$  e  $2 \text{ L min}^{-1}$  obteve um valor de  $K_{La}$  de apenas  $4,33 \text{ h}^{-1}$ , valor este 77% menor, do que o  $K_{La}$  ( $19 \text{ h}^{-1}$ ) obtido no experimento (a) deste trabalho, sob as mesmas condições de agitação e aeração. No cômputo final, a presença de muitas substâncias dissolvidas, reduzem a concentraBoa tarde ção de saturação do oxigênio em relação ao valor observado para meios com poucas substânBcias dissolvidas.

Nestes ensaios em biorreator, esperava-se alcançar, pelo menos, valores de atividade enzimática volumétrica próximos ao valor previsto pelo modelo gerado na análise estatística do planejamento deste trabalho. O modelo da Equação 10, gerado no planejamento experimental DCCR realizado em *shaker*, prevê o valor da atividade enzimática volumétrica de  $7,78 \text{ U mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos nos ensaios realizados forneceram os valores de  $6,59 \pm 0,20 \text{ U mL}^{-1}$  para  $K_{La}$  de  $53 \text{ h}^{-1}$  e  $4,53 \pm 0,46 \text{ U mL}^{-1}$  para  $K_{La}$  de  $19 \text{ h}^{-1}$ . A diferença do valor previsto pelo modelo foi de 25,3% para a condição (a) e 15,3% para a condição (b), indicando que a condição (b) em biorreator se aproximou mais das condições de agitação e aeração dos experimentos em *shaker*, que geraram o modelo.

## CONCLUSÃO

A melhor condição do meio foi avaliada sob cultivo submerso em *shaker*, como sendo 1000 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo (48 g L<sup>-1</sup> de lactose), 18 g L<sup>-1</sup> de milhocina e temperatura de 31 °C, com agitação fixada em 200 min<sup>-1</sup> para produção da enzima β-galactosidase a partir dos resíduos agroindustriais soro de queijo e milhocina, de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

A análise de variância, realizada através da aplicação do teste ANOVA, para a atividade enzimática volumétrica mostrou que todos os fatores dependentes e suas interações de segunda ordem para um nível de confiança de 95% mostraram-se significativos, exceto a temperatura, em seu fator de segunda ordem.

O uso do DCCR não apenas auxiliou na seleção das variáveis que mais influenciavam na produção de β-galactosidase, como possibilitou o conhecimento das concentrações em que as fontes de carbono e nitrogênio avaliadas deveriam ser adicionadas ao meio para aumentar a produção da enzima. Essa ferramenta permitiu a escolha da condição para realização da validação do planejamento e do processo em escala ampliada.

O planejamento fatorial utilizado pode ser validado em triplicata para o parâmetro de resposta escolhido, a atividade enzimática volumétrica. A condição utilizada nos experimentos de validação de 958 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo (46 g L<sup>-1</sup> de lactose), 18 g L<sup>-1</sup> de milhocina e temperatura de 31 °C, previa pelo modelo gerado no DCCR a atividade enzimática volumétrica de 9,26 U mL<sup>-1</sup>, sendo que o valor encontrado foi de 8,41 ± 0,12 U mL<sup>-1</sup>, o equivalente a 9,1% menor.

Em função de uma não homogeneidade do terceiro lote de soro de queijo utilizado nos cultivos, a condição utilizada nas bateladas em biorreator de 900 mL L<sup>-1</sup> de soro de queijo, apresentou apenas 25 g L<sup>-1</sup> de lactose, em conjunto de 18 g L<sup>-1</sup> de milhocina e temperatura de 31 °C. Nesta condição avaliou-se duas condições de agitação e aeração diferentes, uma mais branda ( $K_{La} = 19 \text{ h}^{-1}$ ) e outra mais severa ( $K_{La} = 53 \text{ h}^{-1}$ ), sendo que a melhor condição estabelecida para a produção da β-galactosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 com soro de queijo e milhocina foi com agitação de 400 rpm e aeração de 2,67 vvm, alcançando uma atividade enzimática de 6,59 ± 0,20 U mL<sup>-1</sup> em 14 horas de cultivo. Em ambas as condições, foi observada a produção de etanol até as 9 horas de cultivo, seguido do consumo do mesmo até o fim dos cultivos, influenciando assim, no consumo de substrato, na produção de biomassa e levemente, na produção de enzima.

Os resultados preliminares apontaram soro de queijo, milhocina e temperatura como parâmetros significativos, enquanto que a agitação, apesar de não ter sido considerada

significativa, mostrou-se importante para produção da lactase. Em agitação pré-estabelecida, um novo planejamento experimental proposto neste trabalho, gerou um modelo matemático e convergiu para a melhor condição de meio de cultivo e de temperatura. A influência da agitação e da aeração pode ser avaliada, em condição de cultivo similar, sendo que a condição (a) em biorreator ficou distante do valor previsto pelo modelo para atividade enzimática volumétrica, enquanto que a condição (b) se aproximou. Portanto, conclui-se que a condição de agitação que gerou o modelo em *shaker*, foi reproduzida similarmente em biorreator, apenas na condição (b) de agitação e aeração, comprovando a importância da agitação na atividade enzimática.

Os resultados deste trabalho mostram um caminho a seguir na procura de soluções para o cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 com resíduos agroindustriais, soro de queijo e milhocina, para produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em biorreator, considerando a possível aplicação industrial deste processo.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a agitação e aeração na produção da enzima em biorreator em maiores valores de  $K_L a$ .
- Avaliar a influência da viscosidade do meio no coeficiente de transferência de oxigênio;
- Comparar o coeficiente de transferência de oxigênio e a produção da enzima, de meios de cultivo compostos por meios sintéticos e por resíduos agroindustriais;
- Avaliar técnicas para imobilização da enzima;
- Desenvolver diferentes estratégias de operação de cultivo submerso;
- Produzir a enzima com pH controlado.

## REFERÊNCIAS

ALVES, F. G. **Produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, RS – Brasil, 2008.

ALVES, F. G.; FILHO, F. M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Maximization of  $\beta$ -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemical Biotechnological**, v. 160, p. 1528–1539, 2010.

ARAUZ, L. J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* susp. Lactis ATCC 11454 em biorreator.** Tese de doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, SP – Brasil, 2011.

AZEREDO, L.A.I. D.; LIMA, M.B. D.; COELHO, R.R. R.; FREIRE, D.M.G. A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp.594 using feather meal and corn steep liquor. **Current Microbiology**, v. 53, p. 335–339, 2006.

BARBERIS, S. E.; SEGOVIA, R. F. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 11, p. 797–799, 1997.

BEYER, P. L. Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). Krause Alimentos, **Nutrição & Dietoterapia**. 10<sup>a</sup> edição. São Paulo: Roca, p. 643-670, 2002.

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

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia.** São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2005. V. 2: Processos fermentatitos e enzimáticos.

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

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. G.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for  $\beta$ -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1653-1663, 2012.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC. Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil. Secretaria de Inovação – SI, Fundação BIO-RIO, de setembro de 2012. Disponível em: <[http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1350494454.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1350494454.pdf)> Acesso em junho de 2013.

BROUNS, F.; VERMER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 23-44, 2000.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 3ª Edição, p. 751, 2000.

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

CHOONIA, H. S.; LELE, S. S. Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for  $\beta$ -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 49-57, 2013.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, 2009.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus Níger*  $\beta$ -galactosidase production by yeast in continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1151-1154, 2005.

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

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008.

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

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  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium. **Acta Biotechnology**, v. 21, p. 57 – 64, 2001.

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacterias, yeast and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

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

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

GUTERRES, M. A.; DETTMER, F. R.; SOUZA, L. A.; SOUSA, M. F. Applications of biotechnology in leather. **China Leather**, v. 38, n. 23, p. 12-16, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, SP – Brasil, 2006.

IGGETT W. R. KOFFLER H. Corn steep liquor in microbiology. Universidade Lafayette. Vol. 12. U.S.A. 1998. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180696/pdf/bactrev00003-0030.pdf>> Acesso em maio de 2013.

JOSHI, Y.; SENATORE, B.; POLETTO, M. *Kluyveromyces marxianus* biofilm in cheese whey fermentation for bioethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 493-498, 2011.

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

KIM, C. S.; JI, E.; OH, D. A. A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 738-743, 2004.

KLEIN, M. P. **Imobilização de  $\beta$ -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, RS – Brasil, 2010.

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

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

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 7a reimp. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 1: Componentes moleculares das células, 1997.



- LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 297-311, 1948.
- 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  $\beta$ -galactosidase em soro de leite.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul / RS, 2011
- LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 33-37, 2009.
- LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. **Alimentary, Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 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**, v. 31, p. 35–40, 2004.
- 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**, v. 102, p. 6494–6501, 2011.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.
- 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  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2011.
- MAO, X.; 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**, v. 40, p. 1667–1672, 2005.
- MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H. ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1233-1240, 2008.
- 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.

MATTANNA, P. **Desenvolvimento de requeijão cremoso com baixo teor de lactose produzido por acidificação direta e coagulação enzimática**. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brasil, 2011.

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, n. 2, p. 187-191, 2006.

MUNIZ, M. Confusão no diagnóstico da intolerância à lactose, 2010, Disponível em: <<http://www.wallstreetfitness.com.br>> Acesso em: 22/05/2013.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDNI, E.  $\beta$ -galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 10-15, 2011.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S.  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin Carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes – review. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces strains*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and  $\beta$ -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-698, 2012

QUINTAS, M. A. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Modelling colour changes during the caramelisation reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 4, p. 483-491, 2007.

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

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS – Brasil, 1998.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

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

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

RODRIGUES, M. Q. R. B. **Expressão heteróloga de celulases em *Kluyveromyces marxianus* para utilização em bioprocesso consolidado na produção de etanol celulósico.** Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, 2012.

RUSYNYK, R. A.; STILL, C. D. Lactose intolerance. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 101, p. 10-12, 2001.

SANTIAGO, P.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia Alimentícia**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.

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

SCHOLZ, E. B. **Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de  $\beta$ -galactosidase.** Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC – Brasil, 2011.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O Y.; MAUGERI, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.

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**, v. 36, p. 930–936, 2005.

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 – Brasil, 2006.

SONG, Y. S.; LEE, J. H.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Performance of  $\beta$ -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during enzyme immobilization process. **Food Chemistry**, v. 23, p. 1–5, 2010.

SOUZA, F. R. **Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e coenzimáticos.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade federal do Rio Grande do Sul, RS – Brasil, 2010.

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American Family Physician**, v. 65, n. 9, p. 1845–1850, 2002.

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

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 em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brasil, 2008.

TRINDADE, M. C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfactantes.** Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Minas Gerais, MG – Brasil, 2002.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** Santa Maria: Editora da UFSM, 192 p., 2003.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in Milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 2, p. 75-85, 2001.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, SP – Brasil, 2009.

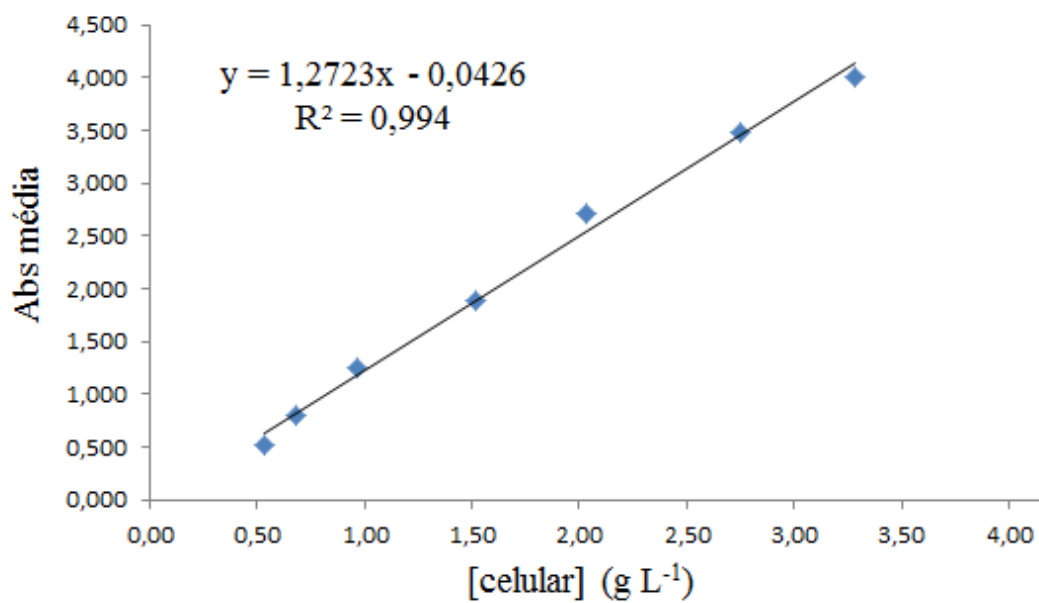
VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, MG – Brasil, 2001.

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

WALKER, G. M. **Yeasts physiology and biotechnology.** Ed. John Wiley & Sons Ltd. New York. 1998.

WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEIMAN, A. L.; HUMPHREY, A. E.; LILLI, M. D. **Fermentation and enzyme technology.** New York, Toronto. John Wiley & Sons, 1979.

## ANEXOS

**ANEXO 1: CURVA DE CORRELAÇÃO ABSORBÂNCIA X MASSA SECA DE CÉLULAS DE *K. marxianus***

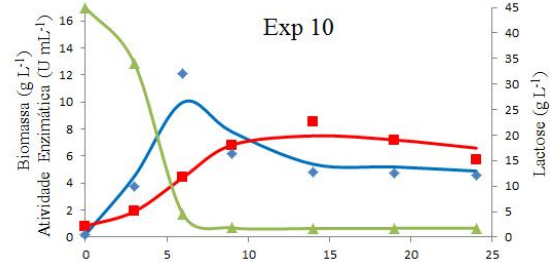
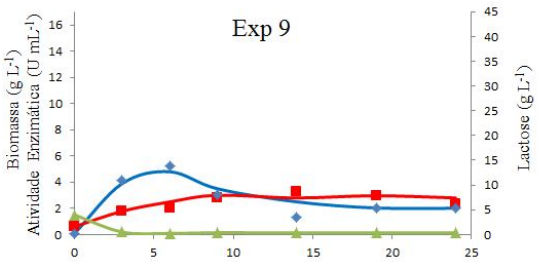
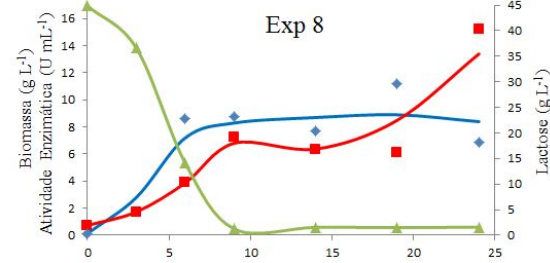
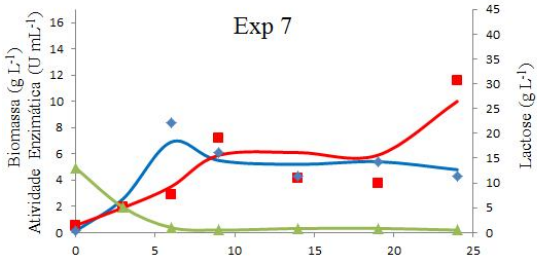
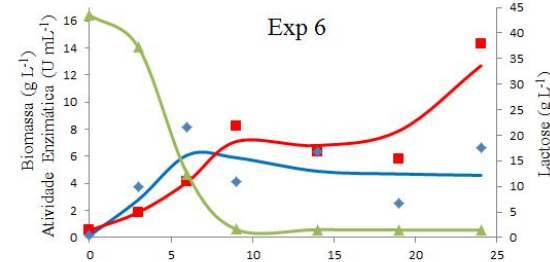
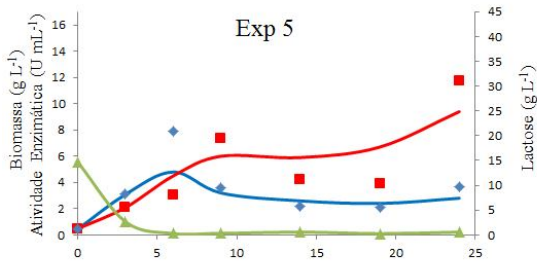
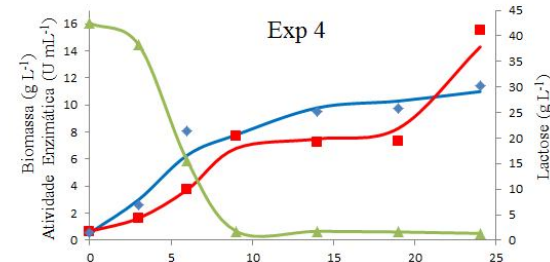
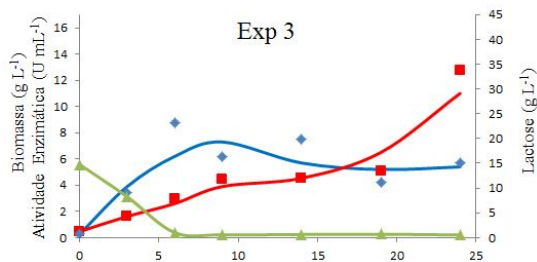
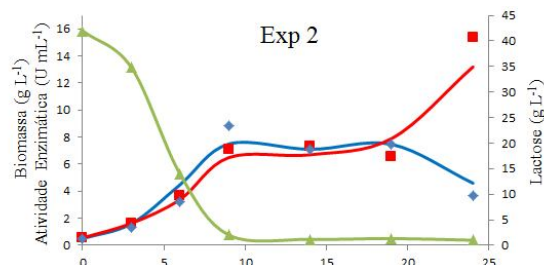
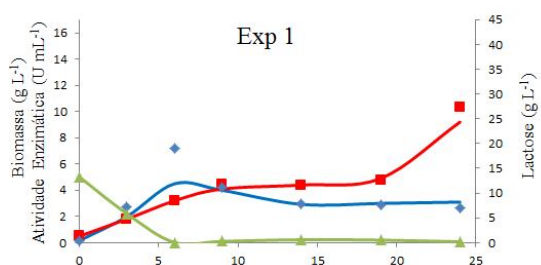
Legenda:

Abs média (600 nm) – absorvância média

[celular] (g/L) – massa seca

## ANEXO 2: CURVAS DO CONSUMO DA LACTOSE, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E $\beta$ -GALACTOSIDASE NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR

Legenda: ◆ Atividade Enzimática ■ Biomassa ▲ Lactose



Cont.

