



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE
CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis*

URM 6684

PATRÍCIA DE OLIVEIRA LEITE FARIAS

Recife

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE
CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis*
URM 6684

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: CELIANE GOMES MAIA DA SILVA

CO-ORIENTADORA: ANDRELINA MARIA PINHEIRO SANTOS

Recife

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE
CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis*
URM 6684

Por Patrícia de Oliveira Leite Farias

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 28/08/2015 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa Dra. Erilane Castro Lima de Machado
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Enayde de Almeida Melo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa Dra. Sharline Florentino de Melo Santos
Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho aos meus pais e padrinhos, por me apoiarem e acreditarem sempre no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu forças quando achei que não teria mais e que me permitiu ser capaz de realizar este trabalho. A meus pais, Ladicler e Paulo, e minha irmã Paula por me apoiarem e estarem do meu lado nas decisões mais importantes. Aos meus padrinhos, Ediclé e Calixto, pelo incentivo de sempre. Aos meus queridos avós, Maria da Conceição; José de Ribamar, Maria do Carmo e Djalma Severiano (*in memoriam*), meus tios Luiz Roberto, Ana Carla, Daniel José, Ednayran Gomes, Lenílson Oliveira, Lenilza Oliveira e toda a família Oliveira.

À minha família de João Pessoa, Andréa Luize, Conceição Valença, Diego Yweson, Wagner Wilker, Davi e Manoel, por terem me acolhido em suas casas, por todo o apoio dedicado a mim, pelas palavras de encorajamento, pelas conversas, pelo tempo de convivência e por ter tornado minha estada na cidade mais prazerosa.

Aos meus amigos de toda vida, Rosely Queiroz, Isabella de Lima, Viviane Nascimento, Lucimary Rodrigues, Mayra Barbosa, Eduardo Thomaz, Karina Vasconcelos, Carolina Dantas, André Valença, Rebeca Patrício, Taylane Oliveira, Roberta Quidute, Wallyson Oliveira e todos outros não citados.

Aos meus amigos e companheiros que conheci no mestrado, da simples palavra amiga, nas divisões de bancadas, no compartilhamento do conhecimento até os que viveram os dias mais difíceis do experimento: Maria Cláudia, Jesús David, Alinne Demétrio, Andressa Leite, Samara Macedo, Karinne Oliveira, Wallace Batista, Rita Cristina, Rosamaria Andrade, Jaqueline Ferreira e todos os outros que conheci durante o período de trabalho.

À minha orientadora professora Celiane, pela ajuda nos momentos mais difíceis. À minha co-orientadora professora Andreлина pelo apoio total à realização da minha pesquisa, pela ajuda e pela paciência. Às professoras Enayde Melo e Vera Arroxelas, por sempre estarem disponíveis a tirarem minhas dúvidas de laboratório.

Em especial à professora Sharline, Lorena, Débora, Renata, Felipe, e todos do laboratório de Bioengenharia da UFPB, pela disponibilidade do espaço para pesquisa, pela paciência em compartilhar os ensinamentos necessários pra minha pesquisa, pelo companheirismo e pelas palavras amigas de que tudo ia dar certo. Muito obrigada!

“Nós mesmos contribuimos para o que sentimos e percebemos, pois somos nós que escolhemos aquilo que nos é importante.”

Jostein Gaarder

RESUMO

O soro de leite ou de queijo é a porção aquosa do leite, rico em lactose, que se separa do coágulo durante a fabricação de queijos o que o torna efluente de grande relevância das indústrias de laticínios. Com os rápidos avanços em biotecnologia microbiana, considera-se boa alternativa para sua utilização, por ser um substrato barato e disponível, na obtenção de β -galactosidase, que é amplamente utilizada pelas indústrias farmacêutica e de alimentos. As fontes mais utilizadas para sua produção são as leveduras, como as espécies *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso do soro de queijo, de forma isolada ou combinada a outras fontes de carbono, para produção da enzima β -galactosidase, utilizando *Kluyveromyces lactis* URM 6684, empregando o planejamento de mistura simplex centroide. Foram realizadas 9 fermentações utilizando três fontes de carbono: soro de queijo, lactose PA e sacarose PA. Durante o estudo foram determinados valores de biomassa, pH e, após rompimento celular, atividade enzimática. Com relação à biomassa, meios com presença de sacarose obtiveram melhores resultados: E5(7,8 g/L), E8 (6,8 g/L) e E6 (6,1 g/L). A atividade enzimática apresentou-se com melhores resultados em meios com presença de soro de queijo: E1(0,65 U/mL), E4 (0,33 U/mL) e E6 (0,40 U/mL). A análise estatística evidenciou que a atividade enzimática apresentou melhor ajuste aos modelos quadrático e cúbico, a qual apresentou melhor ajuste aos modelos quadrático e cúbico, com coeficientes, R_A^2 , de 0,86 e 0,93. Os resultados encontrados demonstraram que o soro de queijo apresentou-se como uma fonte de carbono adequada e de baixo custo para produção da enzima, agregando maior valor para seu uso, além de reduzir os custos da produção da enzima β -galactosidase, aumentando sua disponibilidade no comércio a preços mais acessíveis e viabilizando sua aplicação na indústria de alimentos derivados de leite.

Palavras chave: soro de queijo; *Kluyveromyces lactis*; fermentação; simplex-centroide; β -galactosidase .

ABSTRACT

Cheese whey is the aqueous portion milk rich in lactose, which separates the curd during cheese manufacture which makes it of great importance effluent dairy industries. With the rapid advances in microbial biotechnology, it is considered good alternative to its use, as a substrate inexpensive and available in obtaining β -galactosidase, which is widely used for pharmaceutical and food industries. The sources most widely used for its production are yeasts, as the species *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. The objective of this study was to evaluate the feasibility of using the cheese whey, in isolation or in combination with other carbon sources for the production of β -galactosidase enzyme, using *Kluyveromyces lactis* URM 6684, using the planning simplex centroid mixture. 9 fermentations were carried out using three sources of carbon: cheese whey, lactose and sucrose PA PA. During the study it was determined biomass, pH and after cell disruption, enzymatic activity. With regard to biomass, medium with sucrose had better results E5 (7,8 g / L), E8 (6,8 g / L) and E6 (6,1 g / L). The enzyme activity is presented to best results in medium with cheese whey: E1 (0,65 U / ml), E4 (0,33 U / ml) and E6 (0,40 U / ml). Statistical analysis showed that the enzyme activity showed the best fit to the quadratic and cubic models, which presented the best fit quadratic and cubic models, with coefficients, $R_A^2 = 0.86$ and $R_A^2 = 0.93$. The results showed that whey was presented as a suitable source of carbon and low cost for production of the enzyme, adding more value to its use, and reduce the costs of production of β -galactosidase enzyme, increasing its availability commerce more affordable and enabling their application in the dairy food industry.

Keywords: cheese whey; *Kluyveromyces lactis*; fermentation; simplex-centroid; β -galactosidase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
Objetivo geral.....	11
Objetivos específicos.....	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 SORO DE QUEIJO	12
3.1.1 Impacto Ambiental.....	13
3.1.2 Alternativas de usos para o Soro de Queijo	14
3.2 FONTES DE CARBONO	16
3.2 PRODUÇÃO DE β- GALACTOSIDASE	18
3.2.1 β - galactosidase intracelular	22
3.3 <i>Kluyveromyces lactis</i>	23
4 REFERÊNCIAS	27
5 RESULTADOS	33
5.1 POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE POR <i>Kluyveromyces lactis</i> URM 6684	33
6 APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23), lactase, atua na catálise da hidrólise da lactose em seus açúcares constituintes (PARK; OH, 2010). Esta enzima apresenta importância comercial relevante na produção dos galactoligosacarídeos (GOS), ao catalisar a hidrólise da lactose, auxilia na prevenção da cristalização deste dissacarídeo em alimentos congelado, o consumo de leite e seus derivados por indivíduos com intolerância à lactose e minimiza os efeitos do impacto ambiental associados com a eliminação do soro de queijo (MARÍN-NAVARRO et al., 2014).

Lactossoro, ou soro de queijo como é mais conhecido, é o líquido resultante da separação da caseína e das gorduras no processo de elaboração do queijo. Uma vez que se constitui como boa fonte de nutrientes, pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de tecnologias que o utilizem como matéria-prima para a produção de novos alimentos ou como aditivos de alto valor nutricional (PESCUMA et al., 2010). De acordo com Guimarães et al. (2010) e Vicol (2012), a produção de soro de leite no mundo corresponde a mais de 160 milhões de toneladas por ano (estimada em nove vezes à produção de queijo), o que representa uma taxa de crescimento anual de 1% a 2%. Empresas que descartam o soro sem tratamento ou destino adequado, além de aumentar a poluição ambiental, perdem a oportunidade de explorar um mercado lucrativo, que possibilita a geração de emprego e renda.

Uma boa alternativa para a utilização deste subproduto é como substrato para o cultivo de microrganismos. Com isto, os rápidos avanços em biotecnologia microbiana, juntamente com a necessidade de substratos baratos e amplamente disponíveis levam a uma maior exploração do soro de queijo como fonte de lactose para fermentação e obtenção de produtos de valor agregado (GUIMARÃES et al., 2010). A hidrólise da lactose pode ocorrer com o uso de β -galactosidase. A importância industrial desta enzima está em sua aplicação industrial na obtenção de alimentos derivados de leite com baixo teor de lactose, bem como melhorar a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados (TOMAL, 2010).

A legislação brasileira especifica, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a β -galactosidase, ou lactase como é mais conhecida, deve ser de origem dos seguintes microrganismos, aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration), consideradas como seguros para aplicação em alimentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006).

A produção enzimática via microbiana, quando comparada com extração de animais e plantas, fornece um caminho mais eficiente e de maior rendimento, principal interesse para a indústria. Leveduras não convencionais, assim reconhecidas por serem ascomicetos e não pertencerem ao gênero *Saccharomyces*, vem sendo utilizadas para uma grande variedade biotecnológica. Suas aplicações vão desde a expressão de proteínas, síntese de enzimas e de produtos químicos, com importância na área de medicamentos e nutricional (JOHNSON, 2012).

O emprego de *Kluyveromyces* para a produção de lactases oferece algumas vantagens, como: bom rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; aceitabilidade por ser um microrganismo seguro; e podem crescer a uma ampla faixa de temperatura, aspecto técnico importante que permite sua aplicação em produtos fermentados, tanto na indústria farmacêutica como na alimentícia e entre outros (RUBIO-TEIXEIRA, 2006).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade do uso de soro de queijo na produção da enzima β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* aplicando o método de planejamento de mistura simplex-centroide.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a potencialidade do soro de queijo frente a outras fontes de carbono para produção da enzima β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* empregando o planejamento de mistura simplex centroide.

Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições de meios de fermentação utilizando o método simplex-centroide
- Monitorar a atividade enzimática, produção de biomassa e variação de pH durante o tempo de fermentação em diferentes proporções
- Determinar o perfil cinético dos meios de fermentação;

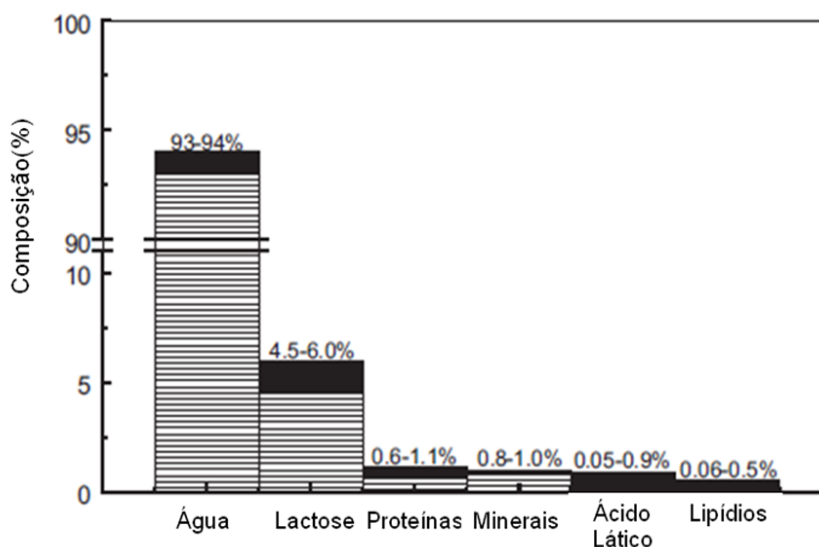
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SORO DE QUEIJO

Soro de queijo é o bioproduto proveniente da indústria de laticínios, conhecido como a parte aquosa formada durante a produção de queijo. É produzido em grandes quantidades, possui uma alta carga poluente constituindo-se sério problema ambiental, e possui muitos dos nutrientes presentes no leite. O soro contém cerca de 93-94 % de água e os seguintes nutrientes oriundos do leite: lactose, proteínas solúveis, minerais, ácido láctico e lipídios (Figura 1). Adicionalmente, possui quantidades significativas de outros componentes, como ácido cítrico, componentes nitrogenados não proteicos (ureia e ácido úrico), vitaminas (complexo B) e entre outros (PRAZERES, CARVALHO e RIVAS, 2012).

A visão de que o soro de queijo deve ser reutilizado tem evoluído com o passar dos anos, graças às possibilidades de utilização de seus componentes e às regulamentações cada vez mais rigorosas para eliminação de resíduos, as quais punem os responsáveis ao desenvolvimento de estratégias de manejo adequadas. O soro é um contaminante em potencial por possuir alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), entre 30.000 e 50.000 ppm, representando 0,2 kg de DBO por kg de queijo. Já a demanda química de oxigênio (DQO), com a maior parte correspondente à matéria orgânica biodegradável (lactose e proteínas), fica entre 60.000 e 80.000 ppm (ILLANES, 2011).

Figura 1. Componentes do soro de queijo.



Fonte: Adaptado de Prazeres, Carvalho e Rivas, (2012).

3.1.1 Impacto Ambiental

A utilização do soro de queijo tem sido um desafio desde que o homem começou a fazer queijo. Com o aumento da produção de queijo, também há um aumento na produção de soro. Considerando que muitas fábricas de queijo são construídas perto de rios e que a maior parte deste soro é desviada para estes cursos de água. A consciência para os problemas da poluição que o soro representa e os consequentes regulamentos proibindo seu descarte em cursos de água (Figura 2), e até mesmo em sistemas de esgotos municipais demonstra que os tratamentos convencionais destinados a este efluente não são adequados para reduzir sua carga poluidora. Por outro lado, por possuir muito dos nutrientes do leite, como as proteínas e peptídios, lipídios, lactose, vitaminas e minerais e, assim, considerado produto de grande valor agregado lançando um desafio da indústria a tratá-lo como um recurso a ser explorado e não um problema ambiental (GUIMARÃES et al., 2010).

Figura 2. Soro de queijo lançado em curso de água



Fonte: Adaptado de Carvalho et al. 2013.

O soro de leite não suporta estocagem por períodos prolongados por ser muito perecível, portanto, são necessárias medidas rápidas e que visem o aproveitamento deste subproduto e/ou o tratamento e descarte que impactem o meio ambiente (SERPA, 2009). Pode ser utilizado na alimentação animal, ou submetido a tratamentos como evaporação, secagem, desmineralização, extração e refino de lactose e ultrafiltração (SILVA et al., 2010).

Evidências apontam também que, quando manejado de forma inadequada, o soro pode atuar como agente de poluição ambiental. O excedente desse subproduto é um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte, frente ao custo elevado do tratamento. Por isso, algumas indústrias optam pelo seu descarte diretamente na rede pública, rios e lagos (MAGALHÃES et al., 2010). O poder poluente do soro é aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Assim, se lançado em cursos d'água, reduz a vida aquática, devido à demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e, se descartado no solo, compromete a estrutura físico-química, diminuindo o rendimento da colheita (BARBOSA; ARAÚJO, 2007).

O volume dos efluentes gerados por produtos lácteos é bastante variável, dependendo de uma série de fatores como a indústria, técnicas, processos e equipamentos. O soro de queijo é considerado como efluente mais importante dentre os efluentes de origem láctea, não só por causa da alta carga orgânica, mas também pelo volume gerado. De acordo com a FAO (Food and Agricultural Organization), o queijo é um dos principais produtos agrícolas mundiais. A produção e o consumo são dominantes na União Européia, seguidos pelos Estados Unidos. Independente do tipo de queijo produzido (parmesão, mussarela, gouda, Brie, Camembert, Feta, entre outros), as indústrias geram efluentes causadores de impactos ambientais significativos (CARVALHO et al., 2013).

3.1.2 Alternativas de usos para o Soro de Queijo

O soro de queijo pode ser classificado em dois tipos: Soro de queijo doce, definido como o líquido obtido pela coagulação do leite destinado a fabricação de queijos, caseína ou produtos lácteos similares. A coagulação se produz principalmente por ação enzimática, resultando em valores de pH entre 6,0 e 6,8. O soro de queijo ácido é definido da mesma forma, porém, a coagulação é executada por meio de adição de ácido, derivando num produto com pH inferior a 6,0 (VICOL, 2012).

O alto percentual de água presente no soro de queijo *in natura* torna dispendiosa sua desidratação e, por ser perecível, agrava o problema, impossibilitando o armazenamento prolongado. Aliada às características nutricionais do soro lácteo, a procura do consumidor brasileiro por produtos mais saudáveis, inovadores e seguros, pesquisas direcionam seu aproveitamento aos produtos em que se possa utilizá-lo na forma líquida

onde o soro recebe aplicações representativas nas formulações de bebidas lácteas fermentadas (GUEDES et al., 2013).

Outra aplicação industrial para o soro de queijo é a fabricação da ricota. De acordo com Brasil (2005), a ricota fresca é definida como um produto da coagulação da albumina do soro de queijos, adicionada de leite em até 20 % de seu volume, tratado convenientemente e leva no máximo 3 dias para ser fabricado. É um queijo com alto teor proteico, baixo percentual de gordura e alta digestibilidade, e, por estas características, é indicado para pessoas em regime de dieta alimentar (SILVA et al., 2010).

Na forma em pó, o uso do soro de leite permite intensificar o desenvolvimento de cor durante o cozimento de produtos cárneos embutidos, aumentar o volume dos pães e bolos e atuar como veículo antiaglutinante em misturas secas. Já nos sorvetes e sobremesas lácteas, o uso do soro doce é associado à formação de espumas estáveis e aumento da aeração do produto (OLIVEIRA et al., 2012; ANTUNES, 2003; CALDEIRA et al., 2010).

Além destas aplicações, observa-se o uso de soro de leite na produção de biofilmes utilizados para conservação de alimentos. Bons resultados com filmes à base de isolado proteico de soro de leite foram obtidos, ressaltando a formação de filmes transparentes, o que favoreceu sua aplicação. Filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo (KIM & USTONOL, 2001).

O soro de leite também pode ser utilizado para a fabricação de produtos com benefícios à saúde humana. Por ser considerado uma excelente fonte de proteínas e proporcionar ótima retenção de nitrogênio com melhor valor biológico e prevenir o estresse metabólico dos órgãos, o soro de leite tem sido inserido na alimentação de atletas e fisiculturistas (HARAGUCHI et al., 2006).

Tradicionalmente, o soro de queijo líquido pode ser fornecido para agricultores, tanto como biofertilizante como fornecimento de proteínas e lactose para animais em fazendas. Além das aplicações diretas em alimentação e no setor de farmacologia, a lactose proveniente do soro é valiosa para utilização em fermentações e transformações químicas. Alguns desses processos empregam a lactose purificada, enquanto outros utilizam o próprio soro ou o permeado (resultante de filtração); a opção a ser escolhida depende de razões econômicas e do produto final desejado (VICOL, 2012).

Três opções também podem ser consideradas. A primeira é baseada na aplicação da valorização dos componentes do soro, como proteínas e lactose, através das tecnologias de

recuperação. Constituem a principal opção para tratamento do soro, ficando atrás apenas da desidratação. A segunda opção baseia-se na aplicação de tratamentos biológicos, como por exemplo, a hidrólise da lactose e das proteínas, que conduzem na geração dos monossacarídeos glicose e galactose, peptídios e aminoácidos. Outros tratamentos, como fermentações controladas, que produzem ácido láctico, ácido butírico, butanol, ácido acético, glicerol, acetona, etanol, hidrogênio, proteínas de células individuais, e entre outros. A terceira opção é a aplicação de tratamentos físico-químicos, como coagulação, floculação, precipitação térmica, ácida ou alcalina, oxidação eletroquímica e entre outros (PRAZERES et al., 2012).

3.2 FONTES DE CARBONO

Os principais compostos utilizados como fontes de carbono são os monossacarídeos ou dissacarídeos. As fontes de carbono são de grande importância para as leveduras, pois propiciam constituintes para biossíntese de estruturas celulares e através da oxidação propiciam energia para a célula. Por outro lado, a utilização das fontes de carbono e as vias metabólicas seguidas são essenciais para a produção de bioprodutos e biomassas, mas também para o tratamento microbiano de resíduos contendo fontes de carbono. Estas são utilizadas para propiciar energia e são precursoras para síntese de estruturas celulares (GANCEDO, 1998; SANTOS, 2013; SILVEIRA, 2013).

O desenvolvimento de bioprodutos em escala industrial exige que sua qualidade e custo atendam à demanda do consumidor. O custo final de bioprodutos inclui o preço da matéria-prima inicial e, sobretudo, do processo de transformação. Este último pode ser diminuído ao reduzir o número de etapas e melhorar de seus rendimentos, com uma criteriosa escolha da estratégia de conversão de biomassa em bioprodutos (GALLEZOT, 2012). O crescimento celular depende da manutenção e do transporte de nutrientes do meio de cultivo para o interior da célula, assim como as condições de cultivo. Sendo assim, o meio de cultivo desempenha um papel importante na formação de células e produtos. A fonte de carbono é necessária para a biossíntese desde a reprodução até a manutenção celular. (MADDIPATI, 2011; SCHOLTZ, 2011).

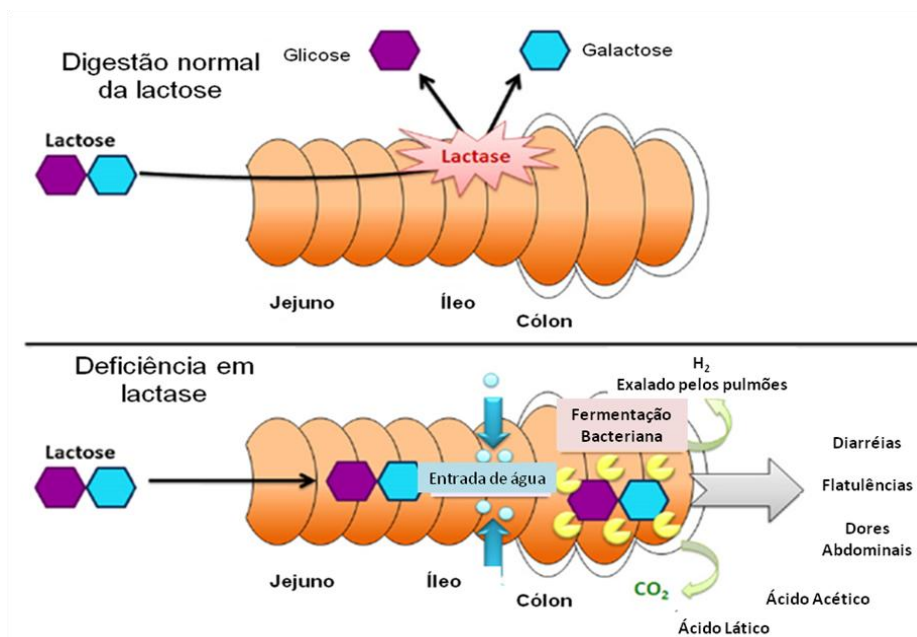
O cultivo de microrganismos tendo como substrato o soro de queijo é uma boa alternativa de utilização deste subproduto. O teor de lactose, presente no soro torna o soro de queijo atrativo para seu uso em processos biotecnológicos, principalmente no uso de

fermentações submersas aeróbias para produção, principalmente de etanol e β -galactosidase, quando se usa microrganismos capazes de assimilar este carboidrato. O volume excedente lançado no meio ambiente, juntamente com a necessidade de substratos baratos e disponíveis e o rápido avanço na área de biotecnologia são indicadores importantes que aumentam a visibilidade uso de soro de queijo (GUIMARÃES et al., 2010; SCHOLTZ, 2011).

A lactose é um dissacarídeo, composto por uma molécula de glicose ligada a uma de galactose, naturalmente encontrada em alta concentração no leite e em produtos lácteos. Nos seres humanos, a intolerância à lactose ou dificuldade em sua absorção é um problema bastante comum. A lactose não digerida passa para o intestino grosso onde é fermentada, resultando em dores abdominais, gases, náuseas e diarreia (Figura 3) (HUSAIN, 2010; DEKKER, DAAMEN, FUQUAY, 2011). O termo “Intolerância à lactose” refere-se aos sintomas vivenciados por pessoas que ingerem uma quantidade de lactose superior à capacidade digestiva intestinal, ou seja, o teor real de lactose é maior que a quantidade da enzima lactase, ou β -galactosidase, em atividade. Existem basicamente dois tipos de intolerância: a primária, que consiste na perda natural de grande parte da atividade enzimática, geralmente acontecendo em crianças logo após o período de amamentação; e a secundária, que consiste numa deficiência transitória por danos ocorridos no revestimento do intestino, que pode ser causada por medicamentos, doenças, cirurgias ou até mesmo radioterapia (BROWN-ESTERS, NAMARA, SAVAIANO, 2012).

Cerca de 70 % da população mundial possui problemas com assimilação da lactose (má absorção ou intolerância). A presença deste açúcar em alimentos e preparações industriais é extremamente comum, por suas propriedades tecnológicas (como fermentação, cristalização e entre outros). Para isto existem diversas soluções terapêuticas e dietéticas como redução do consumo de alimentos com lactose, ingestão de probióticos que sintetizam naturalmente e a ingestão da enzima antes das refeições. Abaixo, pode-se observar a digestão natural da lactose e um organismo com deficiência da enzima (BURGAIN et al., 2012).

Figura 3. Fisiologia da intolerância à lactose

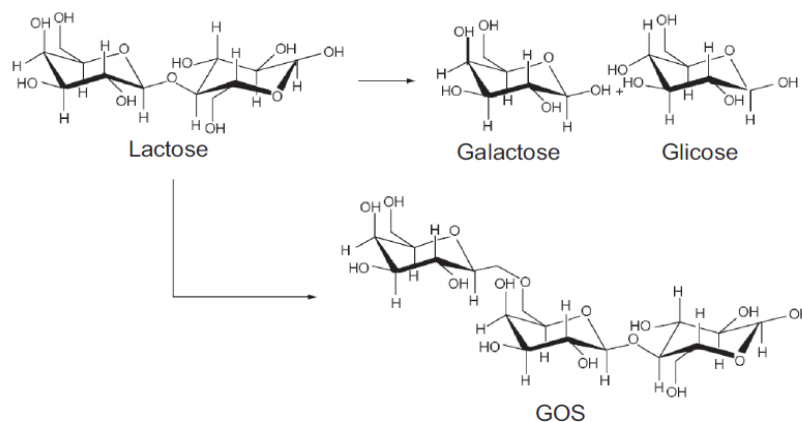


Fonte: Adaptado de Burgain et al (2012).

3.2 PRODUÇÃO DE β - GALACTOSIDASE

β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma das enzimas mais utilizadas na indústria de alimentos. Hidrolisa a lactose, liberando glicose e galactose, e possibilita a pessoas intolerantes à lactose consumirem o leite e seus derivados. A hidrólise catalítica da lactose é uma reação direta e a síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS) é a reação reversa, denominada transgalactosilação, (Figura 4). Os GOS são formados a partir de substratos ricos em lactose via transgalactosilação, e para tanto podem-se utilizar células viáveis a partir da fermentação de substratos ricos em lactose. A conversão da lactose em GOS por ação da enzima β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise (BICAS et al., 2010; FAI e PASTORE, 2015). São conhecidos por suas propriedades prebióticas (com boa sinergia com probióticos) e poder adoçante em produtos como: leite fermentado, pães (os quais ajuda também em textura e sabor), geleias, bebidas e produtos de confeitaria, constituindo assim uma alternativa nutritiva para consumidores com intolerância à lactose (OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 4. Conversão da lactose em Galacto-oligossacarídeos ou unidades de Galactose e Glicose.

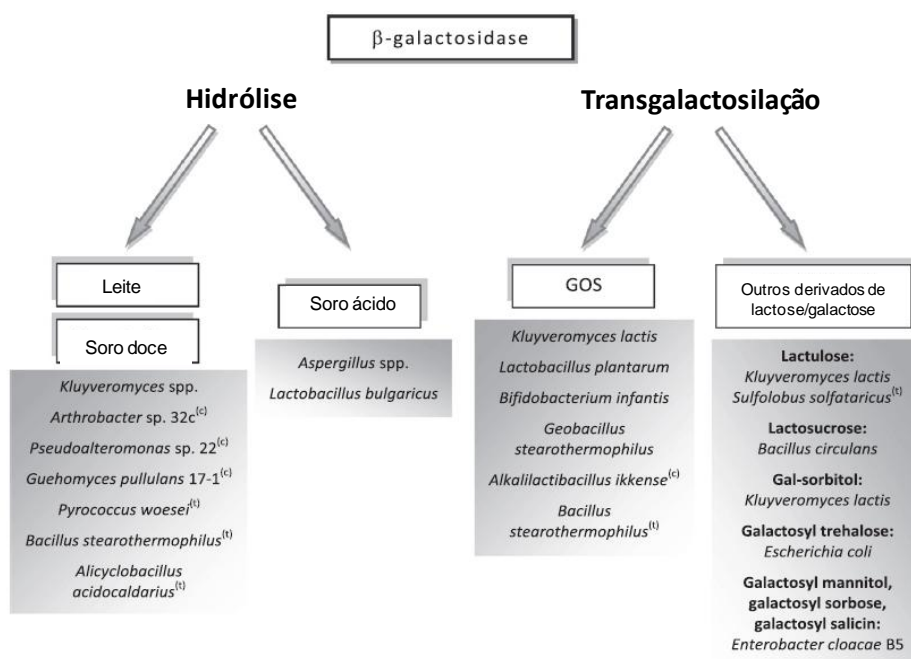


Fonte: Adaptado de Martins e Burket, (2009).

Assim como a maioria dos compostos provenientes de processos biotecnológicos, os GOS podem ser sintetizados de diversas maneiras, sendo a fermentação uma opção interessante. Neste caso, a síntese destes oligossacarídeos é levada a cabo utilizando diretamente microrganismos (sem extração prévia da β -galactosidase) que produzam esta enzima por fermentação de substratos com alta concentração de lactose. A fermentação apresenta como vantagens em relação à utilização de enzimas isoladas em processos biotecnológicos, o fato de não necessitar das etapas de isolamento, e purificação da enzima, as quais podem ser onerosas, fastidiosas e demandar muito tempo (GOSLIN et al., 2010).

A enzima β -galactosidase apresenta grande importância comercial, com ampla aplicação industrial (Figura 5), pois além de produzir GOS, catalisa a quebra da lactose, o que pode resultar numa alternativa para problemas associados com a eliminação do soro de queijo, a cristalização de lactose em alimentos congelados e o consumo de leite e derivados por indivíduos com intolerância à lactose (MARÍN-NAVARRO et al., 2014). Com a hidrólise da lactose, em suas subunidades glicose e galactose, há o aumento do poder adoçante e diminuição dos problemas digestivos (TOMAL, 2010).

Figura 5. Aplicações biotecnológicas da β -galactosidase: hidrólise da lactose no leite e no soro de queijo e produção de GOS e outros derivados de lactose/galactose.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2011).

A produção enzimática via microbiana, quando comparada com extração de animais e plantas, fornece um caminho mais eficiente e de maior rendimento, principal interesse para a indústria. No entanto, eles diferem em suas melhores condições para a aplicação de enzimas especialmente em relação ao pH. A produção da enzima depende do custo de sua recuperação e purificação. Portanto, tem havido um crescente interesse em encontrar microrganismos adequados para uso industrial, com maior capacidade de produção e métodos de purificação menos dispendiosos. Uma ampla variedade de bactérias, leveduras e fungos tem sido fontes para a produção desta enzima (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

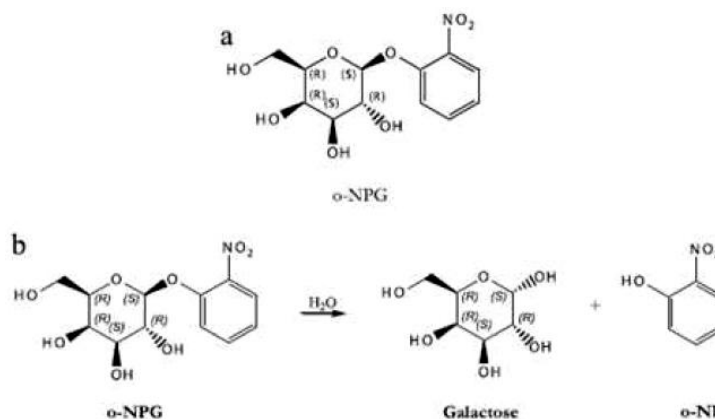
Dentre estas fontes, enzimas microbianas oferecem mais vantagens pela fácil manutenção das melhores condições de produção, principalmente no caso das leveduras. Leveduras não convencionais, assim reconhecidas por serem ascomicetos e não pertencerem ao gênero *Saccharomyces*, vem sendo utilizadas para uma grande variedade biotecnológica. Suas aplicações vão desde a expressão de proteínas, síntese de enzimas e

de produtos químicos, com importância nas áreas farmacêuticas e de alimentos (JOHNSON, 2012; RAOL, PRAJAPATIB; RAOL, 2014).

A capacidade de metabolizar a lactose é uma característica apresentada apenas por alguns tipos de microrganismos, dentre eles alguns gêneros de leveduras, e está diretamente relacionada com a capacidade de produzir a enzima β -galactosidase. Dentre as leveduras que assimilam a lactose, destaca-se o gênero *Kluyveromyces*, que metabolizam este dissacarídeo tanto pela via fermentativa como pela via respiratória (LANE e MORRISEY, 2010). O fato de espécies de *Kluyveromyces* utilizarem a lactose como fonte primária de carbono é um atributo de particular importância na indústria de laticínios. Estas espécies podem ser cultivadas em um substrato barato que é considerado um resíduo: soro de queijo. É ao metabolizar a lactose que a *Kluyveromyces* produz a enzima β -galactosidase. Além desta enzima, foram investigadas também quanto à produção de proteínas heterólogas, com expressão e secreção eficiente de variedades de peptídios, com rendimentos atrativos (JOHNSON, 2012).

A determinação da atividade enzimática da β -galactosidase pode ser realizada através de um teste colorimétrico, a partir da reação de hidrólise da enzima com o substrato o-nitrofenil- β -Dgalactopiranosídeo (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 6 abaixo demonstra a reação de hidrólise do ONPG pela enzima β -galactosidase.

Figura 6. Estrutura do substrato ONPG (a) e hidrólise do ONPG em unidade de galactose e o-NP.



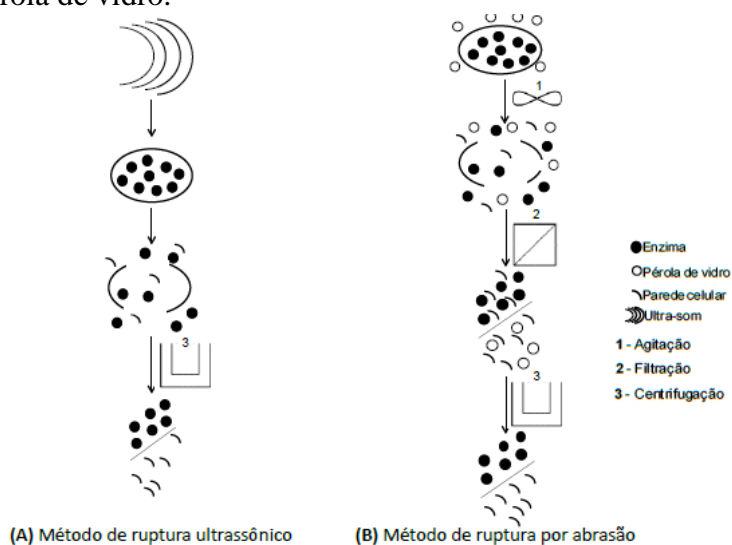
Fonte: (Nichele et al., 2011).

3.2.1 β - galactosidase intracelular

A enzima β - galactosidase, por ser produzida pelas leveduras do gênero *Kluyveromyces sp.* de forma intracelular, requer um processo de ruptura de suas células para sua liberação. O rompimento manual utiliza basicamente pérolas de vidro e o procedimento consta da adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente, através de vórtex, por um tempo determinado, obtendo-se a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (MEDEIROS et al., 2008).

Por outro lado, o rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e também como método potencial para acompanhamento de cultivos microbianos. A maior parte das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de bolhas de cavitação, as quais foram uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células, liberando a enzima (BOSSIO, HARRY E KINNEY, 2008; LEMES, ÁLVARES e KALIL, 2012). Na Figura 7 abaixo pode-se observar o mecanismo de ação dos métodos de extração por abrasão e ultrassom.

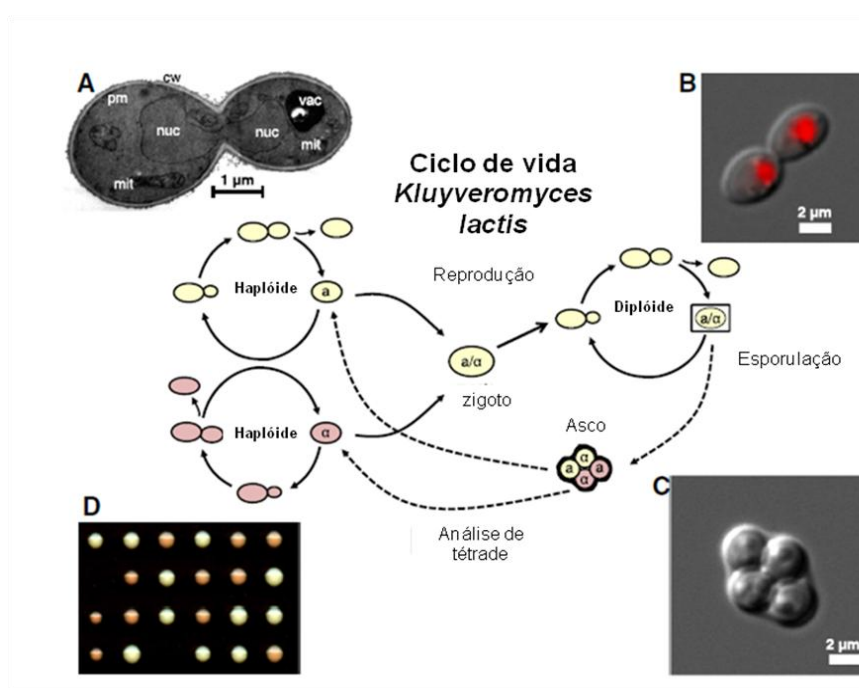
Figura 7. Mecanismo de ruptura celular pelo método ultrassônico (A) e pelo método por abrasão com pérola de vidro.



3.3 *Kluyveromyces lactis*

A levedura *Kluyveromyces lactis*, nomeada em homenagem ao microbiologista holandês Albert Jan Kluyver (1888-1956), é um microrganismo unicelular, eucariótico e pertencente à classe dos ascomicetos, e é considerada uma versão menor da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Possui um ciclo de vida com dois tipos de reprodução: ciclo haploide estável e diploide semiestável, podendo ser induzidas a produzir tétrades quando ocorre inanição de nutrientes (Figura 8) (RODICIO e HEINISCH, 2013).

Figura 8. Ciclo de vida *Kluyveromyces lactis*. A) Imagem de brotamento celular por microscopia eletrônica de transmissão; B) Brotamento de células sobrepostas, imagem fluorescente; C) tétrade; D) análise de tétrades com coloração vermelha.



Fonte: adaptado de Rodicio e Heinisch (2013).

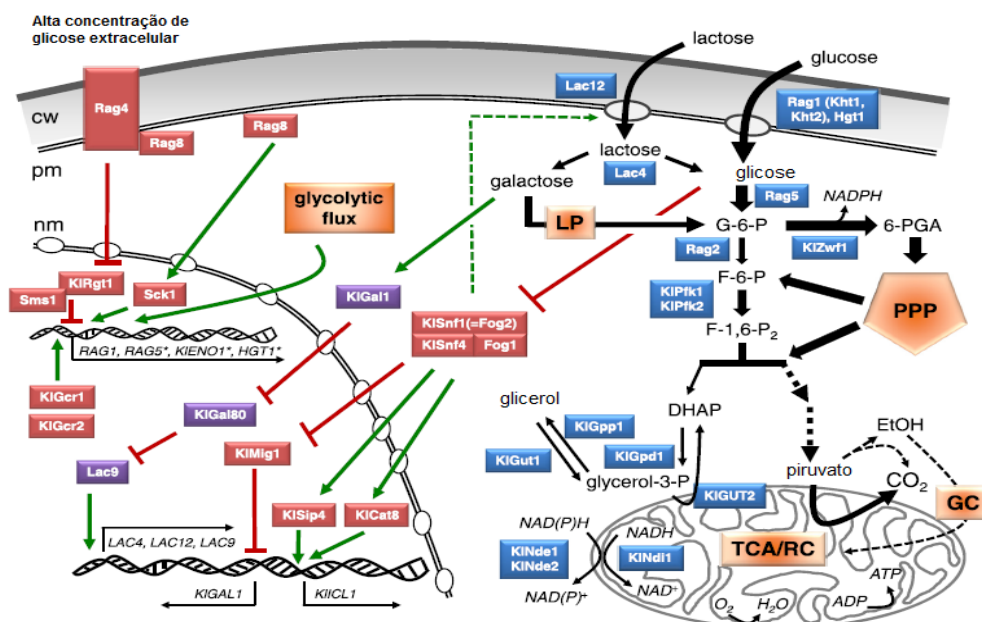
Leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* apresentam as vantagens de assimilar, tanto glicose, quanto lactose, frente a outras leveduras do gênero *Kluyveromyces* e *Saccharomyces cerevisiae*; e de possuírem as maiores velocidades máximas de crescimento μ_{\max} (h^{-1}) quando comparadas a *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas as leveduras do gênero *Kluyveromyces* citadas destacam-se como microrganismos produtores da enzima β -galactosidase (LANE e MORRISEY, 2010).

Uma comparação entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* revela grandes diferenças entre o grupo de genes relacionados ao metabolismo do carboidrato, função respiratória e resposta ao estresse oxidativo. Em *K. lactis*, o metabolismo respiratório é predominante sob condições aeróbias. Muitos de seus genes que codificam enzimas respiratórias e enzimas envolvidas no metabolismo de fontes alternativas de carbono são sujeitos a vários graus de repressão à glicose. Enquanto *S. cerevisiae* consome a glicose através da glicólise, em *K. lactis* as hexoses são metabolizadas principalmente pelas vias pentose fosfato. Em condições anaeróbias, não se reproduz em meios com açúcares como galactose, maltose e sacarose, provavelmente devido ao baixo nível de absorção de açúcar sob essas condições (RODICIO e HEINISCH, 2013).

Similarmente a outros microrganismos presentes no leite, a levedura *K. lactis* é adaptada para utilização suficiente da lactose. A habilidade desta levedura em metabolizar lactose resulta da presença da lactose permease e da β -galactosidase. A captação de lactose em *K. lactis* é mediada por um sistema transportador induzido pela lactose e por galactose (intracelularmente). O transporte de lactose nesta levedura é um processo ativo, que requer um sistema de geração de energia, o que permite um acúmulo intracelular de lactose. A captação é mediada por um transmissor e é saturada em altas concentrações de substrato (DOMINGUES et al., 2010).

Na Figura 6 pode-se visualizar como acontece o metabolismo de *K. lactis* durante a absorção de lactose e de glicose. A lactose é absorvida para o interior do citoplasma, onde se localiza a permease lactose na membrana (Lac12), que é influenciada pelo complexo KISNF1. Após sua absorção, a molécula de lactose é quebrada em glicose, que segue direto para a via glicolítica respiratória, e galactose, que também é utilizada na via glicolítica, através da via de Leloir, a qual reage com enzimas e é fosforilada até sua conversão em glicose para então gerar energia. A quebra da lactose acontece graças à enzima intracelular β -galactosidase, codificada pelo gene Lac4. A metade esquerda da figura resume os componentes reguladores do metabolismo de carboidratos, o que afeta a transcrição de genes: as setas vermelhas indicam inibições e as setas verdes ativações (RODICIO e HEINISCH, 2013).

Figura 9. Metabolismo intracelular de *Kluyveromyces lactis*.



Fonte: Rodicio e Heinisch adaptado (2013).

Espécies de *Kluyveromyces* para a produção de β - galactosidases (lactases) utilizam lactose como fonte primária de carbono, substratos baratos e efluentes com alta concentração de lactose, como o soro de queijo. Além da vantagem de apresentar bom rendimento de crescimento, gerando um forte impacto econômico na indústria de alimentos possui aceitabilidade como um microrganismo seguro, de acordo com a *Food and Drugs Administration* (FDA), aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias, podendo crescer a uma ampla faixa de temperatura, entre outros (VALLI et al., 2012; JOHNSON, 2013).

A produção de β - galactosidases por *Kluyveromyces* é de alto interesse biotecnológico para a indústria de alimentos e para o reaproveitamento do soro de queijo. Quando comparada à produção pelo bolor *Aspergillus niger*, a levedura *Kluyveromyces lactis* produz maior quantidade de unidades de enzimas (OLIVEIRA et al., 2011).

Além disto, a *Kluyveromyces lactis* tem sido investigada quanto à produção de proteínas heterólogas, com capacidade eficiente de expressar e secretar uma grande variedade de peptídios e proteínas de alto peso molecular. Do ponto de vista industrial, a biomassa desta levedura é de grande interesse, tendo bastantes benefícios de aplicação que podem ser aplicados na produção de alimentos, rações de animais, bioquímica e entre outros. Portanto, estudos para determinação das melhores fontes de carbono (como

sacarose, lactose, glicose e frutose), nitrogênio e vitaminas para crescimento de *Kluyveromyces lactis* são necessários (HUN et al., 2013).

4 REFERÊNCIAS

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. Barueri: Editora Manole, 2003.

BARBOSA, M.R; ARAÚJO, E.H. Estudo da produção da Enzima Lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v.1, n.1, 2007.

BICAS, J.L; SILVA, J.C; DIONÍSIO, A.P; PASTORE, M.G. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n. 1, p.7-18, 2010.

BOSSIO, J.P; HARRY, J. KINNEY, C.A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 248-254, 2008.

BRASILa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de agosto de 2005.

BRASILb.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC 2005 nº 205. Enzimas e preparações enzimáticas para o uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov, 2006.

BROWN-ESTERS, O; NAMARA, P.Mc; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **Internacional Dairy Journal**, v. 22, p. 98-103, 2012.

BURGAIN, J; GAIANI, C; JEANDEL, C; CAILLIEZ-GRIMAL, C; REVOL, A-M; SCHER, J. Maldigestion du lactose: formes cliniques et solutions thérapeutiques. **Cahiers de nutrition et de diététique**, v. 47, p. 201-209, 2012.

- CALDEIRA, L.A; FERRÃO, S.P.B; FERNANDES, S.A.A; MAGNAVITA, A.P.A; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p. 2193-2198, 2010.
- CARVALHO, F; PRAZERES, A.R; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.
- DEKKER, P.J.T; DAAMEN, C.B.D, in: FUQUAY, J.W. Encyclopedia of Dairy Science, **Academic Press**, London, p. 276-283, 2011.
- DOMINGUES, L; GUIMARÃES, P.M.R; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 164-171, 2010.
- FAI, A.E.C; PASTORE, G.M. Galactooligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n.1, p. 69-81, 2015.
- GALLEZOT, P. Conversion of biomass to selected chemical products. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 1538-1558, 2012.
- GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.2, p. 334-361, 1998.
- GOSLIN, A; STEVENS, G; BARBER, A.R; KENTISH, S.E; GRAS, S.L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 307-318, 2010.
- GUEDES, A.F.L.M; MACHADO, E.C.L; FONSECA, M.C; ANDRADE, S.A.C; STAMFORD, T.L.M. Aproveitamento de soro lácteo na formulação de bebidas com frutas e hortaliças. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n. 4, p. 1231-1238, 2013.
- GUIMARÃES, P. M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, New York, v.28, n. 3, p. 375-384, 2010.

HARAGUCHI, F.K; ABREU, W.C; DE PAULA, K. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de nutrição**, v. 19, n.4, p.479-488, 2006.

HUN, C.H; MOHD, M.S.S; ABD, R.M; OTHMAN, Z; ELSAYED, E.A; RAMILI, S; ELMARZUGI, N.A; SAMIDI, M.R; AZIZ, R; EL ENSHASY, H.A. Bioprocess development for high cell mass production of the probiotic Yeas- *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, p. 49-59, 2013.

HUSAIN Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnoly** v.30, p. 41–62, 2010.

ILLANES, A. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. **Eletronic Journal Biotechnology**, v. 14, p. 11-11, 2011.

JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts- the ascomycetes. **Applied Microbiology Technology**, v. 97, p. 503-517, 2012.

KIM, S.J; USTONOL, Z. Sensory atributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, v.66, n.6, p.909-911, 2001.

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.

LEMES, A.C; ÁLVARES, G.T; KALIL, S.J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, 2012.

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

MAGALHÃES, K.T; PEREIRA, M.A; NICOLAU, A; DRAGONE, G; DOMINGUES, L; TEIXEIRA, J.A; SILVA, J.B.A; SCHWAN, R.F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8843-8850, 2010.

MARTINS, A.R; BURKET, C.A.V. Galactoligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MARÍN-NAVARRO, N; TALENS-PERALES, D; OUDE-VRIELINK, A; CAÑADA, F.J; POLAINA, J. Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 989-998, 2014.

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

OLIVEIRA, C; GUIMARÃES, P.M.R; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 600-609, 2011.

OLIVEIRA, D.F; BRAVO, C.E.C; TONIAL, I.B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista Instituto Laticínio "Cândido Tostes"**, v.67, n.385, p.64-71, 2012.

PANESAR, P.S; KUMARI, S; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -galactosidase in Food Processing Industries, **Enzyme Research**, p. 1-16, 2010.

PARK, A.R; OH, D.K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1279-1286, 2010.

PESCUMA, M., HÉBERT, E.M., MOZZI, F., DE VALDEZ, G.F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 73-81, 2010.

PRAZERES, A.R; CARVALHO, F; RIVAS, J. Cheese Whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RAOL, G.G; PRAJAPATIB, V.S; RAOL B.V. Formulation of low-cost, lactose-free production medium by response surface methodology for the production medium by response surface methodology for the production of β -galactosidase using halotolerant *Aspergillus tubengensis* GR-1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 181-187, 2014.

RODICIO, R; HEINISCH, J.J. Yeast on the milk way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 30, p. 165-177, 2013.

RUBIO-TEIXEIRA, M.A. Comparative analysis on the Gal genetic switch between not so distant cousins – *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **Yeems Yeast Research**, v.5, p.1115-1128, 2006.

SANTOS, A.M. Regulação do transporte de lactose em *Kluyveromyces lactis* JA6. **Dissertação(60p)**. Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 2013.

SERPA, L. et al. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. In: **INTERNACIONAL WORKSHOP - Advances in Cleaner Production**, 2009.

SILVA, M. E. C.; PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C. Estudo da viabilidade tecnológica da aplicação de coacervado de soro de leite com carboximetilcelulose em iogurte probiótico. **Brazilian Journal Food Technology**, v.13, n.1, p.30-37, 2010.

SILVEIRA, E.A. Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares. **Dissertação (70p)**. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química, 2013.

SCHOLTZ, E.B. Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase. **Dissertação**. Mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC- Brasil, 2011.

TOMAL, A. A. B., CUNHA, M. E. T., BOSSO, A., YOUSSEF, E. Y. e SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **Científica, Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

VALLI, S; AYSHA, O.S; REENA, A; VINOTH, P.K. A study on the Lactase Potential of *Kluyveromyces lactis* Grow in Whey. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 4, n. 3, p. 877-883, 2012.

VICOL, C.S. Biotechnological valorisation of whey. **Innovate Romanian Food Biotechnology**, Galati, v.10, n. 1, p. 1-8, 2012.

5 RESULTADOS

5.1 POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *KLUYVEROMYCES LACTIS* URM 6684.

ARTIGO**POTENCIALIDADE DO SORO DE QUEIJO FRENTE A OUTRAS FONTES DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *KLUYVEROMYCES LACTIS* URM 6684.****RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso do soro de queijo, de forma isolada ou combinada a outras fontes de carbono, para produção da enzima β -galactosidase, utilizando *Kluyveromyces lactis* URM 6684, através do planejamento de mistura simplex centroide. Foram realizados 9 ensaios com três fontes de carbono: soro de queijo, lactose PA e sacarose PA. Em todas as amostras foram realizadas análises de biomassa, pH, Brix, rompimento celular e atividade enzimática. Meios com presença de sacarose apresentaram as melhores produções de biomassa: E5(7,8 g/L), E6(6,1 g/L) e E8 (6,8 g/L). Para atividade enzimática, observou-se que meios compostos por soro de queijo apresentaram maior produção enzimática em 72 horas de fermentação: E1(0,65 U/mL), E4(0,33 U/mL) e E6 (0,40 U/mL), a qual apresentou melhor ajuste aos modelos quadrático e cúbico, com coeficientes, R_A^2 , de 0,86 e 0,93. Assim, o uso do soro de queijo, tanto isolado como combinado à sacarose, como meio de fermentação para produção de β -galactosidase torna-se viável, por ser considerado um substrato de baixo custo e acessível.

Palavras chave: soro de queijo; *Kluyveromyces lactis*; fermentação; simplex-centroide; β -galactosidase .

CHEESE WHEY'S FACE TO OTHER POTENTIAL SOURCES FOR CARBON IN β -GALACTOSIDASE PRODUCTION *Kluyveromyces lactis* URM 6684

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the feasibility of using the cheese whey, in isolation or in combination with other carbon sources for the production of β -galactosidase enzyme, using *Kluyveromyces lactis* URM 6684, using the simplex centroid mixture of planning. Were performed 9 tests with three sources of carbon: cheese whey, lactose and sucrose. All samples were performed biomass analysis, pH, ° Brix, cell disruption, and enzymatic activity. Medium with sucrose showed the best biomass production E5 (7,8 g / L), E6 (6,1 g / L) and E8 (6,8 g / L). For enzyme activity was observed, which means consist of whey had higher enzyme production at 72 hours of fermentation: E1 (0,65 U / ml), E4 (0,33 U / ml) and E6 (0,40 U / mL), which presented the best fit quadratic and cubic models, with coefficients, R_A^2 , 0,86 and 0,93. Thus, the use of whey, either alone or combined with sucrose as fermentation for β -galactosidase production becomes feasible, because it is considered a substrate inexpensive and accessible.

Keywords: cheese whey; *Kluyveromyces lactis*; fermentation; simplex-centroid; β -galactosidase.

INTRODUÇÃO

O volume dos efluentes gerados por produtos lácteos é bastante variável, dependendo de uma série de fatores como a indústria, técnicas, processos e equipamentos. De acordo com a FAO (Food and Agricultural Organization), o queijo é um dos principais produtos agrícolas que geram efluentes com impactos ambientais significativos. O soro de queijo é considerado como efluente mais importante de origem láctea, não só por causa da alta carga orgânica, mas também pelo volume gerado. Para redução desta poluição, tratamentos químicos e microbiológicos têm sido utilizados para obtenção de produtos, como por exemplo, o cultivo aeróbico de microrganismos utilizando o soro como meio para produção de etanol e da enzima β -galactosidase (PRAZERES et al., 2013).

Para produção da enzima β -galactosidase, diversos microrganismos vêm sendo utilizados. Tradicionalmente, as β -galactosidasas mais utilizadas pela indústria são obtidas de bolores como os do gênero *Aspergillus spp.* e de leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.* que são considerados GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja, seguros para consumo de humanos e animais. A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* é de alto interesse biotecnológico para indústria de alimentos e reaproveitamento do soro de queijo. Porém, devido à sua natureza intracelular, estratégias de rompimento celular devem ser utilizadas (DOMINGUES et al. 2010; GUIMARÃES et al. 2010; HUSAIN, 2010).

Por seu teor de lactose, volume excedente lançado no meio ambiente e baixo custo, juntamente com o rápido avanço na área de biotecnologia, o soro de queijo é considerado substrato em potencial para cultivo de microrganismos. Como a produção da enzima β -galactosidase é relativamente custosa, uma alternativa de reduzir o custo da produção seria usar meios de cultura mais acessíveis. A fonte de carbono destes meios é um dos componentes mais importantes do meio de cultivo, pois regula o crescimento microbiano e a biossíntese enzimática. Portanto, a busca pela fonte de carbono ideal e a quantidade a ser utilizada constitui em um dos passos mais importantes no desenvolvimento eficiente e econômico dos bioprocessos (AKCAN, 2011; ANDRADES et al. 2015). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso do soro de queijo, de forma isolada ou combinada a outras fontes de carbono, para produção da enzima β -galactosidase, utilizando *Kluyveromyces lactis* URM 6684, através do planejamento de mistura simplex centroide.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Paraíba.

Microrganismo

A levedura utilizada foi a *Kluyveromyces lactis* URM 6684, gentilmente cedida pela Micoteca no Centro de Ciências Biológicas da UFPE, mantida em meio YEPD (contendo: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20g/L) sob refrigeração a 5 °C.

Fontes de carbono

As fontes de carbono foram Lactose PA (Química Moderna), Sacarose PA (Química Moderna) e Soro de queijo em pó industrial. O soro de queijo em pó industrial, adquirido através da KADU Ingredientes LTDA (Jaboatão dos Guararapes – PE), foi diluído até as concentrações iniciais especificadas no planejamento experimental. Segundo as especificações técnicas do fabricante, o soro em pó continha a seguinte composição, por 30 g: Carboidratos 23g; Proteínas 4,0 g; Gorduras Totais 0g; Sódio 324mg.

Pré-tratamento do soro

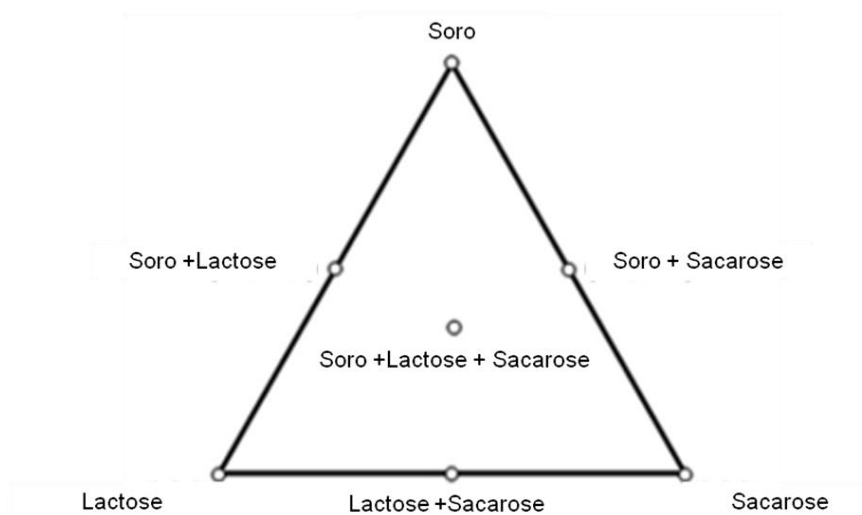
Para remoção das proteínas do soro, este foi submetido a um tratamento termoácido, que consiste na combinação do calor e ajuste de pH até o ponto isoelétrico das proteínas através de um ácido orgânico. No presente estudo, o soro foi aquecido a 85 °C, em agitação constante. Atingida a temperatura, o pH foi reduzido para 4,8 (acrécimo de ácido láctico) e posteriormente aquecido até atingir 90°C. Após alcançar a temperatura, o aquecimento e a agitação foram interrompidos e a solução foi mantida em repouso para sedimentação das proteínas. Posteriormente, o soro foi filtrado em papel de filtro qualitativo e bomba de vácuo, para ser utilizado nos meios de fermentação. Após a filtração, utilizou-se KOH 4M para atingir pH inicial 6,0 (LIMA et al., 2013).

Delineamento experimental de misturas

Para avaliar as influências do tipo de fonte de carbono definidas para este estudo (Soro de queijo, lactose PA e sacarose PA), de forma combinada ou isolada, foi selecionado o planejamento experimental de mistura simplex centroide. Este tipo de planejamento se torna ideal para uma mistura com 3 elementos cuja configuração espacial

determinada por um número de pontos, com um ponto a mais do que o número de dimensões do espaço (HARE, 1974; CROSIER, 1984). O centroide do *simplex* é o ponto que representa a mistura composta pelos x ingredientes distribuídos em mesma proporção (NEPOMUCENA, SILVA E CIRILLO, 2013). Assim, o planejamento simplex-centroide para as fontes de carbono, misturadas ou não, soro de queijo, lactose PA e sacarose PA pode ser visualizado abaixo na Figura 1.

Figura 1. Distribuição dos pontos experimentais do simplex que garanta a restrição de que, para qualquer ponto, a soma dos três componentes (soro de queijo, lactose PA e Sacarose PA) deverá ser unitária.



Para execução do planejamento experimental foram realizados 9 ensaios, com ponto central em triplicata, cujas proporções das fontes de carbono empregadas podem ser visualizadas na Tabela 1. O soro de queijo em pó foi diluído para atingir as concentrações de carboidrato (lactose) determinadas no planejamento experimental (20 g/L, 10 g/L e 6,7 g/L), baseando-se nas especificações técnicas fornecidas pelo fabricante. As variáveis de resposta foram o crescimento de biomassa, presença de atividade enzimática, variação de pH e grau Brix.

Tabela 1. Matriz da composição das fontes de carbono definida no planejamento experimental de mistura simplex-centroide.

Ensaio	Proporções das fontes de carbono dos meios de cultivo					
	Valores codificados			Valores reais (g/L)		
	Soro de Queijo (Lactose)	Lactose PA	Sacarose PA	Soro de Queijo (Lactose)	Lactose PA	Sacarose PA
E1	1	0	0	20,0 g/L	0,0	0,0
E2	0	1	0	0,0	20,0 g/L	0,0
E3	0	0	1	0,0	0,0	20,0 g/L
E4	1/2	1/2	0	10,0 g/L	10,0 g/L	0,0
E5	0	1/2	1/2	0,0	10,0g/L	10,0 g/L
E6	1/2	0	1/2	10,0 g/L	0,0	10,0 g/L
E7	1/3	1/3	1/3	6,7g/L	6,7g/L	6,7g/L
E8	1/3	1/3	1/3	6,7g/L	6,7g/L	6,7g/L
E9	1/3	1/3	1/3	6,7g/L	6,7g/L	6,7g/L

Além das fontes de carbono definidas pelo planejamento experimental, foram utilizados os seguintes componentes: como fontes de nitrogênio, foram utilizados extrato de levedura (5,0 g/L) e peptona (10,0 g/L), de acordo com o meio de fermentação utilizado por Santos (2002) e sulfato de amônia/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2 g/L), e como componentes adicionais foram utilizados fosfato de potássio, K_2HPO_4 , (5g/L), Sulfato de Magnésio Heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L).

Fermentação

Para cada ensaio realizado, utilizou-se como pré inóculo, 10 % do volume total do meio de fermentação. Foram transferidas 3 alçadas da levedura, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz UV para cada tubo de ensaio. Os tubos foram transferidos para incubadora, a uma temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm constantes, durante 24 horas. Após o tempo de pré inóculo, os conteúdos dos tubos foram transferidos para erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo esterilizados a 111 °C por 10 min. Os meios de cultivo serviram como fonte de substrato para a levedura *Kluyveromyces lactis*. A fermentação foi conduzida a 30 °C e 200 rpm de agitação (LIMA, 2013). As amostras (10 mL) foram retiradas nos tempos determinados: 0, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h armazenadas em tubos de ensaio e refrigeradas para análises de pH, biomassa, Brix e atividade enzimática.

Extração da enzima β -galactosidase intracelular

A extração da enzima intracelular foi realizada da seguinte forma: inicialmente as amostras foram retiradas durante a fermentação nos intervalos de tempo e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado. A massa celular resultante foi resuspendida em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6, para obtenção de concentração celular de 2,62 mg. mL⁻¹, para ser realizado nos ensaios de ruptura. Nos tubos de ensaio contendo as células ressuspensas foram acrescentados pérolas de vidro, com 2,0 mm de diâmetro, de 1,10 g. mL⁻¹ por suspensão. Em seguida, os tubos foram conduzidos ao banho de ultrassom, mantendo-se a temperatura de 4°C, durante 40 minutos, de acordo com metodologia adaptada de Medeiros et al (2008) e Lemes et al. (2012). Após a extração, foram retiradas alíquotas para determinação de atividade enzimática.

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando o método de hidrólise do o-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (ONPG), da marca AMRESCO, como substrato. O procedimento consiste em adicionar 50 μ L do caldo enzimático em tubos contendo 2 mL de 1,25 mM de ONPG, diluídos em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6, a 37 °C durante 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de Na₂CO₃ 1 M. A concentração do produto formado, o ortonitrofenol (ON-P) foi monitorada através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ON-P por minuto sob as condições do ensaio (LIMA et al., 2013).

Determinação de biomassa

A determinação de biomassa foi efetuada através de peso seco. Foram utilizados 5 mL de amostra do meio, filtrados em membrana de filtração de 0,45 μ de porosidade, Química Moderna, e bomba de vácuo. Após a filtração, a membrana foi transferida para placa de Petri e secada em estufa a 105 °C, durante 24 horas. O valor foi estabelecido pela diferença entre o peso final e o inicial da membrana, em g/L, após a filtração da amostra (LIMA et al., 2013).

Determinação do pH

O pH foi determinado através de leitura direta das amostras, utilizando-se pHmetro da TECNAL, previamente calibrado.

Determinação do Brix

Foi realizada leitura direta do grau Brix das amostras em refratômetro digital da marca ABBE.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statística 7.0 e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

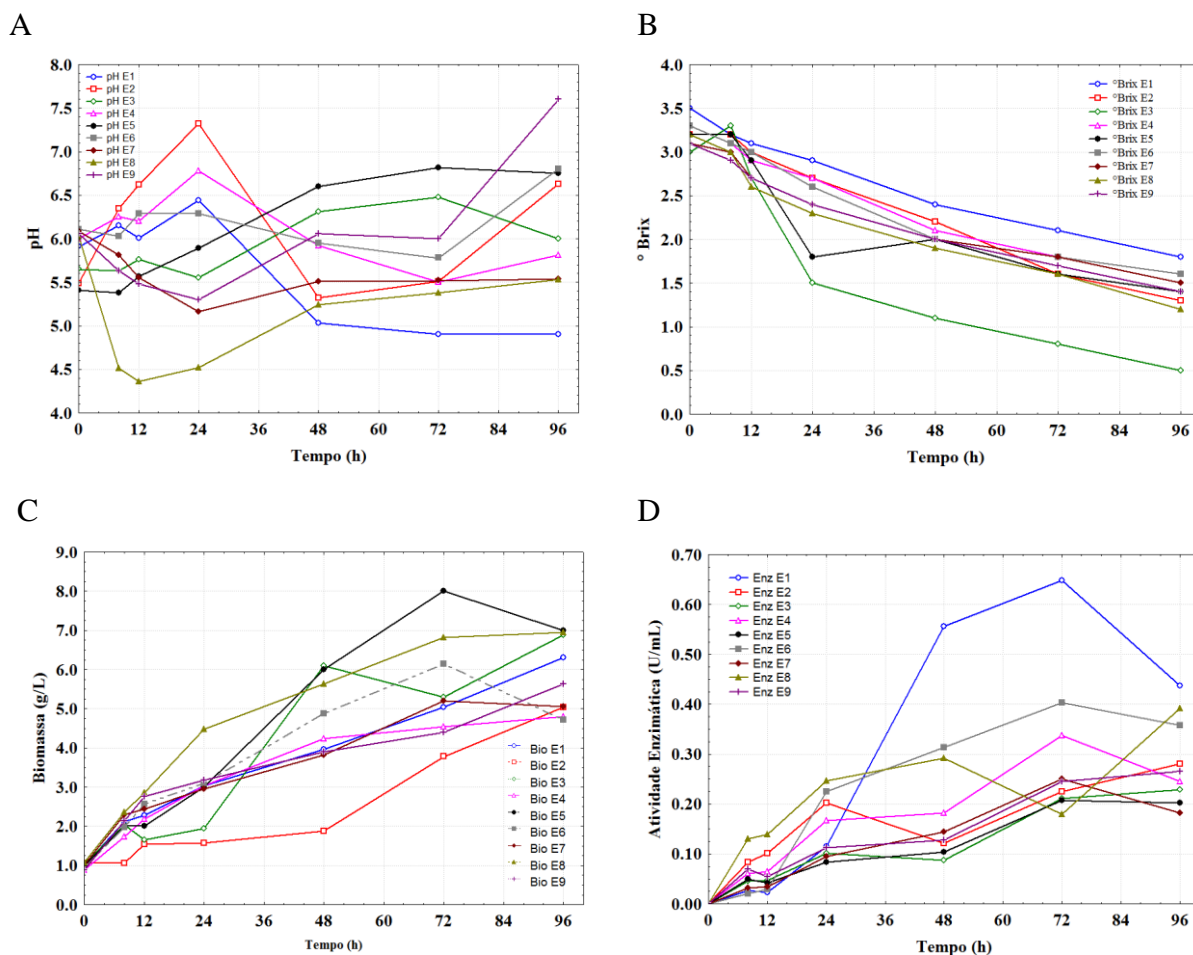
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção da Enzima β -galactosidase

Para obtenção da enzima por fermentação foi utilizada a técnica do planejamento de mistura simplex centroide. Os perfis cinéticos das fermentações em relação à biomassa, atividade enzimática, pH e Brix podem ser observados na Figura 2 e Tabelas 2 e 3, (Apêndice I). A fermentação foi conduzida de acordo com as condições estabelecidas no planejamento de mistura (Tabela 1).

Na Figura 1A, observa-se que os valores de pH permaneceram, inicialmente, na faixa de 5,5 e 6,1 para todos os ensaios, favorável ao crescimento de *Kluyveromyces lactis*. As maiores oscilações de pH podem ser observadas no meio E2 (7,3) e no meio E8 (4,9), porém os valores retornam à faixa favorável após 48 horas de fermentação. Segundo Alves et. al (2010), um estudo das condições de fermentação desempenham um papel importante na produção enzimática, estabelece um meio de cultura bem definido e otimizado, utilizando parâmetros como crescimento microbiano, temperatura e pH. Foram realizadas análises de Brix, Figura 1B, durante as fermentações que tecnicamente, significa a percentagem em sólidos de açúcar de sacarose pura. Os valores de grau Brix revelaram a tendência progressiva de consumo de açúcar ao longo da fermentação o qual acompanhou a curva de crescimento celular a partir das primeiras 12 horas. Na indústria, é comumente utilizado para expressar a quantidade de sólidos solúveis em solução, sendo assim considerado um método pouco específico para uma leitura mais precisa de consumo de açúcares (BALL, 2006).

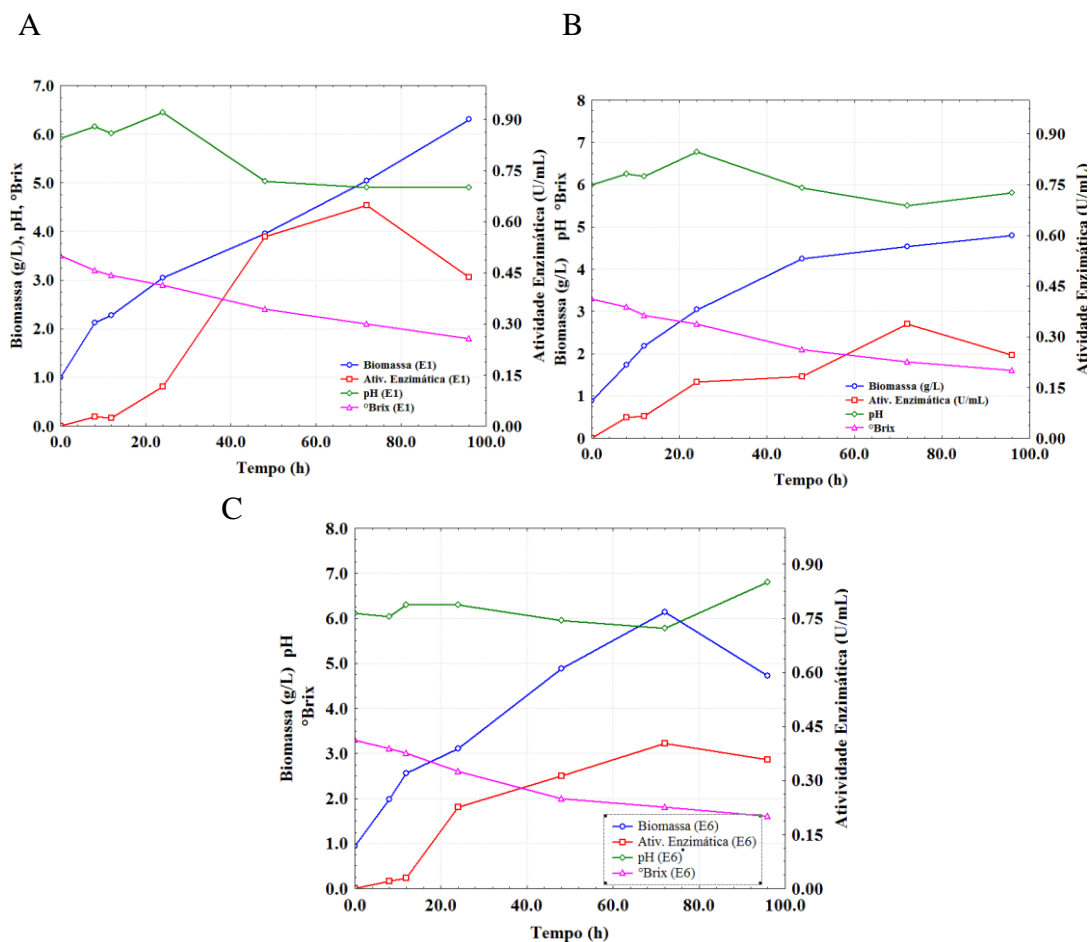
Figura 2. Cultivo de *Kluyveromyces lactis*, de acordo com planejamento experimental, a 30°C e 200rpm, com duração de 96hs. (A)pH ; (B) Brix ; (C) Biomassa (g/L); (D)Atividade Enzimática (U/mL).



De acordo com a Figura 1C, os resultados indicaram que os meios de fermentação com presença de sacarose, E5, E6 e E8, apresentaram melhores valores para crescimento de biomassa, com valores de 7,8 g/L, 6,1g/L e 6,8 g/L, respectivamente. As análises estatísticas do planejamento de mistura (Tabela 6), com relação à produção de biomassa, demonstraram que os meios compostos por sacarose PA obtiveram maior crescimento celular, (Figura 2A), em 48 horas de fermentação, demonstrando valores estatisticamente significativos, com coeficientes de determinação $R^2 = 0,72$, $R^2 = 0,7842$ e $R^2 = 0,8597$, para modelos linear, quadrático e cúbico, respectivamente.

Com relação à atividade enzimática, meios com presença de soro de queijo, E1, E4 e E6, apresentaram melhores resultados, com valores de 0,65 U/mL, 0,33 U/mL e 0,40 U/mL. A Figura 3 corresponde a estes perfis fermentativos com pH, atividade enzimática, biomassa e °Brix em função do tempo.

Figura 3. Perfil cinético de *K. lactis* dos ensaios: (A) E1- soro de queijo; (B) E4 - Soro de queijo + Lactose PA; (C) E6 - Soro de queijo + Sacarose PA.



As respostas foram estatisticamente significativas, evidenciando bom ajuste ao modelo quadrático, $R^2 = 0,94$, e ao modelo cúbico, $R^2 = 0,98$. Coeficientes de determinação ajustados, R_A^2 , não tendem a aumentar com a inclusão de variáveis independentes não significativas, o que confirma o bom ajuste dos modelos quadrático e cúbico, respectivamente, para atividade enzimática, com valores de $R_A^2 = 0,86$ e $R_A^2 = 0,93$, Tabela 7. Ao analisar o gráfico de superfície de resposta (Figura 5), verifica-se que as melhores condições para a produção enzimática foram obtidas nas fermentações utilizando o soro de leite como fonte de carbono.

Tabela 6. Coeficientes de resposta para Biomassa e Atividade Enzimática nos modelos linear, quadrático e cúbico em 48 horas de fermentação. S = Sacarose, L= Lactose.

48 horas												
Ensaio	Biomassa						Atividade Enzimática					
	Linear		Quadrático		Cúbico		Linear		Quadrático		Cúbico	
	$R^2 = 0,7238$		$R^2 = 0,7842$		$R^2 = 0,8597$		$R^2 = 0,4037$		$R^2 = 0,9103$		$R^2 = 0,9106$	
	$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,6318$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,4245$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,4387$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,2050$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,7608$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,6423$	
	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p
Soro	4,5978	<0,05	4,0808	<0,05	3,9600	>0,05	0,4097	<0,05	0,5552	<0,05	0,5560	<0,05
Lactose	2,3898	<0,05	2,0007	>0,05	1,8800	>0,05	0,1461	>0,05	0,1212	>0,05	0,1220	>0,05
Sacarose	6,5658	<0,05	6,2207	<0,05	6,1000	<0,05	0,0869	>0,05	0,0862	>0,05	0,0870	>0,05
Soro x L			2,8646	>0,05	5,2800	>0,05			-0,6123	>0,05	-0,6280	>0,05
Soro x S			2,4246	>0,05	4,8400	>0,05			-0,8544	>0,05	-0,8700	>0,05
L x S			1,1446	>0,05	3,5600	>0,05			0,8496	>0,05	0,8340	>0,05
Soro x L x S					-28,2600	>0,05					0,1830	>0,05

Tabela 7. Coeficientes de resposta para Biomassa e Atividade Enzimática nos modelos linear, quadrático e cúbico em 72 horas de fermentação. S = Sacarose, L= Lactose.

72 horas												
Ensaio	Biomassa						Atividade Enzimática					
	Linear		Quadrático		Cúbico		Linear		Quadrático		Cúbico	
	$R^2 = 0,3198$		$R^2 = 0,6534$		$R^2 = 0,7651$		$R^2 = 0,4181$		$R^2 = 0,9481$		$R^2 = 0,9821$	
	$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,093$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,0757$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,064$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,2242$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,8616$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,9284$	
	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p
Soro	5,7262	<0,05	5,1716	<0,05	5,0400	>0,05	0,4949	<0,05	0,6567	<0,05	0,6480	<0,05
Lactose	4,0462	<0,05	3,9162	<0,05	3,7800	>0,05	0,2349	>0,05	0,2337	<0,05	0,2250	<0,05
Sacarose	6,5742	<0,05	5,4362	<0,05	5,300	>0,05	0,1718	>0,05	0,2197	<0,05	0,2120	<0,05
Soro x L			-2,2031	>0,05	0,5200	>0,05			-0,5728	>0,05	-0,3980	>0,05
Soro x S			7,8769	>0,05	10,600	>0,05			-1,0649	<0,05	-0,8900	<0,05
L x S			3,6769	>0,05	6,400	>0,05			0,5651	>0,05	0,7400	>0,05
Soro x L x S					-31,8600	>0,05					-2,0460	>0,05

Tabela 8. Coeficientes de resposta para Biomassa e Atividade Enzimática nos modelos linear, quadrático e cúbico em 96 horas de fermentação. S = Sacarose, L= Lactose.

96 horas												
Ensaio	Biomassa						Atividade Enzimática					
	Linear		Quadrático		Cúbico		Linear		Quadrático		Cúbico	
	$R^2 = 0,5266$		$R^2 = 0,7236$		$R^2 = 0,7597$		$R^2 = 0,1470$		$R^2 = 0,6296$		$R^2 = 0,6418$	
	$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,3688$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,263$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,0389$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,0122$		$R^2_{\text{Ajustado}} = 0$	
	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p	Coeficientes	p
Soro	6,3404	<0,05	6,2403	<0,05	6,3000	<0,05	0,3491	<0,05	0,4338	<0,05	0,4370	>0,05
Lactose	4,3804	<0,05	4,9802	<0,05	5,0400	<0,05	0,2866	<0,05	0,2778	<0,05	0,2810	>0,05
Sacarose	6,7724	<0,05	6,8203	<0,05	6,8800	<0,05	0,2279	<0,05	0,2259	>0,05	0,2290	>0,05
Soro x L			-2,2851	>0,05	-3,4800	>0,05			-0,3934	>0,05	-0,4560	>0,05
Soro x S			3,2349	>0,05	2,0400	>0,05			-0,4614	>0,05	-0,5240	>0,05
L x S			-3,7651	>0,05	-4,9600	>0,05			0,4746	>0,05	0,4120	>0,05
Soro x L x S					13,9800	>0,05					0,7320	>0,05

Figura 4. Crescimento de biomassa de *K. lactis* e atividade enzimática de β -galactosidase em 48hs de fermentação. Modelos: A) Linear; B) Quadrático; C) Cúbico.

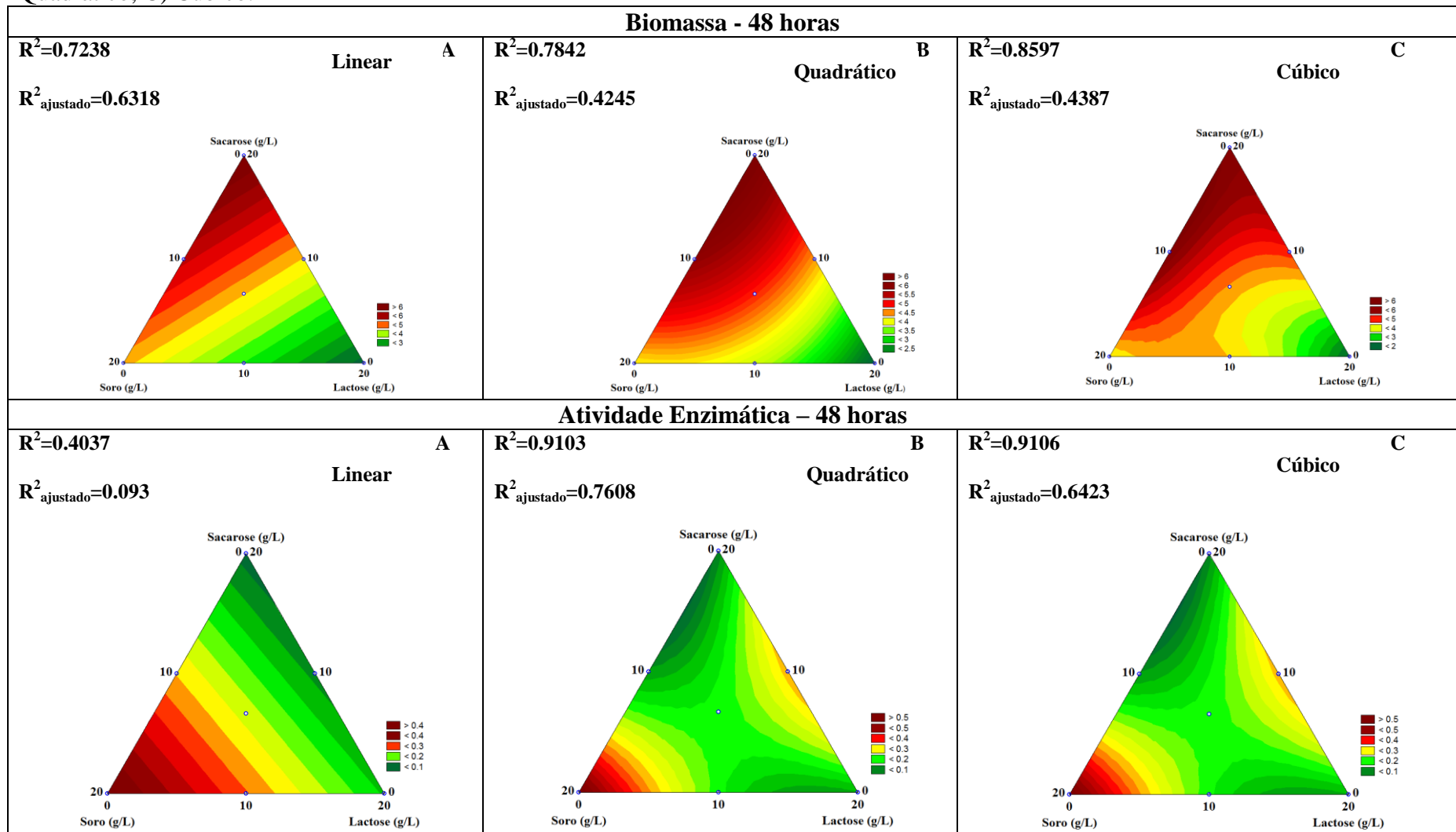


Figura 5. Crescimento de biomassa de *K. lactis* e atividade enzimática de β -galactosidase em 72hs de fermentação. Modelos: A) Linear; B) Quadrático; C) Cúbico.

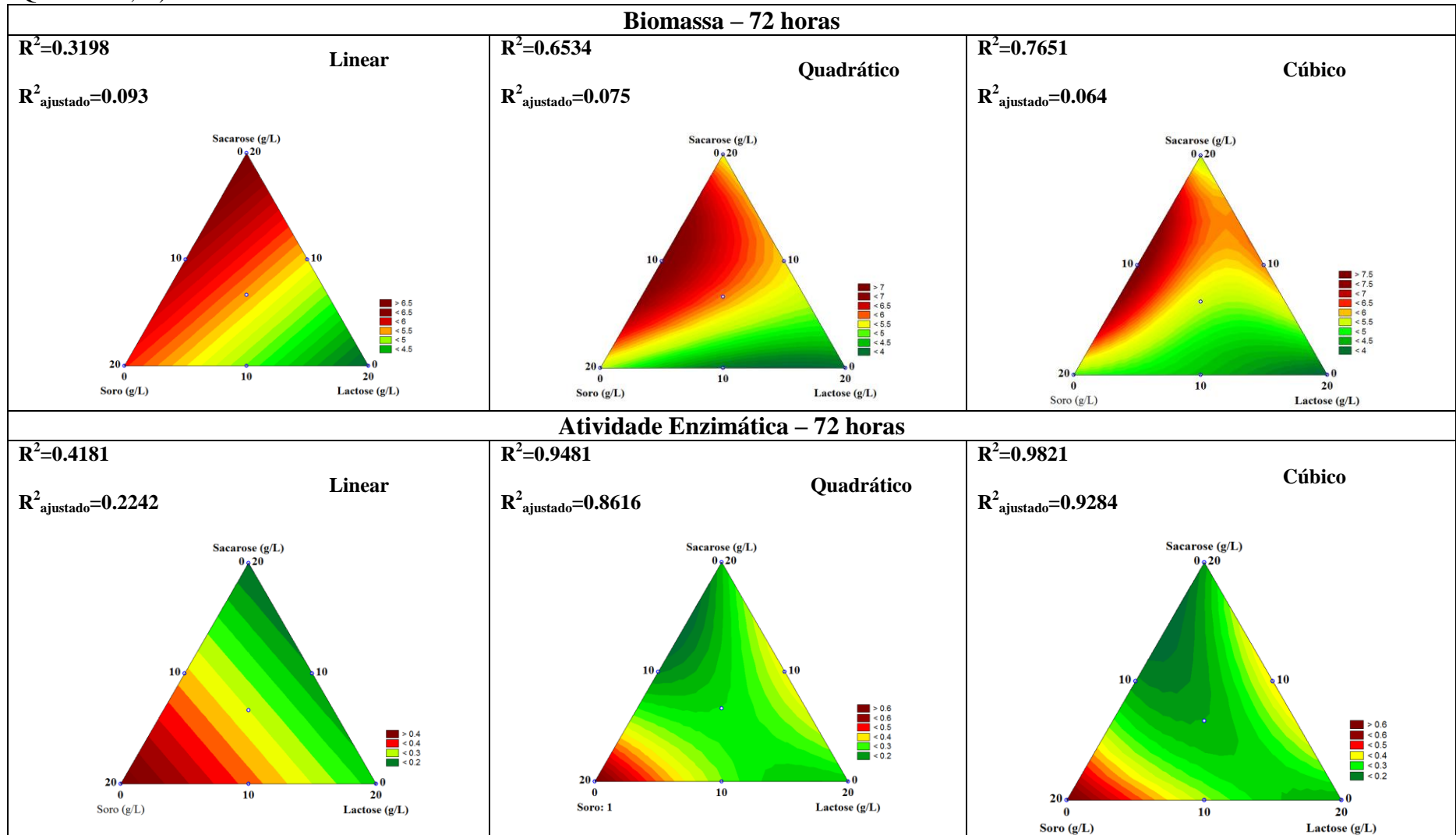
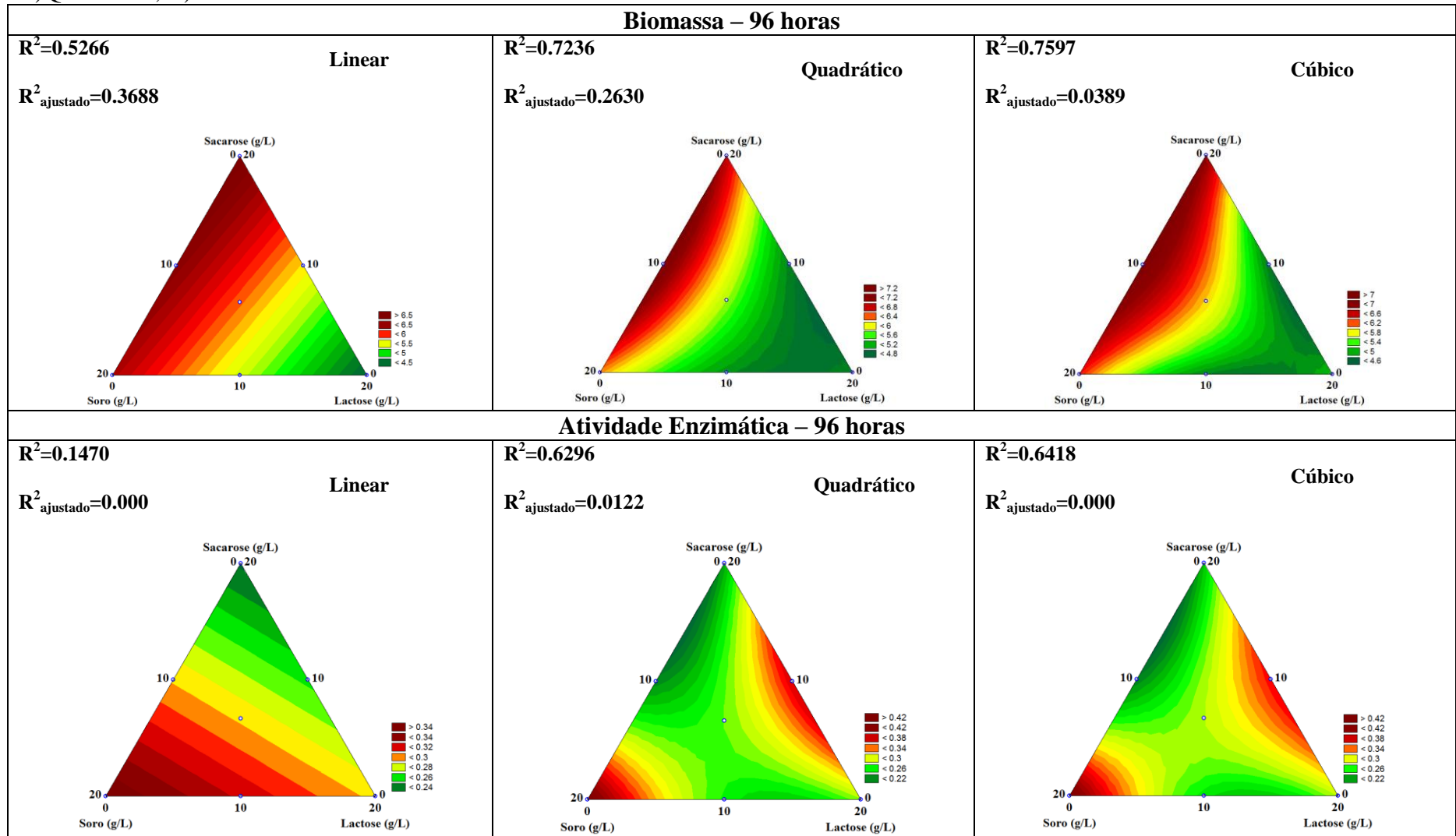


Figura 6. Crescimento de biomassa de *K. lactis* e atividade enzimática de β -galactosidase em 96 hs de fermentação. Modelos: A) Linear; B) Quadrático; C) Cúbico.



Fonseca, Carvalho e Gombert (2013) avaliando o crescimento celular máximo de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em diferentes fontes de carbono, constataram que os meios com maior crescimento celular foram os de sacarose com 5,73 g/L e os de lactose com 5,00 g/L, em temperaturas de 30 °C e 37 °C, com apenas 24 horas de fermentação. Lima et al. (2013), em estudo com cepas do gênero *Kluyveromyces* para produção de β -galactosidase a partir de soro de queijo em pó a 50 g/L de concentração inicial obtiveram apenas 1,97 g/L e 2,97 g/L de biomassa, valores estes próximos aos obtidos neste trabalho com os ensaios E2 (Lactose PA) e E5 (Lactose PA e Sacarose PA), entre 1,58 g/L e 2,90 g/L, respectivamente.

Estudo realizado por Lima et al. (2013), apresentou resultados de 0,33 U/mL e 0,75 U/mL, utilizando *K. marxianus* e *K. lactis*, respectivamente, em fermentações com soro de queijo mais concentrado (50g/L) que o presente estudo. Em contrapartida, Pereira et al. (2014) ao estudarem a influência das condições operacionais (agitação e aeração) na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564, também utilizando soro de queijo a 50 g/L, durante 24 horas de fermentação em diferentes condições de agitação e aeração, obtiveram valores entre 2,5 g/L e 7,5 g/L de biomassa e 1,01 U/mL e 0,87 U/mL de atividade enzimática. Como pode ser observado, meios que contém lactose como fonte única de carbono (como meios de soro de queijo e lactose PA) apresentam uma produção da β -galactosidase em função do aumento da concentração da biomassa.

Braga et al. (2012) estudaram 7 estirpes diferentes dentre microrganismos de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* quanto à melhor produção de β -galactosidase. Os microrganismos foram submetidos a fermentações de 72 horas, em meios com concentração inicial de lactose PA de 10 g/L, 30°C, 180 rpm e pH inicial de 5,5. As medidas de atividade enzimática de *Kluyveromyces lactis* foram registradas após 24 horas, com valores de 0,60 U/mL e 1,00 U/mL. Quanto ao microrganismo *Kluyveromyces marxianus*, os valores variaram de 0,90 U/mL, no período de 24 horas, a 9,00 U/mL, em 72 horas. Após seleção do melhor microrganismo, os autores aplicaram o planejamento experimental com o objetivo de otimizar a produção enzimática utilizando como fontes de carbono soro de queijo em pó e água de arroz parboilizado como fonte de nitrogênio. Os autores verificaram que o soro de queijo com 120 g/L de lactose e pH inicial 4,0, obteve-se aproximadamente 10,40 U/mL de enzima e valor máximo de biomassa de 4,8 g/L em 48 horas de fermentação.

Choonia e Lele (2013) estudaram a fermentação com *Lactobacillus acidophilus*, e avaliaram a influência da aeração, agitação e os tipos de fermentação na produtividade da enzima β -galactosidase em bioreactor de 5L. A fermentação em batelada apresentou atividade enzimática com valores de 2 U/mL. Fermentações de batelada alimentada e semi-contínua, apresentaram valores ainda maiores, com 3,70 U/mL e 5,60 U/mL, respectivamente. Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Sriphannam et al. (2012) que utilizaram a bactéria *Lactobacillus fermentum* CM 33 com objetivo de otimizar a produção da β -galactosidase, avaliaram meios de fermentação combinando lactose, triptona e Tween 80 em diferentes concentrações, utilizando-se de um planejamento experimental. Verificou-se que o meio com maior atividade enzimática apresentou valor de 0,60 U/mL, durante 16 horas de fermentação.

Os resultados obtidos no presente estudo podem ser atribuídos à interação de diversos fatores que podem interferir nas fermentações. Estas interferências podem variar desde a linhagem do microrganismo utilizada, como leveduras de diferentes espécies, natureza da fonte de carbono, fontes de nitrogênio e sais utilizadas até o controle das condições operacionais, como pH, temperatura, agitação e aeração. Assim, definem-se para próximos estudos 72 horas de fermentação em meios compostos por soro de queijo e sacarose. É importante ressaltar que este estudo serve de suporte para realizar a otimização de meios de fermentação, bem como a interferência de diferentes condições de fermentação que não foram avaliadas no presente trabalho, como agitação, aeração, temperatura, tipos de fermentação, e a relação de soro de queijo e sacarose para a produção da enzima β -galactosidase.

CONCLUSÕES

No presente estudo pode-se concluir que dentre as fontes de carbono utilizadas o soro de queijo apresentou melhores resultados para produção da enzima β -galactosidase. Meios com presença de sacarose apresentaram as melhores produções de biomassa com 72 horas de fermentação: E5(7,8g/L), E6(6,1 g/L) e E8 (6,8 g/L). Sendo modelo linear o de melhor ajuste, com $R^2=0,72$ e $R_A^2 =0,64$. Meios com presença de soro de queijo apresentaram maior produção enzimática em 72 horas de fermentação: E1(0,65 U/mL), E4(0,33 U/mL) e E6 (0,40 U/mL), com bom ajuste aos modelos quadrático ($R^2=0,95$ e $R_A^2 =0,86$) e cúbico ($R^2=0,98$ e $R_A^2 =0,93$).

A partir destes resultados, observa-se a viabilidade do soro de queijo como fonte de carbono para crescimento celular, visto que favorece a produção da enzima via fermentação por *Kluyveromyces lactis*, equivalente ou superior a fontes de carbono como sacarose e lactose puras, como verificado no presente estudo, além de ser considerado resíduo da indústria de laticínios e uma fonte de carbono de baixo custo.

REFERÊNCIAS

ALVES, F.G; MAUGERI, F. BURKET, J.F.M; KALIL, S.J. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1528-1539, 2010.

AKCAN, N. High level production of extracellular galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, V. 5, n.26, p. 4615-4621, 2011.

ANDRADES, D. ARFELLI, V.C; ORIENTE, A. HENN, C. PEREIRA, V.A.A.C; SIMÃO, R.C.G; SILVA, J.L.C; KADOWAKI, M.K. Improved production of β -galactosidase and β -fructofuranosidase by fungi using alternative carbon sources. **Scientific Research and Essays**, v. 10, n. 6, p. 236-242, 2015.

BALL, D.W. Concentration Scales for sugar solutions. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 10, p. 489-1491, 2006.

BRAGA, A.R.C; GOMES, P.A.; KALIL, S.J. Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for β -galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1653-1663, 2012.

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

CROSIER, R.B Mixture experiments: geometry and pseudocomponents. **Technometrics**, v.26, n.3, 1984.

DOMINGUES, L; GUIMARÃES, P.M.R; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 164-171, 2010.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p 21-26, 2010.

FONSECA, G.G; CARVALHO, N.M.B; GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, 5055-5067, 2013.

GUIMARÃES, P. M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, New York, v.28, n. 3, p. 375-384, 2010.

GUPTE, A.M; NAIR, J.S. β -galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69, p. 855-859, 2010.

HARE, L.B. Mixture designs applied to food formulation. **Food Technology**, Chicago, v.28, n.3, p.50-62, 1974.

HUSAIN, Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnoly** v.30, p. 41–62, 2010.

LEMES, A.C; ÁLVARES, G.T. KALIL, S.J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1. n. 2, p. 7-13, 2012.

LIMA, A.F; CAVALCANTE, K.F; FREITAS, M.F.M; RODRIGUES, T.H.S; ROCHA, M.V.R; GONÇALVES, L.R.B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, n. 48, p. 443-452, 2013.

MARÍN-NAVARRO, N; TALENS-PERALES, D; OUDE-VRIELINK, A; CAÑADA, F.J; POLAINA, J. Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use

for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 989-998, 2014.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

PEREIRA, M.P.B; SOUZA, T.C; LEMOS, C.M.G; LEMOS, J.A.M; GONÇALVES, L.R.B. Influência da transferência de oxigênio na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 utilizando soro de queijo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n.1, 2014.

PRAZERES, A.R; CARVALHO, F; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

SHEFFE, H. The simplex-centroid design for experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society Serie B (Methodological)**, v.20, n.2, p.344-360, 1958.

SRIPHANNAM, W; UNBAN, K; ASHIDA, H, YAMAMOTO, K; KHANONGNUCH, C. Medium component improvement for β -galactosidase production by a probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CM33. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 51, p. 11242-11251, 2012.

6 APÊNDICE

Tabela 2. Resultados de Biomassa (g/L) de fermentações a partir de misturas de fontes de carbono .

Valores codificados				Biomassa (g/L)						
Ensaio	Soro de queijo	Lactose PA	Sacarose PA	0	8	12	24	48	72	96
E1	1	0	0	1,00	2,12	2,28	3,04	3,96	5,04	6,30
E2	0	1	0	1,06	1,06	1,54	1,58	1,88	3,78	5,04
E3	0	0	1	1,04	2,04	1,66	1,94	6,10	5,30	6,88
E4	1/2	½	0	0,88	1,74	2,18	3,04	4,24	4,54	4,80
E5	0	½	1/2	0,66	1,90	1,90	2,90	6,24	7,82	7,10
E6	1/2	0	1/2	0,94	1,98	2,56	3,10	4,88	6,14	4,72
E7	1/3	1/3	1/3	1,02	2,30	2,44	2,96	3,82	5,20	5,06
E8	1/3	1/3	1/3	1,08	2,36	2,86	4,48	5,64	6,82	6,94
E9	1/3	1/3	1/3	0,88	2,14	2,76	3,18	3,90	4,40	5,64

Tabela 3. Resultados de Atividade enzimática (U/mL) de fermentações a partir de misturas de fontes de carbono.

Valores codificados				Atividade Enzimática Intracelular (U/mL)						
Ensaio	Soro	Lactose PA	Sacarose PA	0	8	12	24	48	72	96
E1	1	0	0	-	0,027	0,023	0,115	0,556	0,648	0,437
E2	0	1	0	-	0,083	0,101	0,202	0,122	0,225	0,281
E3	0	0	1	-	0,045	0,047	0,101	0,087	0,211	0,229
E4	1/2	½	0	-	0,061	0,065	0,167	0,182	0,337	0,245
E5	0	½	1/2	-	0,050	0,042	0,083	0,1035	0,207	0,202
E6	1/2	0	½	-	0,020	0,029	0,225	0,313	0,403	0,358
E7	1/3	1/3	1/3	-	0,032	0,034	0,095	0,144	0,250	0,182
E8	1/3	1/3	1/3	-	0,130	0,139	0,247	0,292	0,179	0,392
E9	1/3	1/3	1/3	-	0,069	0,054	0,113	0,128	0,245	0,265

Tabela 4. Resultados do grau Brix de fermentações a partir de misturas de fontes de carbono.

Ensaio	Valores codificados			°Brix						
	Soro	Lactose PA	Sacarose PA	0	8	12	24	48	72	96
E1	1	0	0	3,5	3,2	3	2,7	2,2	2,1	1,8
E2	0	1	0	3,2	3,2	3	2,7	2,2	1,6	1,3
E3	0	0	1	2,9	3,3	2,7	1,5	1,1	0,8	0,5
E4	1/2	1/2	0	3,3	3,1	2,9	2,7	2,1	1,8	1,6
E5	0	1/2	1/2	3,2	3,2	2,9	1,8	2	1,6	1,4
E6	1/2	0	½	3,3	3,1	3	2,6	2	1,8	1,6
E7	1/3	1/3	1/3	3,1	3	2,7	2,4	2	1,8	1,5
E8	1/3	1/3	1/3	3,2	3	2,6	2,3	1,9	1,6	1,2
E9	1/3	1/3	1/3	3,1	2,9	2,7	2,4	2	1,7	1,4

Tabela 5. Resultados de pH de fermentações a partir de misturas de fontes de carbono.

Ensaio	Valores codificados			pH						
	Soro	Lactose PA	Sacarose PA	0	8	12	24	48	72	96
E1	1	0	0	5,91	6,15	6,01	6,44	5,03	4,90	4,90
E2	0	1	0	5,49	6,35	6,62	7,32	5,32	5,51	6,63
E3	0	0	1	5,65	5,63	5,76	5,55	6,31	6,48	6,00
E4	1/2	1/2	0	6,00	6,25	6,20	6,78	5,92	5,50	5,81
E5	0	1/2	1/2	5,41	5,38	5,57	5,89	6,6	6,82	6,75
E6	1/2	0	½	6,11	6,03	6,29	6,29	5,95	5,78	6,80
E7	1/3	1/3	1/3	6,09	5,81	5,55	5,16	5,51	5,52	5,54
E8	1/3	1/3	1/3	6,03	4,51	4,36	4,52	5,24	5,38	5,53
E9	1/3	1/3	1/3	6,06	5,63	5,48	5,30	6,06	6,00	7,60