UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção e caracterização de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

UBERLÂNDIA – MG
ABRIL/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção e caracterização de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Coorientadora: Miriam Maria de Resende (UFU)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F194
2016

Falleiros, Larissa Nayhara Soares Santana, 1988-
Produção e caracterização de β-galactosidase de Kluyveromyces marxianus ATCC 46537 / Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros. - 2016.
139 f. : il.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
Coorientadora: Miriam Maria de Resende.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. β-galactosidade - Teses. 3. Bioetanol - Teses. 4. Soro do leite - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1957-. II. Resende, Miriam Maria de. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO DE LARISSA NAYHARA SOARES SANTANA FALLEIROS SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 15/04/2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(Orientador - PPGEQ/UFU)

Profª. Drª. Miriam Maria de Resende
(Co-orientadora – PPGEQ/UFU)

Profª. Drª. Claudia Maria Tomás Melo
(IFTM – Campus Uberlândia)

Profª. Drª. Gislaine Fernandes
(IFTM – Campus Uberaba)

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(PPGEQ/UFU)

Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso
(PPGEQ/UFU)

Profª. Drª. Helisângela de Almeida Silva
ICBIM/UFU

Profª. Drª. Renata Santos Rodrigues
(INGEB/UFU)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu amado esposo Idelmo, aos meus pais Avelino e Maria Aparecida, aos meus queridos irmãos, Karine e Alfredo pelo apoio, compreensão e amor incondicional em todos os momentos desta e de outras caminhadas. E em especial a Deus que é a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta conquista, por permitir, nestes tempos de desafios e aprendizados, descobrir amigos que são tesouros de Deus na minha vida.

Mas tudo só foi possível pelo apoio e amor da minha família.

Papai e Mamãe, muito obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus irmãos, Karine e Alfredo, por me suportar em todos os momentos.

Às minhas vovós e toda a família, pelo apoio e torcida.

Ao Idelmo, meu esposo, por fazer parte da minha vida, e à toda a sua família, pelo carinho e atenção.

Aos meus amigos que são amigos de Deus, por iluminar a minha vida.

Ao Prof. Eloízio e a Profa. Miriam pela orientação, amizade, confiança e permanente incentivo.

Aos professores e técnicos da FEQUI, pela paciência e dedicação.

Aos alunos de iniciação científica Karoline, Letícia, Lorrana, Lucas, Marina, Mariana e Thayne pelo empenho, dedicação e por toda a ajuda concedida.

À banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuírem com o enriquecimento do trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia pela parceria firmada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

A CAPES pela confiança depositada e suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desta etapa, que é apenas o início de um novo tempo, que trará consigo muitas vitórias.

Que venha o tempo.

"Contudo, seja qual for o grau a que chegamos,

o que importa é prosseguir decididamente."

Filipenses 3,16

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS iv

LISTA DE SÍMBOLOS vi

RESUMO vii

ABSTRACT viii

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO 9

1.1 OBJETIVOS **10**

1.1.1 Objetivos Específicos 10

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12

2.1 LEITE, SORO LÁCTEO E PERMEADO DE SORO **12**

2.1.1 Leite 12

2.1.2 Soro lácteo 14

2.1.3 Permeado de soro de leite 17

2.2 LACTOSE 19

2.2.1 Intolerância a lactose 21

2.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE 24

2.4 A ENZIMA β-GALACTOSIDASE 27

2.4.1 Extração e purificação de β-galactosidase 31

2.5 A LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* 34

2.6 PRODUÇÃO DE BIOETANOL 37

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS 39

3.1 MATERIAL 39

3.1.1 Microrganismo 39

3.1.2 Manutenção da cultura 40

3.1.3 Substrato 40

3.1.4 Tampão Lático 40

3.1.5 Meios de cultura 41

3.1.6 Enzima comercial 42
3.1.7 Unidades experimentais 42
3.1.7.1 Unidade experimental para a determinação da atividade enzimática 42
3.1.7.2 Unidade experimental para a fermentação 43
3.2 METODOLOGIA 45
3.2.1 Extração da enzima 45
3.2.1.1 Autólise por clorofórmio 45
3.2.1.2 Ruptura em agitador tipo vórtex 46
3.2.1.3 Ruptura em sonificador 46
3.2.1.4 Ruptura em processador ultrassônico 46
3.2.2 Determinação da atividade enzimática 47
3.2.3 Determinação da concentração e viabilidade celular 47
3.2.4 Determinação das concentrações de açúcares e etanol 48
3.2.5 Determinação da concentração de proteínas totais 48
3.3 TESTES PRELIMINARES PARA ESCOLHA DO MEIO PARA INÓCULO 48
3.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR 49
3.5 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 49
3.6 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 50
3.6.1 Avaliação da composição do meio fermentativo na Co-Produção de bioetanol 52
3.7 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 53
3.7.1 Influência conjunta da aeração e agitação na co-produção de bioetanol 55
3.8 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 55
3.8.1 Determinação das constantes cinéticas 55
3.8.2 Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase 55

3.8.3 Influência do pH na atividade de β-galactosidase 56

3.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 56

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

4.1 TESTES PRELIMINARES PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 59

4.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR 61

4.3 ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASES DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 64

4.4 INFLUÊNCIA DO pH E DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 67

4.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 69

4.5.1 Avaliação da composição do meio fermentativo na Co-Produção de bioetanol 76

4.6 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO VOLUMÉTRICO (K_La) 83

4.7 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 84

4.7.1 Influência conjunta da aeração e agitação na co-produção de bioetanol 89

4.8 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE A PARTIR DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 95

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus* 98

4.9.1 Determinação das constantes cinéticas 98

4.9.2 Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase 101

4.9.3 Influência do pH na atividade enzimática 102

4.9.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 103

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES 106

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 108
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
ANEXO 136
APÊNDICE 138

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Molécula de lactose (Fonte: www.3dchem.com). 19
Figura 2.2 – Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos (GAL: Galactose, E: Enzima, LAC: Lactose, GLC: Glicose, ROH: Radical hidroxila) (MAHONEY, 1998). 24
Figura 2.3 – Processos de hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984) 25
Figura 2.4 – Classificação de métodos de ruptura celular (GÜNERKEN *et* al., 2015) 32
Figura 3.1 – Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental 39
Figura 3.2 – Unidade experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel 43
Figura 3.3 – Reator cônico de bancada 44
Figura 3.4 – Fermentador Biostat B utilizado para avaliação conjunta da aeração e agitação na atividade da enzima. 45
Figura 4.1 – Quantificação de células vivas no início e no final da preparação do inóculo utilizando diferentes meios de cultivo. Meio 1 (Pinheiro *et* al., 2003); Meio 2 e 3 (Santiago *et* al., 2004) 60
Figura 4.2 – Curva de crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 62
Figura 4.3 – Ajuste dos resultados experimentais à Equação 3.1 para determinação da taxa específica máxima de crescimento 63
Figura 4.4 – Influência do tempo nos processos de ruptura em agitador tipo vórtex e processador ultrassônico na atividade enzimática da β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537. 65
Figura 4.5 – Influência do tempo nos processos de ruptura em agitador tipo vórtex e processador ultrassônico na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537. 66
Figura 4.6 – Distribuição de resíduos relativos à atividade enzimática específica. 73
Figura 4.7 – Valores preditos em relação aos observados em relação à atividade enzimática específica. 73
Figura 4.8 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a atividade enzimática específica. 74
Figura 4.9 – Curvas de contorno da influência da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus*. 75
Figura 4.10 – Distribuição de resíduos relativos à produção de bioetanol. 79
Figura 4.11 – Valores preditos em relação aos observados da produção de bioetanol 79

Figura 4.12 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para produção de bioetanol.....80
Figura 4.13 – Curvas de contorno da influência da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na co-produção de bioetanol em função das variáveis estudadas..81
Figura 4.14 – Distribuição de resíduos relativos à atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado 86
Figura 4.15 – Valores preditos em relação aos observados relativos à atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado.....87
Figura 4.16 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a atividade enzimática volumétrica. 87
Figura 4.17 – Curva de contorno da influência da agitação e aeração na atividade volumétrica da enzima β-galactosidase de *K. marxianus*. 88
Figura 4.18 – Distribuição de resíduos relativos à produção de bioetanol.....92
Figura 4.19 – Valores preditos em relação aos observados relativos à produção de bioetanol. 92
Figura 4.20 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a produção de bioetanol.....93
Figura 4.21 – Curva de contorno da influência da agitação e aeração na produção de bioetanol a partir de fermentação de permeado de soro de leite utilizando a levedura *K. marxianus*. 94
Figura 4.21 – Perfil de atividade enzimática durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus*.....96
Figura 4.22 – Variação do pH e oxigênio dissolvido durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus*.....96
Figura 4.23 – Perfil de concentração de lactose, etanol e biomassa durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus.* 97
Figura 4.24 – Influência da concentração de lactose (S) na velocidade inicial da reação da enzima β-galactosidase de *K. marxianus.* 99
Figura 4.25 – Valores preditos em função dos valores observados.....100
Figura 4.26 – Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 em tampão lático pH 6,5. 101
Figura 4.27 – Influência do pH na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537. 103

Figura 4.28 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para amostras obtidas por diferentes tratamentos.. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca. 13
Tabela 2.2 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro de leite doce e ácido. ... 15
Tabela 2.3 – Propriedades de algumas lactases microbianas 28
Tabela 2.4 - Principais β-galactosidases comerciais e suas propriedades (PIVARNIK *et* al., 1995). 30
Tabela 2.5 – Visão geral de aplicações industriais e biotecnológicas de *K. marxianus* para diferentes cepas. 36
Tabela 3.1 – Composição do meio de manutenção YMA 40
Tabela 3.2 – Concentrações dos sais no tampão lático 41
Tabela 3.3 – Composições dos meios de cultura 41
Tabela 3.4 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Fatorial Fracionário 50
Tabela 3.5 - Valores reais e codificados utilizados no Delineamento Composto Central 51
Tabela 3.6 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis. 52
Tabela 3.7 - Valores reais e codificados utilizados no Delineamento Composto Central 54
Tabela 3.8 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis. 54
Tabela 4.1 – Atividade enzimática do inóculo obtido utilizando diferentes meios de cultivo . 60
Tabela 4.2 – Resultados de atividade enzimática da ruptura das células de *K. marxianus* ATCC 46537 utilizando diferentes métodos de extração 64
Tabela 4.3 – Os valores reais e os valores codificados (entre parênteses) e resultados experimentais de atividade específica obtido pelo Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} ensaios acrescidos de 3 pontos centrais 68
Tabela 4.4 – Estimativa de efeitos para a atividade de β-galactosidase[a] utilizando um Planejamento Fatorial Fracionário 69
Tabela 4.5 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da composição do meio de fermentação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*. 70
Tabela 4.6 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de atividade enzimática específica. 71
Tabela 4.7 – ANOVA para a resposta de atividade específica. 72
Tabela 4.8 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da composição do meio de fermentação na co-produção de bioetanol em pH 7,0. 77
Tabela 4.9 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de rendimento em etanol. 78

Tabela 4.10 – Resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação no coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (K_La) 83
Tabela 4.11 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*..... 84
Tabela 4.12 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de atividade enzimática específica. 85
Tabela 4.13 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática volumétrica. 85
Tabela 4.14 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*..... 90
Tabela 4.15 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de produção de bioetanol. 90
Tabela 4.16 – ANOVA para a resposta produção de etanol. 91
Tabela 4.17 – Atividade enzimática (V) em função da concentração inicial de lactose (S). ... 98

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta - formas anoméricas da enzima β-galactosidase
α	Alfa - formas anoméricas da enzima β-galactosidase
$\mu_{máx}$	Taxa específica máxima de crescimento
K_m	Constante de Michaelis
p	Nível de significância
R^2	Coeficiente de correlação
t	Tempo
t	t de student
t_{lag}	Tempo da fase de latência
U	Unidade de atividade definida como 1 µmol de glicose produzida por minuto
$V_{máx}$	Valor máximo da velocidade inicial
x	Concentração de células
x_0	Concentração inicial de células

RESUMO

A enzima β-galactosidase tem apresentado uso crescente na indústria de laticínios, visto que a mesma pode ser empregada na prodrução de uma mistura isomolecular de glicose e galactose, além de possuir uma grande aplicação biotecnológica na produção de leite com baixo teor de lactose, na produção de galacto-oligossacarídeos a partir da lactose do soro e como etapa preliminar para síntese de d-tagatose. Têm-se ainda um grande interesse na otimização das condições de fermentação e composição do meio para aumentar a produção de β-galactosidase, a fim de alcançar um elevado rendimento de produção de baixo custo. A levedura *Kluyveromyces marxianus* é uma importante levedura industrial para fermentação de lactose, tendo aplicações clássicas na produção de biomassa, etanol e enzimas. Neste trabalho foi estudada a produção e caracterização da enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 produzida por fermentação de permeado de soro de leite. As fermentações utilizaram meio à base de permeado de soro de leite e as análises de etanol e açúcares foram feitas por cromatografia líquida. A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais e a glicose formada era dosada por glicose-oxidase. A unidade de atividade enzimática U mL^{-1} foi definida como μmol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática, à temperatura de 30 °C, pH 6,5, com uma concentração inicial de lactose de 50 g L^{-1}. O meio para obtenção do inóculo foi o meio composto por extrato de levedura (6,0 g L^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e permeado de soro de leite em pó (concentração de lactose 50 g L^{-1}), preparado em tampão fosfato 10^{-1} M pH 5,5. Foi estudada a cinética de crescimento da levedura e obteve-se o valor da μ_{max} de 0, 288 h^{-1} e tempo de geração nesta fase de 2,41 horas. Diferentes métodos de extração de β-galactosidase foram avaliados, sendo a extração em agitador tipo vórtex e em processador ultrassônico os que apresentaram os melhores resultados. Foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário para estudar a influência do pH e composição do meio na produção de β-galactosidase e obteve-se que, a produção de β-galactosidase foi afetada de modo mais significativo por lactose, seguido de $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura e pH. A composição do meio fermentativo foi avaliada por um Delineamento Composto Central para a síntese de β-galactosidase e os melhores resultados foram alcançados para as concentrações de lactose variando de 100 a 150 g L^{-1}, extrato de levedura inferior a 6 g L^{-1} e $(NH_4)_2SO_4$ entre 2 e 8 g L^{-1}. A influência conjunta da velocidade de agitação e taxa de aeração foi avaliada pela realização de Delineamento Composto Central que obteve atividade enzimática de 139,58 U mL_{caldo}^{-1} no ponto central (250 rpm e 0,75 vvm). Avaliou-se a co-produção de bioetanol por fermentação do permeado de soro de leite usando *K. marxianus*. O maior valor observado para concentração de bioetanol (36,94 g L^{-1}) foi obtido na fermentação em que utilizou-se da velocidade de agitação de 427 rpm e taxa de aeração de 0,24 vvm, o que implica em um rendimento de 72,3%. Verifica-se, pela análise conjunta das regiões ótimas para as respostas atividade enzimática e co-produção de bioetanol, que há faixas das regiões que implicam em altos valores de atividade enzimática e bioetanol simultaneamente, sendo elas: agitação de 200 a 400 rpm com aeração entre 0,4 a 1,2 vvm. Estes resultados indicam uma alternativa promissora para a valorização do permeado de soro de leite na produção conjunta de β-galactosidase e bioetanol. O extrato enzimático produzido foi caracterizado e as constantes cinéticas obtidas para $V_{máx}$ e K_m foram, respectivamente, 11,01 U mL^{-1} e 3,62 g L^{-1}. A enzima produzida apresentou maior atividade a uma temperatura de 45 °C e obteve-se altos valores de atividade relativa em tampão lático na faixa de pH de 5,5 a 7,3. A eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato enzimático apresentou uma subunidade de massa molecular 52,3 kDa coincidente com a amostra de referência (Lactozyme® 2600) indicando a presença de subunidades de β-galactosidase no extrato produzido.

Palavras-chave: β-galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, permeado de soro de leite, bioetanol

ABSTRACT

β-galactosidase has presented increased use in the dairy industry, since it can be used to produce a isomolecular mixture of glucose and galactose and also has wide application in biotechnological production of milk with a low-lactose content, in production of galacto-oligosaccharides from whey lactose and as a preliminary step to d-tagatose synthesis. Exist still a great interest in the optimization of fermentation conditions and of medium composition to increase the production of β-galactosidase in order to achieve a high yield of low cost production. The yeast *Kluyveromyces marxianus* is an important industrial yeast for fermentation of lactose, having classic applications in the production of biomass, ethanol and enzymes. In this work the production and characterization of β-galactosidase from *K. marxianus* ATCC 46537 produced by fermentation of whey permeate were studied. The fermentation medium used was based in permeate whey and analysis of sugars and ethanol were made by liquid chromatography. Enzymatic activity was determined by the initial rates and glucose formed was measured by glucose oxidase. The enzyme activity unit (U mL^{-1}) was defined as μmol of glucose produced per minute per mL enzyme suspension at a temperature of 30 °C, pH 6.5, with an initial lactose concentration of 50 g L^{-1}. The medium to obtain inoculum was the medium composed of yeast extract (6.0 g L^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (6.0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0.6 g L^{-1}) permeate whey (lactose concentration of 50 g L^{-1}) prepared in phosphate buffer 10^{-1} M pH 5.5. Was studied the growth kinetic of the yeast and was obtained the μ_{max} of 0, 288 h^{-1} and generation time of 2.41 hours in this stage. Different methods of β-galactosidase extraction were evaluated and the extraction by vortex agitator and ultrasonic processor were who showed the best results. A Fractional Factorial Design was performed to study the influence of pH and medium composition on the production of β-galactosidase for which it was obtained that the maximum production of β-galactosidase was affected more significantly by lactose, followed by $(NH_4)_2SO_4$, yeast extract and pH. The fermentative medium composition was evaluated using a Central Composite Design, the best results were obtained for lactose concentrations ranging from 100 to 150 g L^{-1}, yeast extract lower than 6 g L^{-1} and $(NH_4)_2SO_4$ between 2 and 8 g L^{-1}. The simultaneous influence of agitation speed and aeration rate was evaluated by performing a Central Composite Design that resulted in enzymatic activity of 139.58 U $mL_{fermented\ broth}^{-1}$ at the central point (250 rpm and 0.75 vvm). Was evaluated the co-production of bioethanol by fermentation of whey permeate by using *K. marxianus*. The highest value observed for bioethanol concentration (36.94 g L^{-1}) was obtained in the fermentation in which was used agitation speed of 427 rpm and aeration rate of 0.24 vvm, which implies a yield of 72.3 %. Was verified, by simultaneous analysis of the optimum regions for the answers of enzyme activity and bioethanol co-production, regions that imply high values for enzymatic activity and bioethanol, simultaneously, as follows: agitation speed 200-400 rpm with rate aeration of 0.4 to 1.2 vvm. These results indicate a promising alternative for the valorization of whey permeate in the simultaneous production of β-galactosidase and bioethanol. The enzyme extract produced were characterized and the kinetic constants obtained for V_{max} and K_m were respectively 11.01 U mL^{-1} and 3.62 g L^{-1}. The produced enzyme was most active at a temperature of 45 °C and obtained high values of relative activity in lactic acid buffer at pH 5.5 to 7.3. The polyacrylamide gel electrophoresis the enzyme extract showed a subunit molecular mass of 52.3 kDa coincident with the reference sample (Lactozyme® 2600) indicating the presence of β-galactosidase subunits produced in the extract.

Keywords: β-galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, whey permeate, bioethanol

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

A lactose é um dissacarídeo abundante no leite e no soro de leite, contudo a sua utilização em produtos lácteos é bastante limitada devido ao seu baixo poder adoçante, à sua baixa solubilidade, forte tendência em absorver odores e sabores, além de ser um açúcar higroscópico, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó (PESSELA *et* al., 2003; HARJU *et* al., 2012). Outra restrição deve-se à intolerância a este dissacarídeo por grande parte da população mundial. Além disso, a lactose causa sérios problemas no tratamento de águas residuárias das indústrias de laticínios, devido à sua baixa biodegradabilidade, que é responsável pelo aumento de demanda bioquímica e química de oxigênio (SANTOS *et* al., 1998; PAKIZEH e NAMVAR-MAHBOUB, 2011).

A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em suas composições, aumentando assim a disponibilidade de nutrientes aos produtos lácteos e a nível mundial, a atenuação por intolerância à lactose. Além disso, a hidrólise de lactose para a produção de monossacarídeos mais doces como a glicose e galactose permite sua utilização como edulcorantes nos xaropes gelados e outros produtos lácteos e também em alimentos não-lácteos (GÄNZLE, HAASE e GELLEN, 2008). Esta conversão é de considerável interesse, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (MORRISSEY, 1985).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial, nele a enzima β-galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação β (1-4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose. Além de catalisar a conversão da lactose a glicose e galactose, a β-galactosidase catalisa também a reação de transgalactosilação; a lactose serve como doador de unidades de galactosil e um aceptor para a fórmula di-, tri- e outros galacto-oligossacarídeos (GOS) mais elevados (SHEN *et* al., 2011; SANDER *et* al., 2016).

Outra aplicação para hidrólise da lactose é a produção de d-tagatose, que é uma hexose que ocorre naturalmente. Raramente se encontra na natureza e exibe uma ampla gama de propriedades saudáveis, visto que possui propriedades prebióticas, é de baixo índice glicêmico e não-cariogênico, apresentando-se como um potencial substituto da sacarose. A produção biológica de d-tagatose envolve a hidrólise de lactose por β-galactosidase e

isomerização de d-galactose produzida em tagatose por d-L-arabinose isomerase (VAN DE VOORDE *et* al., 2014; ZHENG *et* al., 2016).

A enzima β-galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático β-D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β-D-galactose e α-D-glicose (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH e CLARK, 1997; CARMINATTI, 2001; ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005; LONGO, 2006). Esta enzima está amplamente distribuída na natureza, e muitos estudos foram relatados sobre a produção da mesma a partir de diferentes fontes, incluindo plantas, animais e vários microrganismos tais como bactérias, leveduras, fungos e arqueobactérias (KISHORE e KAYASTHA, 2012).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é uma importante levedura industrial para fermentação de lactose, tendo aplicações clássicas na produção de biomassa, bioetanol e enzimas, oferecendo expressivas vantagens, tais como rendimento, aceitabilidade como microrganismo seguro e alta atividade da enzima β-galactosidase quando comparada com outras leveduras (LANE e MORRISSEY, 2010).

1.1 OBJETIVOS

Com base no exposto até o momento, tem-se como objetivo geral do presente trabalho estudar a produção e caracterização da enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 produzida por fermentação de permeado de soro de leite.

1.1.1 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos têm-se:

- Avaliar diferentes meios de cultura para obtenção do inóculo;
- Estudar a cinética de crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537;
- Avaliar processos de ruptura celular mecânicos e não mecânicos para extração da enzima β-galactosidase;
- Avaliar e otimizar a composição do meio fermentativo e do pH na produção de β-galactosidase por fermentação submersa;
- Estudar a influência da aeração e agitação na produção de β-galactosidase em fermentador;

- Caracterizar o extrato concentrado da enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537;
- Avaliar a co-produção de bioetanol por fermentação do permeado de soro de leite.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho, dando ênfase para o soro lácteo, o permeado de soro de leite, a hidrólise de lactose, a enzima β-galactosidase e a levedura *K. marxianus*, que vem sendo motivo de muitos estudos. Foi realizada uma revisão dos trabalhos que avaliaram a produção de β-galactosidase de *K. marxianus*, sua extração do interior da levedura e sua aplicação na co-produção de etanol.

2.1 LEITE, SORO LÁCTEO E PERMEADO DE SORO

2.1.1 Leite

O leite é um alimento rico em nutrientes, considerado uma fonte completa de nutrientes para os seres humanos, e é amplamente comercializado e consumido pelas populações ao redor do mundo. O leite em pó também tem um papel importante nas dietas da população humana, bem como na economia mundial (BUNACIU *et* al., 2016).

O leite, segundo a instrução normativa n° 51 publicada em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). O leite pode ser definido como o fluido secretado pela fêmea de todas as espécies de mamíferos, principalmente para satisfazer o requisito nutricional completo do neonato (TRIENEKENS e ZUURBIER, 2008).

A composição do leite de vaca varia de acordo com a espécie, a raça, a alimentação, o tempo de gestação e outros fatores. Assim, é difícil definir uma composição “normal” do leite. Entretanto, as relações entre seus diferentes constituintes são muito estáveis e podem ser utilizadas para indicar se houve qualquer adulteração na sua composição (BLOWEY, 1992). A composição aproximada do leite de vaca é apresentada na Tabela 2.1.

O leite é constituído por mais do que 80 % de água (MCCLURE e STANFIELD, 2002). A maior parte da água encontra-se como água livre, embora haja água ligada a outros componentes, como a proteínas, lactose e substâncias minerais. A gordura no leite ocorre como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoproteíca. O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos

e os principais são o ácido palmítico e o ácido oléico. A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (SILVA, 1997).

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca.

Constituinte	Teor (g/kg)	Variação (g/kg)
Água	873	855-887
Lactose	46	38-53
Gordura	39	24-55
Proteínas	32,5	23-44
Substâncias minerais	6,5	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3-2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptado de Walstra e Jenness, 1984.

A lactose é o carboidrato mais importante do leite e é conhecida popularmente como "açúcar do leite". Praticamente, o leite e o soro de leite são as fontes exclusivas de lactose, e a lactose é encontrada nas proporções (em termos de sólidos totais) de 40% a 50% no leite desnatado e 75% no soro de leite (SPREER, 1975; GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1988; PORTO, 2001). A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono para microrganismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (WALSTRA e JENNESS, 1984).

Segundo Andreas *et* al. (2015) a lactose está presente na concentração mais elevada em leite humano em comparação com todas as outras espécies, o que corresponde às elevadas exigências de energia do cérebro humano.

As proteínas presentes no leite podem ser divididas em três grupos: caseína, proteínas de soro de leite e proteínas de mucina (LONNERDAL, 2003). Proteínas do soro e caseína são classificadas de acordo com a sua solubilidade, sendo as proteínas do soro do leite solúveis presentes na solução, enquanto que as caseínas estão presentes em micelas de caseína, em suspensão numa solução (JENSEN, 1995). As mucinas estão presentes na membrana dos glóbulos de gordura do leite (LONNERDAL, 2004).

O leite contém teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos. A associação entre os sais e as proteínas do leite é um fator determinante para a estabilidade das caseínas frente a diferentes agentes desnaturantes (SILVA, 1997). O leite contém ainda diversas vitaminas, classificadas como lipossolúveis, A, D, E, e K e hidrossolúveis, B e C (TRONCO, 2003).

As principais propriedades físico-químicas do leite são: pH, que varia de 6,4 a 6,9; acidez, cujos valores estão entre 0,14 a 0,18 g de ácido lático em 100 mL; densidade relativa, que varia de 1,028 a 1,034 g/mL e índice crioscópico máximo de -0,512ºC, sendo esta característica a mais constante do leite e aquela mais utilizada pelos laticínios para detecção de adulteração do mesmo com água. Essas propriedades auxiliam na caracterização do leite e determinação da sua qualidade (BRASIL, 2002).

O leite bovino é comercializado em sua forma líquida, integral ou desengordurado, e pasteurizado ou esterilizado. Essas mesmas formas são também comercializadas desidratadas (leite em pó). Além disso, a indústria criou nichos de mercado dentro do segmento, com produtos para cada tipo de necessidade específica, onde é possível encontrar leite enriquecido com ferro e cálcio, com 0% de gordura, isento de lactose, com adição de fibras, com adição de melatonina, ficando a critério do consumidor escolher qual o melhor produto para a sua necessidade.

2.1.2 Soro lácteo

Soro de leite é o líquido formado como um subproduto na fabricação de queijo ou outros produtos lácteos coagulados (GOYAL e GANDHI, 2009). O soro de leite também pode ser definidos como "leite permeado" obtido após a coagulação das proteínas do leite por adição de ácidos ou de enzimas proteolíticas, tais como o coalho (PANESAR *et* al., 2007). Tipicamente, a produção de 1 kg de queijo está associada com a geração de 9 litros de soro de leite líquido, que é uma quantidade substancial e leva a preocupações ambientais (KOSIKOWSKI, 1979; SISO, 1996; JELEN, 2000).

Do ponto de vista industrial, o soro de leite pode ser classificado em dois tipos de acordo com a forma de remoção da caseína. Se a remoção da caseína presente no soro é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado soro ácido, agora, se a caseína for removida pela ação da renina tem-se o soro doce, que contém, em geral, maior quantidade de

pequenos peptídeos e aminoácido livres, que são resultantes da ação da renina sobre as caseínas (PANESAR *et* al., 2007; PINTO, 2008). Segundo Sgarbieri (2004) o soro de leite também pode ser obtido pelo processo de separação física das micelas de caseína por micro-filtração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico.

Em ambos os tipos de soro de leite, a água é o principal constituinte de sua composição (90-92 % da composição total) os demais constituintes incluem lactose (4-5 % m/v), proteínas do soro (0,6-0,8 % m/v), lípidos (0,4-0,5 % m/v) e outros componentes tais como sais minerais, presentes em menor quantidade (SISO, 1996). Do teor total em sólidos, a lactose está presente em maior proporção (70-72%), enquanto que os minerais e proteínas de soro de leite constituem cerca de 12-15 % e 8-10 %, respectivamente (JELEN, 2000; PANESAR et al, 2007;).

Na Tabela 2.2 é apresentada uma comparação entre as composições do leite integral, leite desnatado, soro doce e soro ácido.

Tabela 2.2 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro de leite doce e ácido.

Componente (%)	**Leite Integral**	**Leite Desnatado**	**Soro Doce (pH 6,7)**	**Soro Ácido (pH 4,6)**
Umidade	84,7	90,4	93,7	93,5
Lactose	4,8	5,1	4,9	4,9
Gordura	3,5	0,1	0,5	0,04
Proteína	3,5	3,6	0,8	0,7
Cinzas	0,7	0,7	0,5	0,8

Fonte: USDEC, 2009

Dos componentes presentes no soro, a lactose e as proteínas solúveis são os mais importantes. As proteínas possuem alto valor nutricional, pois, contém todos os aminoácidos essenciais e a lactose por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos e como componente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (DEKKER e DAAMEN, 2011).

A produção mundial de soro de leite aumentou acentuadamente nas últimas décadas, juntamente com a produção de queijo (DERMIKI *et* al., 2008), sendo estimada na ordem dos 160 milhões de toneladas por ano (MAGALHÃES *et* al., 2010). Em média, em todo o mundo,

o volume de soro de leite está crescendo a uma taxa quase a mesma que os volumes de leite, cerca de 42% ao ano (SMITHERS, 2008).

A produção mundial do leite de vaca em 2014 foi de 491 bilhões de litros, estando o Brasil na quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais, produzindo cerca 26 bilhões de litros/ano. Quanto à produção de queijos, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com um total de aproximadamente 751.000 toneladas em 2015, gerando em torno de 7,5 bilhões de litros de soro de leite (USDA, 2015).

O descarte do soro de leite nos cursos d'água, como rios, lagos ou em campos abertos leva a importante risco para o ambiente, bem como perda de nutrientes vitais como proteínas, peptídeos, vitaminas, lipídios e minerais presentes no soro de leite. A degradação do soro de leite por bactérias provoca a redução de oxigênio na água e no solo, uma vez que exibe uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) apresentando valores de 30-50 g L^{-1} e uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) da ordem de 60-80 g L^{-1}. A grande responsável pela alta DBO e DQO é a lactose. Por isso, é muito importante extrair ou recuperar as proteínas e a lactose, para reduzir o impacto ambiental e também obter produtos valiosos, como proteínas de soro de leite e a lactose, que pode ser utilizado em alimentos ou nutrição e formulações farmacêuticas (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001; PORTO, SANTOS e MIRANDA, 2005).

Embora ainda haja casos de descarte de soro em cursos d'água, a tendência é que cada vez mais as indústrias apliquem tecnologias que permitam o processamento de grandes volumes de soro em produtos que possam ser usados em uma grande variedade de alimentos e aplicações industriais. Nas últimas décadas foi percebido o potencial econômico da utilização do soro como fonte de produtos de valor agregado, pois contém metade dos sólidos do leite e alto valor nutritivo (TREMARIN, 2007).

Recentemente, a procura de soro de leite começou a aumentar devido aos benefícios que as proteínas de alta qualidade encontrada no mesmo, oferecem às crianças, adultos e idosos (KOSSEVA *et* al., 2009). Os produtos de soro apresentam a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais, além de ser uma fonte concentrada de nutrientes lácteos, sobretudo proteínas de elevado valor nutricional e cálcio (THAMER; PENNA, 2006).

Em relação aos aspectos nutricionais e fisiológicos, as proteínas do soro do leite podem ser usadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis; na forma de proteínas nativas ou pré-digeridas que contribui com o baixo valor calórico dos alimentos; e

na substituição de gordura, ou na formulação de alimentos e bebidas saudáveis (CAPITANI *et* al., 2005).

De acordo com Pacheco *et* al. (2005) as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação às caseínas. Diferenças fundamentais no metabolismo e na ação fisiológica das caseínas e das proteínas de soro de leite baseiam-se na propriedade das proteínas do soro não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica no plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (SGARBIERI, 2004).

Tem-se observado que, enquanto nos países desenvolvidos cerca de 95% do total do soro é utilizado na indústria de alimentos, no Brasil apenas 50% da produção é utilizada (CASTRO *et* al., 2009). A maior parte do soro pode ser utilizada diretamente sob a forma líquida, desde o uso como matéria-prima na elaboração de ricota e bebidas lácteas, até a utilização de tecnologias modernas para obtenção de produtos específicos e/ou novos produtos a serem formulados (ALMEIDA *et* al., 2004; PORTO, SANTOS E MIRANDA, 2005; TEIXEIRA e FONSECA, 2008).

Na alimentação humana o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó, sendo esta última a mais utilizada por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo para propósitos específicos (KOSSEVA *et* al., 2009).

O fracionamento do soro em lactose e proteínas permite a utilização dos constituintes de maior importância comercial presentes no soro de leite. A lactose tem várias propriedades funcionais úteis que tornam sua aplicação desejável em indústrias alimentícias e farmacêuticas (MATHUR *et* al., 1980; BALDASSO, 2008).

2.1.3 Permeado de soro de leite

O permeado de soro de leite pode ser obtido através da remoção de proteína do soro de leite, por membranas de ultrafiltração, seguido de concentração em evaporadores tubulares e posterior desidratação (www.evapodry.com). A solução diluída de lactose, minerais e nitrogênio não protéico que permeia a membrana é chamado permeado. Já a solução de proteínas e gorduras que não permeia é conhecida como retentado ou concentrado protéico. O

grau de concentração é limitado pelo aumento da viscosidade do retentado (PRAZERES *et* al., 2012).

O permeado pode ser utilizado em diversos produtos, tanto para alimentação humana quanto para alimentação animal, podendo ser usado em: produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, *snacks*, salgadinhos, sorvetes, suplemento alimentar, ração animal, fármacos, entre outros. Além disso, devido ao seu alto teor de lactose, o permeado de soro de leite tem sido utilizado como substrato para o crescimento de microorganismos probióticos (GOLOWCZYC *et* al., 2013 e LAVARI *et* al., 2014).

O descarte de permeado de soro, constituído basicamente de água, lactose e minerais, é um problema crítico para transformações biológicas, mesmo com baixos conteúdos de carbono e nitrogênio. Entretanto com o contínuo desenvolvimento de tecnologia e a crescente responsabilidade ambiental por parte das indústrias, a imagem do permeado de soro está mudando rapidamente de efluente para uma fonte valiosa de nutrientes, e proporcionando a possibilidade de desenvolvimento de produtos de valor agregado. A hidrólise da lactose presente no soro lácteo mostra-se como uma alternativa para produção de derivados lácteos com baixo teor de lactose, além da possibilidade de produção de GOS (VERA *et* al., 2012).

O permeado de soro de leite surge como um subproduto da fabricação de concentrado proteíco durante o processo de separação por membrana. Este subproduto agro-industrial é caracterizado pelo elevado teor de lactose (70-90%), a presença de minerais (6-20%), proteínas (0,5-3%) e níveis baixos de gorduras (<2%), além de significativas concentrações de macro e micro elementos, e algumas vitaminas do complexo B (HU e DICKSON, 2015). Estas características indicam diversas possibilidades para a utilização do permeado de soro de leite por indústrias, tais como a produção de bebidas, sopas, produtos de padaria e outros, ou a obtenção de lactitol e lactulose (PADILLA *et* al., 2015).

O tratamento adequado e eficaz de efluentes da indústria de lácteos é conhecido (CARVALHO *et* al., 2013), contudo a valorização dos resíduos de produtos lácteos têm ganhado atenção por seu conteúdo nutricional e funcional. Uma alternativa tem sido a utilização destes resíduos como fonte de carbono na produção de vários bioprodutos por fermentação principalmente devido ao elevado teor de lactose (ADAM *et* al., 2004).

Alguns exemplos para a valorização do permeado de soro de leite foram mostrados durante a produção de etanol (DINIZ *et* al., 2014; SANSONETTI *et* al., 2011; KOUSHKI *et* al., 2012; GUIMARAES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010), produção de hidrogênio (FERNANDEZ *et* al., 2014; ROSA *et* al., 2014; FRASCARI *et* al., 2013), produção de ácido

láctico (SCHEPERS *et* al., 2006; VASALA *et* al., 2005), produção de polihidroxialcanoatos (VALENTINO *et* al., 2015; POVOLO *et* al., 2010; KOLLER *et* al., 2008) e produção de ácidos orgânicos (QURESHI *et* al., 2014; RAGANATI *et* al., 2013).

2.2 LACTOSE

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical β-D-galactose e um radical α-D-glicose unidos por ligação glicosídica β-1,4. Seu nome químico é 4-O-β-D-galacto-piranosil-α-D-glucopiranose e pode ser identificado como 4-(β-D-galacto-sido)-D-glucose (Figura 2.1). A lactose é considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000).

A lactose (beta-galactosil-1,4-glicose) é um dissacarídeo (β-galactosídeo) composto por glicose e galactose. A única fonte natural desse carboidrato é o leite dos mamíferos que possuem placenta, e por isso a lactose é conhecida como açúcar de leite. A lactose tem como característica baixa solubilidade em água (15 a 20%) e baixo poder adoçante quando comparada a outros açúcares (ELNASHAR e YASSIN, 2009).

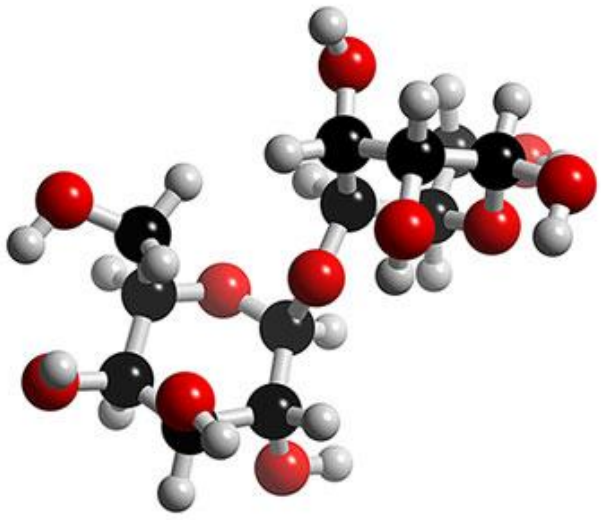


Figura 2.1 – Molécula de lactose (Fonte: www.3dchem.com).

Formado de galactose e glicose, a lactose no leite cru é responsável por 40% do total de sólidos, e nos leites desengordurados corresponde a 54% dos sólidos totais. No soro a

lactose é o composto sólido em maior quantidade em torno de 70% em base seca (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003).

A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas, α e β, diferindo somente nas posições relativas do hidrogênio e do grupo hidroxila no átomo de carbono anomérico, contudo a forma α é frequentemente mais usada em aplicações industriais.

Conforme Brito (2007), a lactose, em solução aquosa, consiste de 61,5% de anômero β e 38,5% de α. O equilíbrio entre ambas as formas é estabilizado por mutarrotação, ou seja, pode ocorrer uma mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da lactose, fazendo com que a forma α se transforme em β e vice-versa. Essa mudança na rotação e a transformação de uma forma na outra persiste até que haja o equilíbrio mutarrotacional. As formas β e α possuem características físicas distintas, como por exemplo, a solubilidade. A forma α possui "solubilidade verdadeira", a 15ºC, de 7 g/100g de água, enquanto que a forma β, sob as mesmas condições, apresenta solubilidade de 50g/100g de água (a solubilidade média da lactose, a 20ºC, é de 20g/100g de água). Por isso, o fenômeno da mutarrotação é muito importante no processo de cristalização (NICKERSON, 1974).

Segundo Kiska *et* al. (1973), o processo de cristalização da lactose é condicionado a vários fatores, como a velocidade de mutarrotação das formas α e β, o grau de saturação da solução, viscosidade, pH e a temperatura dos produtos lácteos. A formação de cristais de dimensões superiores a 10 micrômetros contribui para o aparecimento de uma estrutura arenosa nos produtos lácteos, causando sua depreciação.

A lactose em sistemas lácteos pode existir em várias formas, cristalinas e não cristalinas. A estabilidade de armazenamento e qualidade de certos alimentos são significativamente afetados pelo estado físico da lactose (CHANDRAPALA *et* al., 2016; OMAR e ROOS, 2007).

Muitas aplicações podem ser propostas para a utilização da lactose, principalmente devido às suas características físico-químicas em relação a outros açúcares. Na indústria de alimentos pode ser utilizada na preparação de condimentos, de produtos para confeitarias e padarias e para uso como xarope. A lactose pode ser ainda utilizada em grau farmacêutico, para isso a lactose em pó é concentrada e parcialmente acidificada, além de ser submetida a diversos tratamentos subsequentes (BRANDÃO, 1994).

É possível utilizar a lactose presente no soro de leite como substrato de fermentação a fim de se obter diversos produtos de aplicação industrial, já que constitui uma fonte de energia considerável para os microrganismos (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactose, um dos principais constituintes do soro de leite, pode ser transformada enzimaticamente a GOS, que são facilmente utilizados por bifidobactérias (microorganismos da microbiota intestinal, conhecidos pelos seus efeitos benéficos para a saúde humana, sendo chamadas de bactérias probióticas) contribuindo assim para um melhor funcionamento do trato digestivo (HA; ZEMEL, 2003). Os benefícios da ingestão de GOS são o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos e produção de ácidos graxos de cadeia curta (SANTOS, SIMIQUELI e PASTORE, 2009).

A remoção da lactose dos derivados lácteos (leite, soro de leite) tem sido extensamente estudada devido aos problemas nutricionais (intolerância à lactose) e aos interesses tecnológicos (solubilidade, poder adoçante e funcionalidade) envolvidos no desenvolvimento de produtos baseados na indústria de laticínios.

2.2.1 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose é uma doença muito comum devido à incapacidade para digerir a lactose em seus constituintes, a glicose e galactose, devido aos baixos níveis de lactase (NICHELE et al, 2011).

A intolerância à lactose é uma afecção da mucosa intestinal que a incapacita a digerir a lactose devido à deficiência de uma enzima denominada lactase (β-D-Galactosidase). Acredita-se que esta condição afeta mais de 75% da população mundial, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa e mais de 90% em alguns países da Ásia e da África. No Brasil 20 a 25% da população sofre de intolerância à lactose. Estudos mostram prevalências de 8% a 45% nas regiões sudeste e sul, com aumento significativo na região nordeste, 75% (SPARVOLI, 1989; PRETTO *et* al., 2002; FRYE, 2002; PEREIRA FILHO e FURLAN, 2004).

Existem três situações possíveis em relação à lactose, a saber, a intolerância, a alergia e a sensibilidade, que são constantemente confundidas, por isso, é de suma importância entender a clara diferença entre elas. A intolerância é uma reação adversa que envolve a digestão ou o metabolismo, causando inchaço, flatulência, dores abdominais, diarréia, porém não envolve o sistema imunitário. A alergia consiste numa resposta do sistema imunitário a componentes alimentares, geralmente proteínas; é quase que exclusivamente

limitada aos recém-nascidos. A sensibilidade evidencia-se como uma resposta anormal, por vezes com uma reação semelhante a da alergia (INSUMOS, 2010).

A lactase é produzida no intestino delgado e é responsável pela hidrólise da lactose em seus componentes (ORTOLANI *et* al., 2006). Os níveis de enzimas atingem o seu máximo, logo após o nascimento, mas declinam com envelhecimento: estima-se que 75% dos adultos no mundo mostram alguma diminuição da atividade da lactase durante a vida adulta (VESA *et* al., 2000). A deficiência de lactase pode resultar em má digestão de lactose, mas apenas na presença de sintomas clínicos, tais como inchaço e dor, flatulência, diarréia e náusea a intolerância à lactose ocorre (LOMER, PARKES E SANDERSON, 2008).

A deficiência de β-galactosidase é geralmente diagnosticada com base em história de sintomas gastrointestinais, que ocorrem após ingestão do leite, por teste para níveis anormais de hidrogênio na respiração (a fermentação da lactose digerida resulta na produção de hidrogênio), ou medição da atividade dissacaridásica da mucosa intestinal por intubação intestinal (LOMER, PARKES E SANDERSON, 2008).

Existem três classes de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos: deficiência congênita da enzima; diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais; deficiência primária ou ontogenética (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006):

- *Deficiência congênita de lactase:* é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos, logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. Existem apenas alguns casos levantados no mundo todo.
- *Diminuição enzimática secundária:* é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal ou após as cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso ocasiona uma deficiência temporária de lactase, sendo eliminada à medida que houver recuperação dessas células, mas pode levar à intolerância.
- *Deficiência primária ou ontogenética:* é o tipo mais comum na população, consiste em uma tendência natural do organismo em diminuir a produção de lactase com o avanço da idade.

O diagnóstico ou até mesmo sugestão de intolerância à lactose leva muitas pessoas a evitar o leite. O tratamento da intolerância à lactose inclui quatro princípios gerais: (i) redução

ou a restrição dietética da lactose, (ii) a substituição com fontes de nutrientes alternativos para evitar reduções na consumo de energia e proteína, (iii) a regulação da ingestão de cálcio e vitamina D e (iv) utilização de galactosidase exógena (MONTALTO *et* al., 2006; COENEN *et* al., 2000). Em particular, a ingestão de suplementos digestivos é um meio eficaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose; na verdade, um número de preparações de lactase é comercialmente disponível. Estes suplementos são formulados na forma de comprimido ou cápsula a ser administrado imediatamente antes ou juntamente com a refeição (GRAND e MONTGOMERY, 2008) na dosagem adequada que deve ser adaptada em função da gravidade dos sintomas.

Segundo During *et* al. (1998), mais de 50% da população mundial apresenta condição de deficiência de lactase, sendo esta uma das mais comuns desordens genéticas. No entanto, a lactose age como um promotor na absorção e na retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês (MANAN, KARIM e KIT, 1999). Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução da radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (KOCIÁN, 1988). A redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína e riboflavina, além do cálcio. Portanto é recomendada a adição de cálcio nos produtos lácteos sem lactose ou com quantidade de lactose reduzida porque a absorção desse mineral no intestino é baixa quando não se tem a presença de lactose (KOCIÁN, 1988).

Um estudo realizado com chineses, tidos como intolerantes à lactose, mostrou que uma introdução gradual de leite pode ser aceitável e o leite é melhor tolerado quando consumido junto a uma refeição. Mesmo os intolerantes à lactose podem tolerar uma porção de leite em uma refeição sem apresentarem desconfortos gastrintestinais (TORRES, 2004).

Aproximadamente 70% dos descendentes de africanos, 95% dos asiáticos e 53% dos hispânicos são intolerantes à lactose, comparados com apenas 10% a 15% dos americanos brancos e descendentes de norte-europeus (SHAH FEDORAK e JELEN, 1992; TORRES, 2004). Estudo sobre auto-avaliação à intolerância à lactose envolvendo aproximadamente 3.500 pessoas entre 19 e 70 anos de idade, provenientes de 03 grupos étnicos-raciais, (brancos, africanos americanos e hispano-americanos) apontam que 12,3% dos entrevistados se auto-avaliam intolerantes à lactose (NICKLAS *et* al., 2011).

A hidrólise da lactose é uma das principais tecnologias aplicadas para a produção de produtos lácteos com baixo teor de lactose, embora exitam outras técnicas para remoção da lactose do leite. O método preferencialmente utilizado hoje é a hidrólise enzimática pela

adição de β- galactosidase. A lactose pode ser hidrolisada antes do tratamento térmico, ou após, se a enzima for adicionada antes do envase do produto. Ao ser adicionada ao leite, a enzima β- galactosidase efetua a quebra da molécula de lactose tal como a lactase intestinal, o que dá àqueles que possuem a deficiência desta enzima a possibilidade de usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, como a proteína, o cálcio e a vitamina A, evitando os inconvenientes e desconfortos causados pela má absorção da lactose (TANRISEVEN e DOGAN, 2002).

2.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise de lactose possibilita o desenvolvimento de novos produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato, além de oferecer diversas vantagens tecnológicas, tais como, a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos e o aumento do poder adoçante, vantagens estas que apontam que a hidrólise de lactose é um processo industrial promissor (OBÓN *et* al., 2000; FISCHER, 2010).

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Contudo, dependendo das condições, esta mistura não é alcançada na prática, pois a galactose pode polimerizar-se ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos conforme mecanismo apresentado na Figura 2.2 (GÉKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1998).

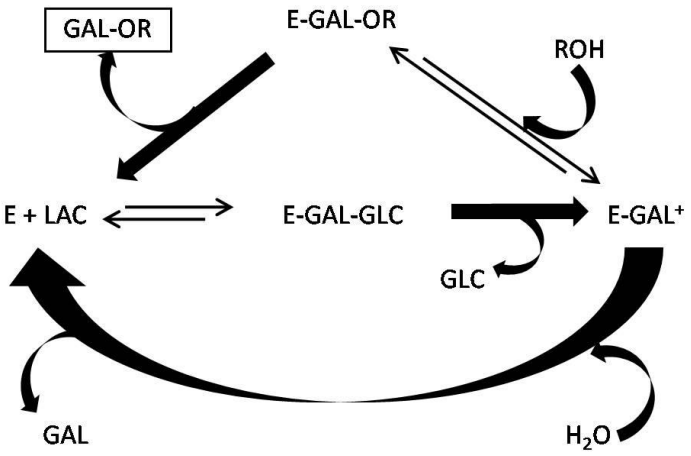


Figura 2.2 – Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos (GAL: Galactose, E: Enzima, LAC: Lactose, GLC: Glicose, ROH: Radical hidroxila) (MAHONEY, 1998).

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático (Figura 2.3):

Método ácido: A reação é muito rápida, mas envolve soluções diluídas de ácido fortes, como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH (1,0-2,0) e temperatura (100-150 ºC), e por isto tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, além de causar desnaturação das proteínas do leite.

A hidrólise ácida em fase homogênea (uma fase) utiliza íons de hidrogênio em solução para catalisar a hidrólise da lactose durante tratamento térmico. Já o processo heterogêneo (duas fases) utiliza uma resina de troca catiônica, onde os íons de hidrogênio estão ligados. O processo heterogêneo é o mais utilizado, devido à possibilidade de regeneração da resina de troca catiônica (CARMINATTI, 2001).

Método enzimático: pode ser aplicado no leite ou no soro sem um tratamento prévio. A hidrólise é catalisada pela β-galactosidase e se processa em condições amenas de pH (3,5 a 8,0) e temperatura (30 a 40 ºC), o que reduz não só a possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, mas também as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis. Os produtos obtidos por este processo preservam as suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

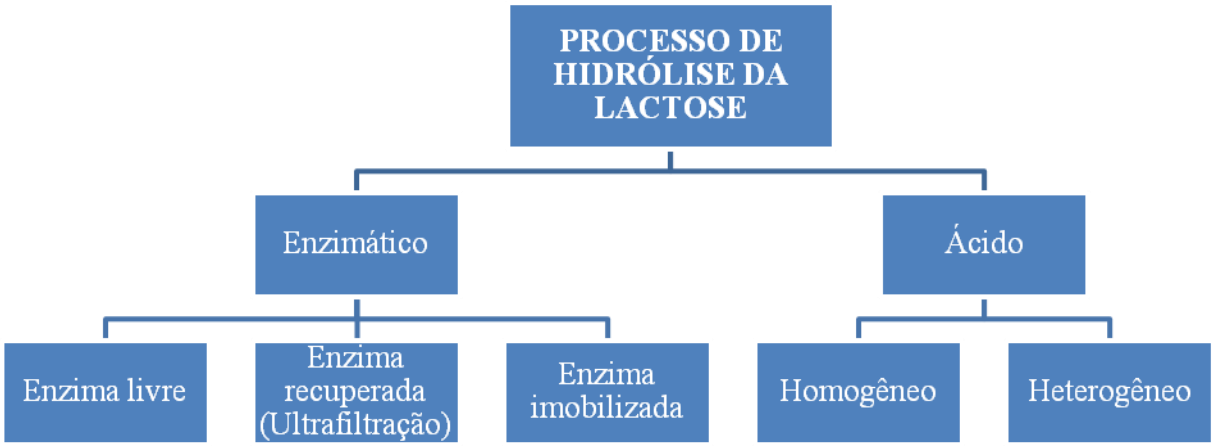


Figura 2.3 – Processos de hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984)

A hidrólise da lactose em leite resulta na economia de sacarose durante a preparação de produtos açucarados, pois diversos produtos fabricados a partir de leite com baixo teor de lactose requerem pouca ou nenhuma adição de sacarose, visto que a doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% da doçura da sacarose. O soro de leite hidrolisado é adequado para adoçar produtos lácteos, tais como iogurtes de frutas, sorvetes e bebidas à base de soro. Os xaropes são utilizados em produtos alimentícios processados, como doces e produtos de panificação. Uma das razões para usar a lactose hidrolisada, além de aumentar a doçura e a solubilidade, é a formação de cores e substâncias aromáticas devido à reação de Maillard (INSUMOS, 2010).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais eficientes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Nele a enzima β-galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação β (1-4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose.

Inúmeros trabalhos sobre hidrólise de lactose têm sido apresentados na literatura.

Guidini *et* al. (2011) estudaram a cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A 568. O modelo cinético que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o modelo de Michaelis-Menten com inibicação competitiva pela galactose.

Ansari e Husain (2012) estudaram a hidrolise de lactose do leite/soro em processos contínuo e batelada utilizando β-galactosidade de *Aspergillus oryzae* imobilizada em A-Celite 545. A conversão da lactose em reator contínuo utilizando β-galactosidase reticulada foi de 92% e 81% nas vazões de 20 mL/h e 30 mL/h após um mês de operação, respectivamente.

Fischer *et* al. (2013) realizaram a otimização e modelagem da hidrólise da lactose em um sistema de leito fixo usando β-galactosidase de *A. oryzae* imobilizada e alcançaram uma conversão total de 82 % para os dois reatores em série.

Zhou *et* al. (2013) utilizaram a enzima β-galactosidase produzida por um mutante de *K. marxianus* para hidrolise de lactose. Este autores obtiveram uma conversão de 99,3 % da lactose presente no leite pela enzima bruta após 3 h.

Vieira *et* al. (2013) avaliaram a hidrólise de lactose do leite catalisada pela enzima β-galactosidase de *K. fragilis* imobilizada em uma matriz a base de quitosana. O biocatalisador imobilizado foi capaz de hidrolisar a lactose eficientemente em todo o leite a 25 ºC (conversão acima de 95%), mostrando desempenho semelhante após quatro bateladas consecutivas.

Vasileva *et* al. (2016) estudaram a hidrólise da lactose de soro de leite utilizando β-galactosidase de *Escherichia coli* imobilizada em um biorreactor com uma membrana enrolada em espiral e obtiveram para 250 mL de soro de leite contendo 4,7% de lactose a completa hidrólise em 10 horas.

2.4 A ENZIMA β-GALACTOSIDASE

A enzima β-galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático β-D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β-D-galactose e α-D-glicose (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; LONGO, 2006). Esta enzima está amplamente distribuída na natureza, e muitos estudos foram relatados sobre a produção da mesma a partir de diferentes fontes, incluindo plantas, animais e vários microrganismos tais como bactérias, leveduras, fungos e arqueobactérias (KISHORE e KAYASTHA, 2012).

As possíveis fontes de lactases microbianas mais conhecidas, segundo GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985, são:

Leveduras: *Saccharomyces sp., K. lactis*, *K. marxianus*, *Candida pseudotropicalis*, *Brettanomyces anomalis* e *Wingea roberstsii*.

Fungos: *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. phoenus*, *Mucor pocillus*, *M. miehei*, *Scopuloriopsis*, *Alternaria palmi*, *Curvalaria anaegualis*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria alternara*.

Bactérias: *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Thermus aquaticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *Bacillus sp*. e *L. sporogenes*.

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para a utilização na indústria de alimentos, visto que a depender da fonte de obtenção, a enzima pode apresentar problemas de toxicidade, associados aos extratos brutos de coliformes (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). A legislação brasileira especifica, por meio da Resolução RDC n° 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *A. niger, A. oryzae, C. pseudotropicalis, K. lactis, K. fragilis, K. marxianus, Saccharomyces sp* (BRASIL, 2002). Tais espécies são classificadas

como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias (KLEIN, 2010).

As propriedades das diferentes β-galactosidases dependem de sua origem. Em geral, lactases fúngicas possuem pH ótimo de atuação na faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Estas diferentes condições de pH ótimo permitem selecionar a lactase mais apropriada para uma aplicação específica. Assim, lactases provenientes de leveduras e bactérias são as mais apropriadas para hidrólise da lactose presente no permeado lácteo (GÉKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; VAN DE VOORDE *et* al., 2014).

As lactases apresentam diferenças marcantes em várias de suas propriedades, tanto químicas como cinéticas como resultado das diferentes fontes. Como exemplo das diferenças das enzimas de diferentes microrganismos, pode-se citar as lactases produzidas pela bactéria *E. coli*, cuja massa molecular varia entre 520.000 a 850.000 Daltons, quando comparado aos 201.000 e 90.000 Daltons da *K. marxianus* e *A. oryzae*, respectivamente (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

As propriedades das β-galactosidases dependem de diversos fatores e variam de acordo com a fonte de obtenção da mesma. A Tabela 2.3 apresenta um quadro comparativo das diferentes propriedades de algumas β-galactosidases microbianas.

Tabela 2.3 – Propriedades de algumas lactases microbianas

	Fonte	**Massa molecular (KDa)**	**pH ótimo**	**pH estabilidade**	**Temperatura ótima (°C)**	**Íons Ativadores**
Fungos	*A. niger*	117	3,5-4,5	2,5-8	55-60	Nenhum
	A. oryzae	90	5,0	3,5-8	50-55	Nenhum
Leveduras	*K. fragilis*	201	6,6	6,5-7,5	37	Mn^{+2}, K^{+}
	K. lactis	200	6,9-7,3	7-7,75	35-40	K^{+}, Mg^{+2}

Fonte: SHUKLA, 1975; VAN DE VOORDE *et* al., 2014

Apesar das diversas fontes de β-galactosidases serem extensivamente empregadas em diversas tecnologias, há ainda uma grande procura por enzimas com propriedades superiores, tais como melhor estabilidade térmica a pH neutro, ou boa atividade a baixas temperaturas.

Algumas fontes originadas de microrganismos termófilos são muito estudadas devido à termoestabilidade da enzima obtida. Enzimas termoestáveis, capazes de permanecer com sua atividade a temperaturas maiores ou iguais a 60°C por prolongados períodos, apresentam maiores conversões, ou menores tempos de residência para uma dada taxa de conversão, além de serem menos susceptíveis à contaminação microbiológica mostrando-se como uma alternativa promissora (HARJU *et* al., 2012).

As β-galactosidases provenientes de leveduras, *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, são intracelulares, induzidas por lactose e galactose e produzidas na sua maioria por fermentação em cultura submersa. Com o pH ótimo concentrado na região neutra, elas são bem adaptadas para hidrólise da lactose do leite. Entretanto, ambas as enzimas são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio no leite e pequenas concentrações de sódio. São também inibidas pela galactose (competitivamente) e glicose (não-competitiva) (REED & NAGODAWITHANA, 1993; NUNES *et* al., 1993; LADERO *et* al., 2000).

Na Tabela 2.4 são apresentados as principais β-galactosidases disponíveis no mercado em 1995, seus nomes comerciais, a fonte de extração, o pH e temperatura ótima para sua utilização e a atividade enzimática de cada enzima.

A produção de β-galactosidase é distinta para diferentes cepas e é regulada pela natureza nutricional, fisiológica e bioquímica das espécies microbianas utilizadas (XIA *et* al., 2010, LIU *et* al., 2011; YU e O'SULLIVAN, 2014). Vários fatores ambientais e de fermentação, tais como temperatura de crescimento, pH, tempo, agitação, aeração, quantidade de inóculo, fontes de carbono e de nitrogênio, íons metálicos afetam diretamente o rendimento de produção de β-galactosidase (PRAKASAM *et* al., 2005, PRAKASAM *et* al. , 2007 e RAO *et* al., 2008). Portanto, a otimização dos constituintes do meio é uma importante etapa para aumentar a produção da enzima e também é uma ferramenta para a redução das quantidades de componentes desnecessários em meios, a fim de alcançar um elevado rendimento de produção de baixo custo (KAMRAN *et* al., 2016).

Tabela 2.4 - Principais β-galactosidases comerciais e suas propriedades (PIVARNIK *et* al., 1995).

Lactase (nomes comerciais)	Fonte	Substrato	pH ótimo	Temp.	Unidades de atividade*
Enzeco fungal lactase	*A. oryzae*	lactose	4,5-5,0	55	100.000 FCC/g
Enzeco immobilized lactase	*A. oryzae*	-	4,5-5,0	50	2.000 ILU/g
Yeast lactase L 50.000	*K. lactis*	Lactose	6,0	45	50.000 ONPG units/g
Funga lactase L 100.000	*A. oryzae*	Lactose	4,5-5,0	50-55	100.000 FCC/g
Lactozyme 3000 L	*K. marxianus*	Lactose	6,5	37	3.000 LAU/ml
Lactase F	*A. oryzae*	Lactose	4,5	55	14.000 FCC/g
Neutral lactase	*K.. lactis*	Lactose	6,0	45	8.000 ONPG units/g
Biolactase	*A. oryzae*	-	4,5-5,0	55-60	30.000 FCC/g
Maxilact L2000	*K.. lactis*	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	2.000 NLU/g
Maxilact LX5000	*K.. lactis*	Soro em pó	6,3-6,7	35-40	5.000 NLU/g
Neutral lactase	*K.. lactis*	-	6,5	37	3.100 ONPG units/g

* FCC, Federal Chemistry Codex Lactase Untis; ILU, Internacioanl Lactase Units; NLU, Neutral Lactase Units; LAU, Lactase Activity Units

A enzima β-galactosidase pode ser utilizada na forma de enzima solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada e na forma imobilizada, que opera tanto em batelada quanto em operação contínua. Devido ao alto custo da enzima, o uso de β-galactosidase imobilizada continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente por oferecerem a possibilidade de reutilização da enzima, além de conferir uma maior estabilidade (SZCZODRAK, 2000). Atualmente β-galactosidase imobilizada tem sido extensivamente utilizada para hidrólise de lactose presente no leite/soro e tem sido testada a sua aplicação para produção de galacto-oligossacarídeos (GOS) (PANESAR *et* al., 2010).

2.4.1 Extração e purificação de β-galactosidase

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a enzima. Enzimas para fins terapêuticos ou para uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (GÜNERKEN *et* al., 2015).

A enzima β-galactosidase produzida pela levedura *K. marxianus*, é reconhecida como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos (CABALLERO *et* al., 1995). No entanto a produção da enzima ocorre intracelularmente e, assim como qualquer outro produto intracelular, requer uma etapa de ruptura das células para sua liberação, etapa esta crucial nos processos de *downstream*, pois qualquer dano causado ao produto nesta fase inicial, pode comprometer ou invalidar todos os processos subsequentes.

Uma variedade de métodos de ruptura de células está disponível atualmente. Em geral, estas técnicas são divididas em dois grupos principais com base no mecanismo de funcionamento utilizado, como pode ser visto na Figura 2.4 (GÜNERKEN *et* al., 2015).

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos microrganismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse (PANDIT *et* al., 2005; PINHEIRO *et* al., 2003).

Durante a extração de enzimas utilizando o método químico, ocorre a permeabilização da parede celular de células viáveis de leveduras. O método mais comum de autólise celular para β-galactosidase de leveduras é o tratamento de uma suspensão de células com agentes químicos capazes de desorganizar a membrana plasmática, como solventes orgânicos, surfactantes, policátions, proteínas básicas, ou soluções com alto poder iônico (FLORES *et* al., 1994).

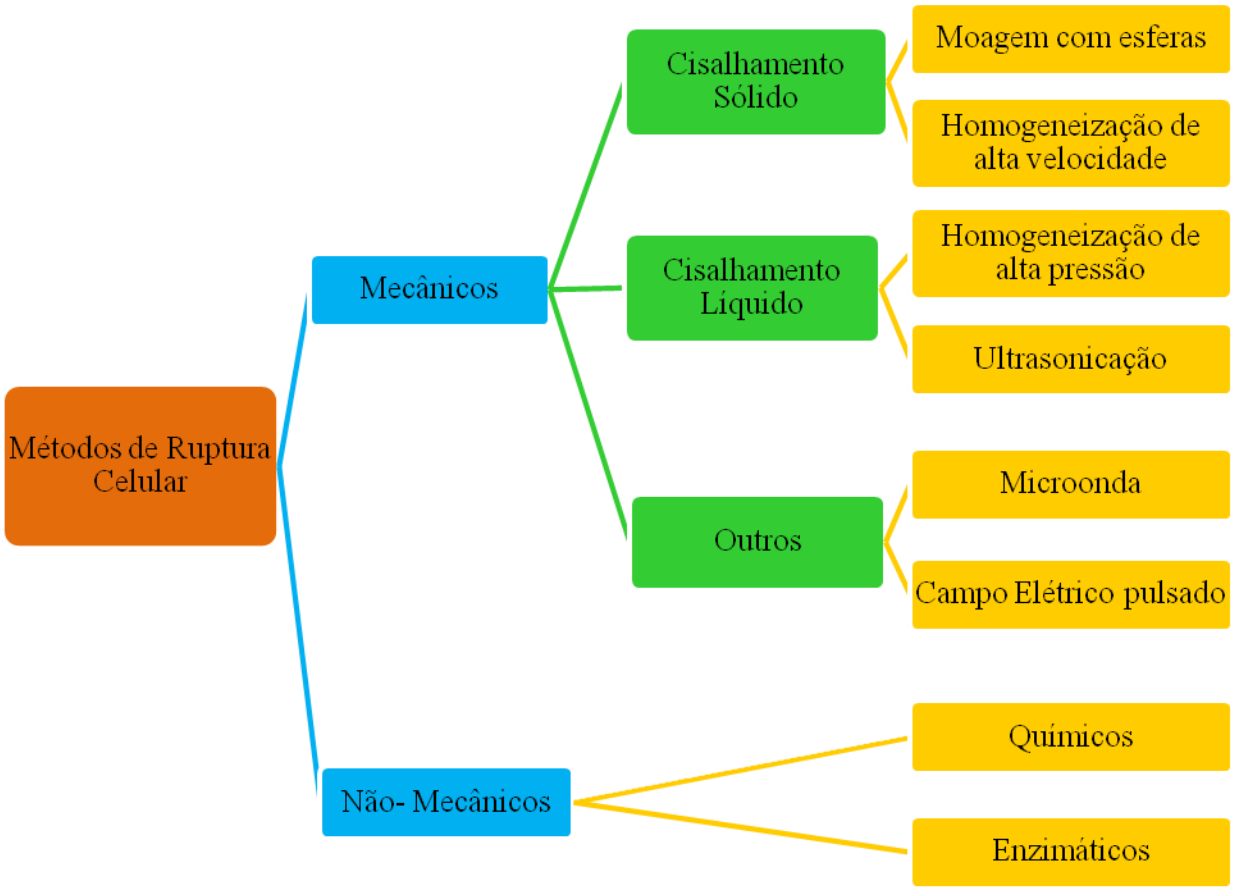


Figura 2.4 – Classificação de métodos de ruptura celular (GÜNERKEN *et* al., 2015)

Os métodos físicos são empregados para a ruptura da parede celular de leveduras. Estes métodos não são indicados quando se deseja um processo seletivo, pois uma vez rompida a parede celular, todo seu conteúdo é extravasado, o que pode provocar a degradação do composto de interesse pela ação das próprias enzimas contidas no meio (SALAZAR e ANSEJO, 2007).

O rompimento manual com pérolas de vidro é um método mecânico que não necessita de grande aparato experimental. Utiliza basicamente pérolas de vidro e o procedimento consta da adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente 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).

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 formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e consequente transferência de calor

para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e criação de uma força capaz de romper as células e liberar a enzima (BOSSIO *et* al., 2008).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, porém são encontradas muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. Além disso, as etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada e os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas (RABELO, 2005).

A escolha das técnicas à serem empregadas no processo de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Nas primeiras etapas quase sempre é desejável reduzir o volume, e para isto é frequentemente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Posteriormente são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas (cromatografia de troca iônica) pela sua relativa alta capacidade. Para as etapas finais o objetivo quase sempre é um aumento de resolução, e para isto utilizam-se técnicas como cromatografia em gel e cromatografia de afinidade. Uma estratégia geral é desaconselhável, uma vez que os materiais disponíveis e as necessidades para cada caso sejam diferentes.

Frequentemente são necessários vários testes do tipo tentativa e erro para se estabelecer as condições ideais e o método mais efetivo para o rendimento e o número de vezes de purificação almejados. Análise via eletroforese em gel (SDS-PAGE) pode indicar a pureza e o número de contaminantes presentes; além disso, a massa molecular da amostra e dos contaminantes pode ser determinado, e assim, auxiliar na escolha ou não de uma cromatografia em gel para a separação dos contaminantes (HARRIS, 2001).

É importante ressaltar que geralmente é necessária uma concentração ao final ou entre etapas de purificação. Isso porque um volume menor de solução é mais fácil de manusear em etapas subsequentes, tais como precipitação ou cromatografias que exigem volumes pequenos, como cromatografia em gel; além disso, concentrações protéicas mais altas minimizam perdas por adsorção não específica em recipientes e matrizes. A concentração pode ser obtida por remoção de água das seguintes maneiras: adição de um polímero, remoção de água (liofilização) e por remoção do solvente através de uma

membrana semi-permeável que não permite a passagem da enzima de interesse (ultrafiltração). Nesse processo, água e pequenas moléculas são direcionadas através de uma membrana por uma força que pode ser exercida por centrifugação ou pressão (LIMA, 2001).

Além das técnicas disponíveis, a imobilização de enzimas pode ser uma alternativa para purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios da afinidade da enzima com o suporte. Palomo *et* al. (2004) desenvolveram uma simples e eficiente ferramenta de purificação de lipases que consistiu da imobilização de uma lipase comercial (*Pseudomonas fluorecens*) a um suporte (glioxilagarose) de forma que o sítio ativo da enzima ficasse exposto ao meio, permitindo a adsorção de outras moléculas de lipase via um mecanismo similar ao da agregação apresentado por estas enzimas. Os autores conseguiram adsorver seletivamente lipases presentes nos extratos de *Bacillus thermocatenulatus* (BTLS), *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae* e *Thermomices lanuginosa*.

A união da imobilização e purificação de enzimas e de proteínas tem interesse incontestável. O interesse vai mais longe se o biocatalisador final tem uma estabilidade melhorada através de ligações covalentes multipontuais. A melhor compreensão do mecanismo de imobilização em diferentes suportes pode abrir novas estratégias para alcançar esse objetivo de unir imobilização e purificação (BARBOSA *et* al., 2015).

Ainda que o número de publicações relacionadas ao tema seja bastante grande, tendo em vista a importância do assunto, algumas lacunas ainda persistem e estudos que visem imobilizar a β-galactosidase em suportes de baixo custo, gerando biocatalisadores estáveis, fáceis de usar, biocompatíveis e seguros para utilização em indústrias de alimentos, são de fundamental importância, tanto para a produção de produtos lácteos de baixo teor de lactose, como para aplicação na síntese de GOS.

2.5 A LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus é descrita como uma levedura ascomiceta, homotálica, filogeneticamente relacionada à *S. cerevisiae* e *K. lactis* (LORENTE et al., 2000). A principal característica comum das leveduras *K. marxianus* e *K. lactis* é a capacidade de assimilar lactose e utilizar este açúcar como fonte de carbono. Esta característica, que está ausente em *S. cerevisiae*, conduz ao isolamento destas leveduras a partir de fontes lácteas, por exemplo, leites fermentados, iogurtes e queijos (LANE e MORRISSEY, 2010).

A levedura *K. marxianus* possui o *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e esta designação significa que há poucas restrições à aplicação e aumenta muito a seu potencial no setor de biotecnologia. Esta levedura tem grande importância industrial, principalmente porque possui características particulares que são desejáveis para aplicações biotecnológicas. Estas características incluem a capacidade de metabolizar glicose, inulina e lactose; ser capaz de produzir etanol (SILVEIRA, 2004; GUIMARAES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010; YANASE et al., 2010); também pode produzir as enzimas β-galactosidase, intracelularmente, (GONÇALVES e CASTILLO, 1982; RECH e AYUB, 2007; LEMOS et al., 2011 a,b; MANERA et al., 2011); inulinase, intra e extracelularmente (RICHETTI et al, 2011; COGHETTO et al., 2011) e endopoligalacturonase (JIA e WHEALS, 2000); tem grande capacidade de converter substratos em biomassa e tem rápida taxa de crescimento celular (FONSECA et al., 2007) além de ser termotolerante, possuindo a capacidade de crescimento até 52 °C (LANE e MORRISSEY, 2010).

Comparada à *K. lactis*, organismo modelo em estudos do metabolismo de lactose em leveduras, *K. marxianus* apresenta maior capacidade para fermentar a lactose. A razão para esta maior capacidade fermentativa ainda não foi totalmente elucidada. Este maior potencial fermentativo seria devido ao maior fluxo no transporte e metabolismo da lactose quando comparado à *K. lactis*. Esta eficiência seria resultado tanto de maior expressão gênica quanto de maior atividade enzimática de proteínas essenciais à fermentação da lactose (BELO, 2013).

DINIZ et al., (2012) demonstraram que em ambientes com restrição de oxigênio os genes e as enzimas do metabolismo da lactose seriam diferentemente expressos ou ativos em *K. lactis* e *K. marxianus* proporcionando a maior produção de etanol desta última.

Embora *K. marxianus* seja classificada como Crabtree-negativa, alguns autores a consideram como sendo respiro-fermentativa, pois quando cultivada em altas concentrações de açúcar, os rendimentos de produção de etanol são próximos ao teórico (LANE e MORRISEY, 2010).

O grande interesse na levedura *K. marxianus* é conduzido, sem dúvida, por aplicações na indústria de biotecnologia. Isto reflete na literatura científica, onde existem mais trabalhos relacionados com aplicações biotecnológicas do que com o metabolismo, biologia molecular ou outros aspectos fundamentais desta levedura. O potencial industrial desta levedura pode ser visualizado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Visão geral de aplicações industriais e biotecnológicas de *K. marxianus* para diferentes cepas.

Aplicação	Cepas especificadas	Referência
A produção de etanol a partir de soro de leite ou lactose	*K. marxianus* NBRC 1963	ODA e NAKAMURA (2009)
	K. marxianus DSMZ-7239	OZMIHCI e KARGI (2007)
Células imobilizadas e suspensas	*K. marxianus* MTCC 1288	ZAFAR e OWAIS (2006)
Fermentações contínuas e descontínuas	-	KOURKOUTAS *et* al. (2002)
	K. marxianus IMB3	BRADY *et* al. (1997)
Produção de biomassa ou proteína unicelular	*K. marxianus* ZIM 1867	PAS *et* al. (2007)
	K. marxianus CBS 6556	SCHULTZ *et* al. (2006)
Fermentação Contínua, em batelada e em batelada alimentada	*K. fragilis* NRS 5790	GHALY *et* al. (2005)
	K. marxianus FII 510700	LUKONDEH *et* al. (2005)
Biomassa rica em ferro e nucleótidos	*K. marxianus* CBS 6556	REVILLION *et* al. (2003)
Composição autolisado comparável a *S. cerevisiae*	*K. marxianus* ATCC10022; CBS 7894	PINHEIRO *et* al. (1998)
Produção de enzimas endógenas	-	RAJOKA (2007)
β-xilosidase	*K. marxianus* CBS 7894	PINHEIRO *et* al. (2003)
β- galactosidase	*K. marxianus* IpF1	SZCZODRAK (2000)
β-glucosidase	*K. marxianus* CDBB-L278	CRUZGUERRERO *et* al. (1995)
Inulinase	*K. marxianus* NBRC 0219; NBRC 0541; NBRC 0617; NBRC 1777	HONG *et* al. (2007)
A expressão heteróloga de enzimas	*K. marxianus* KM1	PECOTA *et* al. (2007)
Celulases termoestáveis	*K. marxianus* BKM Y-719	SIEKSTELE *et* al. (1999)
Lactato desidrogenase	*K. marxianus* CBS 6556	BERGKAMP *et* al. (1993a,b)
Endopoligalacturonase	-	VASALLO *et* al. (2006)
α-galactosidase	-	LUKONDEH *et* al. (2003)
Indústria alimentícia	*K. marxianus* ATCC10024	MEDEIROS *et* al. (2000)
Emulsionante natural - manoproteína	*K. marxianus* NRRL-Y-2415	CABALLERO *et* al. (1995)
Compostos arômicos	*K. marxianus* Y01070	KADAR *et* al. (2004)
Fermento	*K. marxianus* NRRL Y-610	HANG *et* al. (2003)
Aplicações ambientais	*K. marxianus* IMB3	MEEHAN *et* al. (2000)
O tratamento de resíduos de papel e lamas		
Remoção de lactose e outros açúcares de águas residuais		
Biossorção de corantes	-	PAL *et* al. (2009)
Recuperação de metais pesados a partir de águas residuais		

Fonte: LANE e MORRISSEY, 2010

Comercialmente, a aplicação mais importante da levedura *K. marxianus* na atualidade é a produção de enzimas nativas, tais como inulinases, β-galactosidases e pectinases. Os desenvolvimentos futuros certamente vão incluir a obtenção de cepas recombinantes capazes de maximixar a produção enzimática (HONG et al., 2007).

2.6 PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O mundo está enfrentando atualmente o dilema do alto preço-petróleo bruto e ao mesmo tempo o consumo de energia continua a aumentar devido ao aumento da população mundial e rápido crescimento econômico liderado pela industrialização (KATINONKUL *et* al., 2012). Além disso, a emissão de gases de efeito estufa, devido ao consumo de combustíveis fósseis tem causado mudanças climáticas. Considerando essas questões, é notável a necessidade de mudança para fontes renováveis de energia.

A produção de bioetanol a partir de biomassa ganhou considerável interesse como fonte renovável de combustível para transporte (NIGAM e SINGH, 2011). Atualmente, as principais matérias-primas utilizadas na produção de etanol no mundo são a cana-de-açúcar, o milho, a aveia, o arroz, a cevada, o trigo e o sorgo (SANTOS, 2014).

Contudo o etanol pode ser obtido a partir de qualquer biomassa que contenha quantidade significativa de amido ou açúcares. A busca por fontes alternativas para a produção de bioetanol, principalmente as provenientes de resíduos agroindustriais são constantes no Brasil e no mundo (BNDES e CGEE, 2008). O aproveitamento destes resíduos, em particular o soro do leite, pela abundância de produção, características nutricionais e elevada capacidade poluente, tem sido, há tempo, motivo de vários estudos (SILVA e HERMAN-GOMEZ, 2000; VALDUGA *et al.*, 2006; MADRONA *et al.*, 2009; GABARDO, RECH e AYUB, 2011).

Há pesquisa sobre novas estratégias para a geração de energia, particularmente com respeito a fontes alternativas renováveis, como cultura agrícola, biomassa lignocelulósica e resíduos (YU *et* al., 2010; SANSONETTI *et* al., 2011; CHENG e TIMILSINA, 2011;). A alta produtividade de etanol a partir de matérias-primas de baixo custo, além de reduzir o investimento e custos operacionais, são aspectos de interesse neste tipo de bioprocessos. (MADRONA *et* al., 2009; GABARDO, RECH e AYUB, 2011).

Em virtude do seu alto valor nutricional o permeado de soro de queijo se torna um substrato atraente para sua utilização em processos fermentativos para obtenção de vários

produtos, como ácido láctico, butanol e etanol, entre outros. Alguns processos que utilizam o permeado do soro como substrato para fermentação alcoólica já se encontram implementados, nomeadamente na *New Zealand Cooperative Dairy Co.* na Nova Zelândia, na *Barbery Milk Products Lda.*, na Irlanda e em Wisconsin, nos E.U.A (DOMINGUES, LIMA e TEIXEIRA, 1999). Segundo Alegre (1988) o aproveitamento do soro para produção de etanol vem sendo estudado desde a década de 40, tendo início em 1941, com o cientista Browne.

Alguns problemas são encontrados quando se utiliza o soro como substrato para a fermentação alcoólica como, por exemplo, o número limitado de microrganismos capazes de metabolizar diretamente a lactose com produção de etanol (FLORENTINO, 2006). Atualmente a levedura *K. marxianus* é a mais utilizada na fermentação direta. Uma alternativa para a fermentação indireta consiste na hidrólise da lactose pela enzima lactase, produzindo açúcares mais facilmente fermentáveis e conseqüentemente a fermentação dos monossacarídeos pela levedura *S. cerevisiae* (ANDRADE, 2005).

Fermentação direta do soro e permeado de soro não é economicamente viável devido à baixa concentração de etanol e de elevados custos de destilação do caldo de fermentação diluído. No entanto, a desidratação do soro ou permeado de soro de leite o torna uma matéria-prima atraente para fermentação alcoólica por causa das vantagens da sua utilização, tal como as altas concentrações de lactose e de outros nutrientes, produzindo altas concentrações de etanol (DRAGONE *et* al., 2011).

Recentemente estudos sobre a produção de etanol utilizando soro ou o permeado de soro como fonte de carbono foram relatados (OZMIHCI e KARGI, 2009; CHRISTENSEN *et* al., 2011; GABARDO, RECH e AYUB 2012; GABARDO *et* al., 2014). Apesar da escassez de leveduras que mostra a capacidade de metabolizar a lactose presente no soro do leite e no permeado de soro, estirpes pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* foram bem caracterizadas nas suas capacidades de utilizar lactose como uma fonte de energia. A levedura *K. marxianus* vem sendo estudada mostrando alto potencial de bioconversão deste açúcar em etanol (RUBIO-TEIXEIRA, 2006; FONSECA *et* al., 2008; GUIMARAES, TEIXEIRA e DOMINGUES 2010).

CAPÍTULO 3
MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal. As etapas do trabalho estão ilustradas no fluxograma apresentado na Figura 3.1.

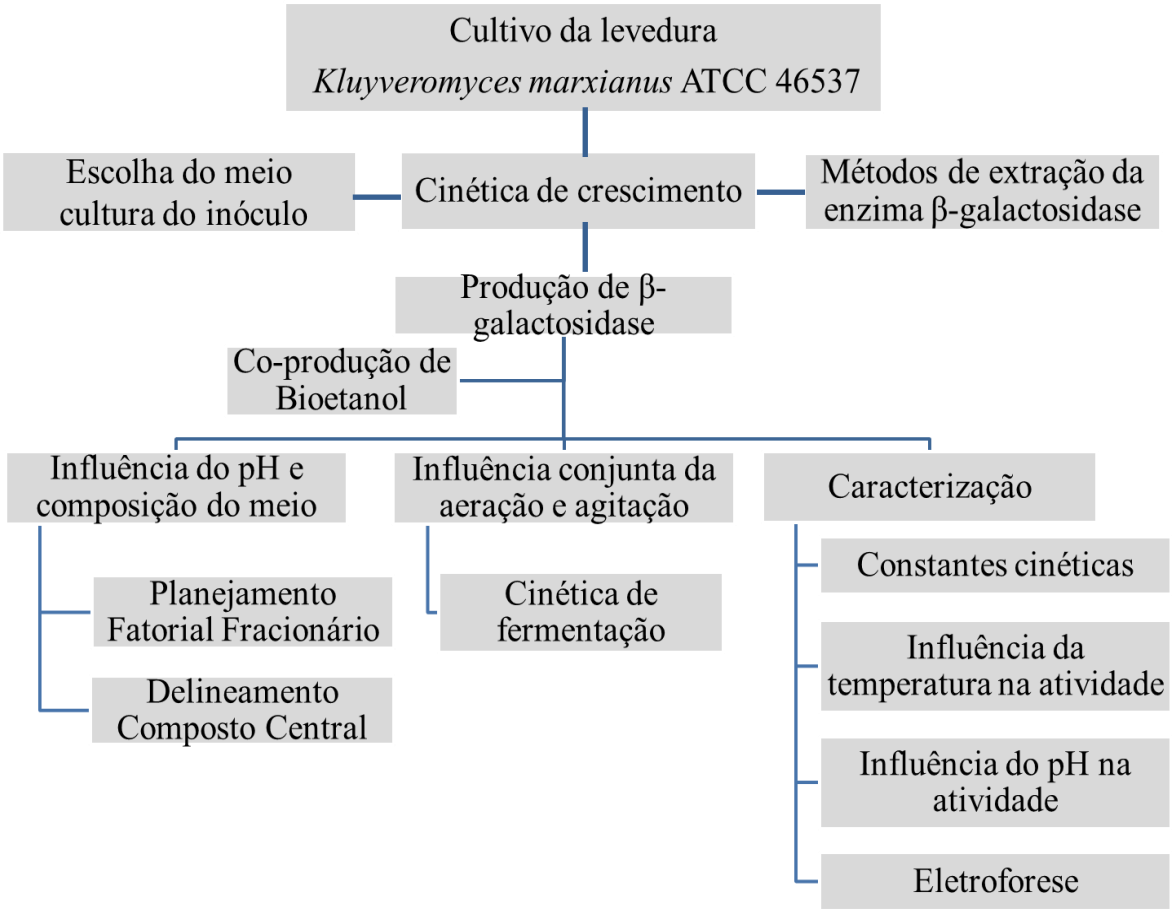


Figura 3.1 – Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental

3.1 MATERIAL

3.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a obtenção de β-galactosidase foi a levedura *K. marxianus* ATCC 46537, proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada (*slants* em duplicata). O certificado de análise pode ser visto no Anexo A.

3.1.2 Manutenção da cultura

A cultura foi mantida a 4°C em meio YMA (Yeast-Malt Extract Agar) conforme metodologia recomendada pela Fundação André Tosello. A composição do meio de manutenção (YMA) pode ser visto na Tabela 3.1. A cultura foi repicada mensalmente.

Tabela 3.1 – Composição do meio de manutenção YMA

Componentes	**Concentração (g L^{-1})**
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Agar	20,0

3.1.3 Substrato

O substrato utilizado no presente trabalho como principal fonte de carbono na formulação dos meios de cultura para crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foi o permeado de soro de leite, produto comercializado na forma de pó, adquirido da empresa SOORO situada em Marechal Cândido Rondon no Estado do Paraná, cuja especificação técnica está apresentada no Anexo B.

3.1.4 Tampão Lático

Nos experimentos de determinação da atividade catalítica da enzima β-galactosidase utilizou-se tampão lático recomendado pela NOVO NORDISK (1993), sendo constituída de água destilada, diversos sais e 0,01% de azida sódica como preservativo. As concentrações dos sais utilizados na preparação da solução encontram-se descritos na Tabela 3.2.

Os componentes depois de pesados e dissolvidos em água destilada foram transferidos para um bequer, adicionando água destilada até completar 500 mL, então o pH foi ajustado em 6,5 com solução de ácido clorídrico 0,1 N, completando o volume com água destilada até atingir o volume final de 1L.

Tabela 3.2 – Concentrações dos sais no tampão lático

Componentes	**Concentração (g L^{-1})**
$C_6H_5Na_3O_7$. 2 H_2O	0,795
$C_6H_8O_7$. H_2O	1,663
K_2SO_4	0,180
K_2HPO_4	0,520
KH_2PO_4	1,470
KOH	1,090
$MgCl_2$ .6 H_2O	0,830
$CaCl_2$ .2 H_2O	0,750
NaOH	0,800
$NaHCO_3$	0,280

Fonte: NOVO NORDISK, 1993

3.1.5 Meios de cultura

Para o cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foram utilizados três meios a base de permeado de soro de leite com concentrações baseadas em Pinheiro *et* al. (2003) e Santiago *et* al. (2004) conforme pode ser observado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composições dos meios de cultura

Componentes	**Meio 1** **Pinheiro *et* al. (2003)**	**Meio 2** **Santiago *et* al. (2004)**	**Meio 3**
		g L^{-1}	
Lactose (Permeado)	10,0	50,0	
Extrato de Levedura	1,0	6,0	
$(NH_4)_2SO_4$	1,2	6,0	
KH_2PO_4	5,0	5,0	
$MgSO_4.7H_2O$	0,4	0,6	

Os meios 1 e 2 foram preparados em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5 e o meio 3 foi obtido utilizando água destilada. A cultura foi mantida a 30 °C, 120 rpm por 14 h em uma

incubadora rotatória. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção da lactose, que foi proveniente do permeado de soro de leite.

3.1.6 Enzima comercial

Neste trabalho, utilizou-se como referência a enzima β-galactosidase produzida pela levedura *K. lactis*, Lactozyme® 2600 adquirida comercialmente da empresa Sigma Chemical CO (Sigma-Aldrich), disponível na forma de liquida com concentração superior a 2600 U g^{-1}.

3.1.7 Unidades experimentais

As unidades experimentais foram montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química e são descritas nos itens 3.1.7.1 e 3.1.7.2.

3.1.7.1 Unidade experimental para a determinação da atividade enzimática

Para realização dos ensaios de determinação da atividade enzimática foi utilizado um reator de mistura operado em batelada, com volume útil de 200 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. O reator de mistura apresentava 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno (Figura 3.2).

Com o objetivo de otimizar a realização dos experimentos, três reatores foram montados em série, utilizando o mesmo banho termostatizado.

Figura 3.2 – Unidade experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel

3.1.7.2 Unidade experimental para a fermentação

A produção de β-galactosidase de *K. marxianus* foi obtida por fermentação submersa em duas configurações de reator: reator cônico de bancada e fermentador Biostat B.

O reator cônico de bancada (Figura 3.3) era constituído de um erlenmeyer fechado com rolha de gaze e algodão hidrófobo. O meio de cultura ocupava 30 % do volume total e as fermentações foram conduzidas em incubadora rotatória a 120 rpm, 30 °C por 24 horas.

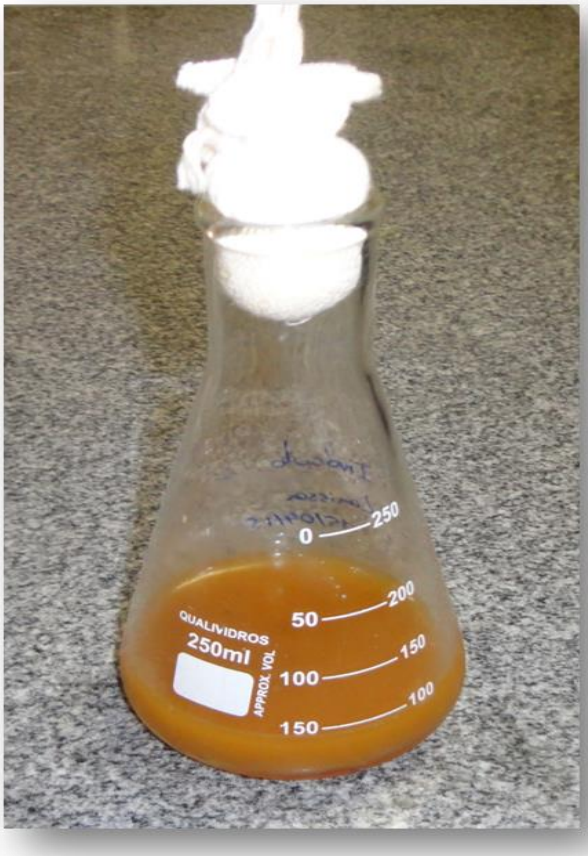


Figura 3.3 – Reator cônico de bancada

O fermentador Biostat B, da marca B. Braun Biotech International, cuja vista é apresentada na Figura 3.4 consiste de um vaso cilíndrico com volume de 2,0 L, fechado por uma tampa de aço inoxidável com orifícios para alimentação de inóculo, saída de amostra, entrada e saída de gás, dotado de controle de pH, temperatura, agitação e aeração.

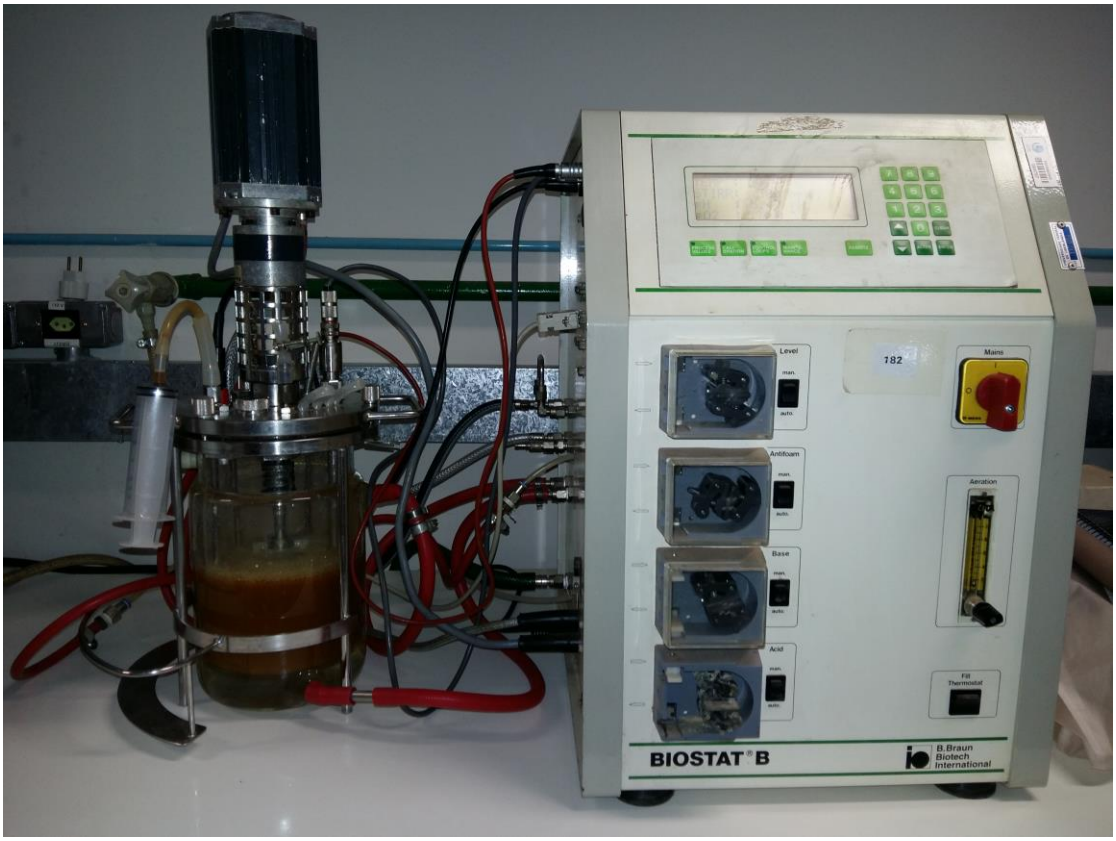


Figura 3.4 – Fermentador Biostat B utilizado para avaliação conjunta da aeração e agitação na atividade da enzima.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Extração da enzima

Com o objetivo de avaliar o melhor método de extração da enzima intracelular β-galactosidase das células de *K. marxianus* ATCC 46537, em escala de laboratório, foram estudados quatro métodos de rompimento celular, que são descritos nos itens 3.2.1.1 a 3.2.1.4.

3.2.1.1 Autólise por clorofórmio

A extração da enzima intracelular β-galactosidase das células de levedura utilizando clorofórmio (PA) como solvente seguiu o procedimento descrito por Santiago *et* al. (2004). Uma amostra de 80 mL de meio fermentado era centrifugada a 6000 rpm (27 200 g) por 5 minutos. O sobrenadante era reservado para determinação da concentração de lactose e pH e o decantado era ressuspendido com tampão fosfato de sódio 10^{-1} M pH 6,6, sendo novamente

centrifugado nas mesmas condições, com o objetivo de promover uma lavagem de células. Após centrifugação, o sobrenadante era descartado e o decantado ressuspenso em 10 mL do mesmo tampão e transferido para um erlenmeyer ao qual era adicionado 2% (v/v) de clorofórmio (PA). Esta mistura era mantida em incubadora rotatória a 150 rpm, 37 ºC por 17 horas.

3.2.1.2 Ruptura em agitador tipo vórtex

O processo de abrasão foi realizado em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro. Foi utilizada uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,95 e 1,05 mm para cada mililitro de suspensão celular. O tubo de ensaio, contendo a suspensão celular e as pérolas de vidro, foi agitado por 30 minutos, com intervalos de 2 minutos em banho de gelo a cada 5 minutos de agitação. O banho de gelo é necessário devido ao problema de desnaturação da enzima por aumento de temperatura (MEDEIROS *et* al., 2008).

3.2.1.3 Ruptura em sonificador

A extração em banho ultrassônico foi realizada utilizando uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,95 e 1,05 mm para cada mililitro de suspensão celular. O tubo de ensaio, contendo a suspensão celular e as pérolas de vidro, foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos, com substituição da água do banho ultrassônico a cada intervalo de 10 minutos de sonificação (MEDEIROS *et* al., 2008).

3.2.1.4 Ruptura em processador ultrassônico

O rompimento ultrassônico foi realizado através de um processador ultrassônico com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W utilizando uma micro ponteira de titânio (Mp) (40% de potência). A suspensão celular foi submetida a 30 minutos de pulsos ultrassônicos (tempo total do processo de 60 minutos), com substituição do banho de gelo a cada 10 minutos (LEMES *et* al., 2012).

Os processos de extração por agitador tipo vórtex, sonicador e processador ultrassônico foram realizados a partir de uma suspensão celular da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. O caldo fermentado foi centrifugado (27 200 g, 10 minutos), o sobrenadante

era reservado para determinação da concentração de lactose e pH e o decantado era ressuspendido com tampão fosfato de sódio 10^{-1} M pH 7,3 para obter uma suspensão celular com 2,62 mg/mL (NUMANOGLU e SUNGUR, 2004; MANERA *et* al., 2008).

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular obtida após cada processo de ruptura, foi centrifugada (27 200 g, 10 minutos) e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática e o teor de proteínas totais.

3.2.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537, na sua forma solúvel (livre), foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose realizada em um reator de mistura com um volume de 75 mL de uma solução 50 g L^{-1} de lactose (PA), preparado em tampão lático pH 6,5, a 30 °C conforme descrito por Santiago *et* al. (2004). Para cada experimento era adicionada ao reator 5 mL do sobrenadante obtido após processo de extração da enzima.

A unidade de atividade enzimática para a enzima na forma livre foi U mL^{-1}, definida como µmol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática, à temperatura de 30 °C, pH 6,5, com uma concentração inicial de lactose de 50 g L^{-1}.

Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de cinco em cinco minutos. Cada amostra era colocada em um tubo de ensaio, o qual era tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase. A atividade a partir do método das taxas iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, era obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

3.2.3 Determinação da concentração e viabilidade celular

A concentração celular foi estimada a partir da absorbância a 650 nm, convertida em massa seca de células, usando o fator de conversão obtido da curva padrão de biomassa seca que é apresentada no Apêndice A.

A quantificação de células vivas e mortas foi realizada por contagem em câmara de Neubauer utilizando-se a técnica de coloração com azul de metileno que consiste em se

misturar partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentaram-se coloridas de azul. A porcentagem ou o número de células viáveis foi determinada transferindo-se, com uma pipeta de Pasteur, a amostra, para a câmara de Neubauer e visualizando-a no microscópio com a objetiva de 400X.

3.2.4 Determinação das concentrações de açúcares e etanol

As concentrações de acúcares (lactose, glicose e galactose) e de etanol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em todos os experimentos. O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20ª Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes foram separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, o fluxo de bomba 0,5 mL min^{-1}, temperatura do forno de 80 ºC e volume de injeção de 20 microlitros.

3.2.5 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi obtida a partir da determinação da concentração de nitrogênio total pelo analisador TOC-L Modelo CSH da Shimadzu, convertida em proteína total através do fator de conversão obtido pela curva padrão utilizando albumina de soro bovina (BSA) como proteína padrão conforme pode ser visto no Apêndice B.

3.3 TESTES PRELIMINARES PARA ESCOLHA DO MEIO PARA INÓCULO

Para preparação do inóculo foram testados três meios à base de permeado de soro de leite com concentrações baseadas em Pinheiro *et* al. (2003) e Santiago *et* al. (2004) conforme descrito anteriormente (Tabela 3.2). A quantificação de células vivas foi realizada por contagem em câmara de Neubauer no início e final do experimento, após 24 horas de fermentação.

3.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR

A cinética de crescimento celular foi obtida através de fermentação submersa em reator cônico de bancada utilizando permeado de soro de leite como principal fonte de carbono. O meio era composto por extrato de levedura (6,0 g L^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e permeado de soro de leite em pó preparado em tampão fosfato 10^{-1} M pH 5,5, a fim de se obter uma concentração de lactose de 50 g L^{-1}. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória a 120 rpm, 30 ºC por 48 horas, iniciando com 10 % (v/v) de inóculo. A concentração celular foi determinada a cada 3 horas.

A cinética de crescimento celular seguiu o modelo descrito na Equação 3.1. A taxa específica máxima de crescimento (μmáx) foi obtida por regressão linear utilizando-se o software *Statistica* 7.0. O tempo de geração (tg) foi calculado pela Equação 3.2 conforme Bailey e Ollis (1986), em que o t_{lag} representa o tempo da fase de latência, x_0 e x representação a concentração de células no tempo inicial e no tempo t, respectivamente.

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu_{máx}(t - t_{lag}) \quad \text{ou} \quad x = x_0 \cdot e^{\mu_{máx}(t-t_{lag})} \tag{3.1}$$

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{máx}} \tag{3.2}$$

3.5 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Os efeitos do pH e das concentrações de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na produção de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foram estudados por meio de um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} ensaios acrescidos de 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos (Tabela 3.4).

Os meios fermentativos foram preparados utilizando tampão fosfato 10^{-1} M iniciando com uma concentração de células de 1 g L^{-1}. O tempo total de fermentação era de 24 horas. O software *Statistica* 7.0 foi utilizado para analisar os resultados.

Tabela 3.4 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Fatorial Fracionário

Valores codificados	**Lactose (g L^{-1})**	**Extrato de levedura (g L^{-1})**	**$(NH_4)_2SO_4$ (g L^{-1})**	**pH**
-1	10,0	1,0	0,0	5,0
0	40,0	6,5	4,0	6,0
1	70,0	12,0	8,0	7,0

3.6 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Para análise da composição do meio foi estudado a influência das concentrações de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$, tendo a atividade de β-galactosidase como resposta. Foi utilizada a técnica do Delineamento Composto Central para a avaliação utilizando análise da superfície de resposta. Assim, foi necessário, primeiramente, programar ensaios por meio de um planejamento experimental em que se selecionou um número fixo de níveis para cada uma das variáveis. Então foi possível executar experimentos com todas as possíveis combinações.

Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica 7*.0, tendo 2^3 pontos fatoriais, 2x3 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando dezessete experimentos.

A concentração de lactose variou de 50 a 150 g L^{-1}, as concentrações de extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ variaram de 0 a 12,5 g L^{-1}. O meio fermentativo foi enriquecido com KH_2PO_4 (5 g L^{-1}) e $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e preparados em tampão fosfato 10^{-1} M pH 7,0, definido em experimentos preliminares, iniciando com uma concentração de células de 5 g L^{-1}. O alfa de rotabilidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,67 e as equações de codificação para a Concentração de Lactose (X_1), Extrato de levedura (X_2) e $(NH_4)_2SO_4$ (X_3) estão apresentadas, respectivamente, nas Equações 3.3, 3.4 e 3.5.

$$X_1 = \frac{\left(\left[Lactose\right] - 100\right)}{30} \tag{3.3}$$

$$X_2 = \frac{\left(\left[\text{Extrato de levedura}\right] - 6,26\right)}{3,74} \tag{3.4}$$

$$X_3 = \frac{\left(\left[\left(NH_4\right)_2 SO_4\right] - 6,26\right)}{3,74} \tag{3.5}$$

Na Tabela 3.5 podem ser vistos os valores utilizados no planejamento experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.5 - Valores reais e codificados utilizados no Delineamento Composto Central

Valores codificados	**Lactose (X_1) (g L^{-1})**	**Extrato de levedura (X_2) (g L^{-1})**	**$(NH_4)_2SO_4$ (X_3) (g L^{-1})**
-α	50,0	0	0
-1	70,0	2,52	2,52
0	100,0	6,26	6,26
1	130,0	10,0	10,0
+α	150,0	12,52	12,52

As faixas de concentração inicial de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ foram determinadas baseando-se nos trabalhos de Manera *et* al. (2008) e Rech e Ayub (2007) e em testes preliminares. A concentração inicial de células foi determinada por meio de testes preliminares. O tempo total de fermentação foi de 24 horas.

A Tabela 3.6 mostra a matriz do Delineamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis em estudo. Para o desenvolvimento de tal estudo, os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar resultados tendenciosos.

Tabela 3.6 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis.

Experimentos	Concentração (g L^{-1})		
	Lactose (X_1)	**Extrato de Levedura (X_2)**	**$(NH_4)_2SO_4$ (X_3)**
1	70 (-1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)
2	70 (-1)	2,52 (-1)	10 (+1)
3	70 (-1)	10 (+1)	2,52 (-1)
4	70 (-1)	10 (+1)	10 (+1)
5	130 (+1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)
6	130 (+1)	2,52 (-1)	10 (+1)
7	130 (+1)	10 (+1)	2,52 (-1)
8	130 (+1)	10 (+1)	10 (+1)
9	50 (-α)	6,26 (0)	6,26(0)
10	150(+α)	6,26 (0)	6,26(0)
11	100 (0)	0 (-α)	6,26(0)
12	100 (0)	12,52 (+α)	6,26(0)
13	100 (0)	6,26(0)	0 (-α)
14	100 (0)	6,26(0)	12,52 (+α)
15	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)
16	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)
17	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)

3.6.1 Avaliação da composição do meio fermentativo na co-produção de bioetanol

A co-produção de etanol foi verificada durante todos os experimentos. Um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, tendo 2^3 pontos fatoriais, 2x3 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, foi utilizado para estudar as concentrações de lactose (X_1), extrato de levedura (X_2) e $(NH_4)_2SO_4$(X_3) na produção da bioetanol (Tabela 3.6). A análise estatística foi realizada por meio do programa computacional empregando o software *Statistica* 7.0 da StatSoft.

3.7 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

A influência da aeração e agitação na produção de β-galactosidase foi avaliada utilizando-se a técnica do planejamento experimental, com o qual fez-se a otimização por análise da superfície de resposta. Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica 7*.0, tendo 2^2 pontos fatoriais, 2x2 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando-se onze experimentos.

A aeração variou de 0 a 1,26 vvm e agitação variou de 0 a 500 rpm. A produção de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi conduzida por fermentação submersa em um fermentador Biostat B, com um volume de trabalho de 1,5 L, contendo o meio de cultura otimizado pelo Delineamento Composto Central descrito no item 3.6, composto por lactose (proveniente do permeado de soro de leite), extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$ enriquecido com KH_2PO_4 (5 g L^{-1}) e $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e preparados em tampão fosfato 10^{-1} M pH 7,0 iniciando com uma concentração de células de 5 g L^{-1}. A temperatura foi mantida a 30 °C. O oxigênio dissolvido e o pH foram determinados utilizando-se eletrodos (Mettler-Toledo, Brasil) no fermentador. Amostras eram retiradas ao longo da fermentação (tempo total de 24 horas), nas quais analisavam-se atividade enzimática, concentração de células, proteínas, lactose e etanol.

O alfa de rotabilidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,41421 e as equações de codificação para a aeração (X_1) e agitação (X_2) são apresentadas, respectivamente, nas Equações 3.6 e 3.7.

$$X_1 = \frac{(Aeração - 0,75)}{0,51} \tag{3.6}$$

$$X_2 = \frac{(Agitação - 250)}{1,77} \tag{3.7}$$

Os valores reais e codificados para as variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 3.7. Os resultados foram analisados pelo software *Statistica* 7.0. As faixas estudadas para aeração e agitação foram baseadas no trabalho de Alves *et* al. (2010) e em testes preliminares.

Tabela 3.7 - Valores reais e codificados utilizados no Delineamento Composto Central

Valores codificados	**Aeração (X_1) (rpm)**	**Agitação (X_2) (vvm)**
-α	0,00	0
-1	0,24	73
0	0,75	250
1	1,26	427
+α	1,50	500

A Tabela 3.8 mostra a matriz do delineamento composto central com valores codificados e originais das variáveis em estudo. Para o desenvolvimento de tal estudo, os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar resultados tendenciosos.

Tabela 3.8 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis.

Experimento	**Agitação (rpm)**	**Aeração (vvm)**
1	-1 (73)	-1 (0,24)
2	-1 (73)	1 (1,26)
3	1 (427)	-1(0,24)
4	1 (427)	1 (1,26)
5	-α (0)	0 (0,75)
6	+α (500)	0 (0,75)
7	0 (250)	-α (0,00)
8	0 (250)	+α (1,50)
9	0 (250)	0 (0,75)
10	0 (250)	0 (0,75)
11	0 (250)	0 (0,75)

O coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (K_La) foi determinado usando um elétrodo para medição da concentração de oxigênio dissolvido, pelo método de gaseificação para cada combinação de agitação e aeração. Este método consiste em reduzir a concentração de oxigênio no líquido contido no reator a zero, pela passagem de nitrogênio. A seguir, inicia-se a agitação e a aeração do líquido (isento de células) e registra-se a variação da concentração de oxigênio com o tempo. Como pode ser observada pela Equação 3.8, deve

haver uma relação linear entre ln(1-C/Cs) e o tempo, cujo coeficiente angular fornece o valor de $K_L a$ (SCHMIDELL *et* al., 2001).

$$\ln\left(1-\frac{C}{C_S}\right) = -K_L a \cdot t \tag{3.8}$$

3.7.1 Influência conjunta da aeração e agitação na co-produção de bioetanol

A influência da aeração e agitação na co-produção de bioetanol foi avaliada utilizando-se a técnica do planejamento experimental, com o qual fez-se a avaliação por análise da superfície de resposta. Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica 7*.0, tendo 2^2 pontos fatoriais, 2x2 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando onze experimentos. Os valores reais e codificados para as variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 3.7.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

3.8.1 Determinação das constantes cinéticas

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas, em condições adequadas e ausência de fatores inibidores, segue o modelo Michaelis-Menten (Equação 3.9). As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas por regressão não linear utilizando-se o software *Statistica 7*.0. A concentração de lactose estudada foi de 0 a 140 g L^{-1} e a atividade enzimática determinada conforme o item 3.2.2.

$$V = \frac{V_{máx} \cdot S}{K_m + S} \tag{3.9}$$

3.8.2 Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase

A influência da temperatura na atividade enzimática do extrato clarificado de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi estudada utilizando-se o mesmo

procedimento descrito no item 3.2.2, porém a determinação da atividade enzimática foi realizada a 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60 °C.

3.8.3 Influência do pH na atividade de β-galactosidase

A influência do pH na atividade enzimática do extrato clarificado de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi estudada utilizando-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2. A temperatura da reação foi mantida em 40 °C e a solução de lactose foi preparada em tampão lático previamente ajustado em diferentes valores de pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,3 e 7,5).

3.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 12,5% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia conforme a técnica descrita por Laemmli (1970).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções: Tris-HCl 2 M pH 8,8, Acrilamida:Bis 30:0,8, Temed 1 % e persulfato de amônio 10 %. Enquanto que, para o gel de empilhamento foram utilizados: Tris-HCl 2M pH 6,8, Acrilamida:Bis 30:08 , Temed 1 % e persulfato de amônio 1 %. A solução de tris-base 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1 % pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. As amostras contendo 10 μg de proteínas foram dissolvidas em 20μL do tampão STOP (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 6 %, Azul de Bromofenol 0,001 %, Glicerol 10 % e 10 μL de β-mercaptoetanol 10 %). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100 °C. A eletroforese foi conduzida a 10 mA de corrente, por aproximadamente 90 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o fronte do gel.

Como referência para a análise (Amostra 0) utilizou-se a enzima β-galactosidase produzida pela levedura *K. lactis*, Lactozyme® 2600, adquirida comercialmente da empresa Sigma Chemical CO (Sigma-Aldrich), disponível na forma de líquida. As amostras 1 a 6 referem-se a extratos enzimáticos produzidos por fermentação submersa, utilizando-se a levedura *K. marxianus*.

Com o intuito de comparar diferentes tratamentos aplicados na ruptura das células e o armazenamento do extrato enzimático foi preparado diversas amostras. Algumas amostras foram submetidas ao processo de diálise em tubo de diálise SERVAPOR (MWCO 12000 - 14000) de 16 mm de diâmetro como uma etapa preliminar para purificação da enzima produzida.

O processo de liofilização foi empregado para obtenção de extrato enzimático concentrado. As amostras (10 mL) eram dispostas em tubo Falcon e então submetidas ao processo de congelamento em Ultra-freezer da marca Nuaire Modelo NU9448366 a uma temperatura de -73 ºC por 4 horas. A liofilização foi realizada por 15 horas em Liofilizador Modelo L101 da marca Liotop. Finalizando o processo de liofilização, o tubo Falcon contendo a amostra desidratada era selado e armazendo a -16 °C.

A descrição da metodologia empregada para obtenção das amostra de 1 a 6 é apresentada a seguir:

Amostra 1: A suspensão celular, submetida ao processo de ruptura em processador ultrassônico, foi preparada utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,3. O extrato enzimático foi dialisado por 36 horas. Amostra obtida em 18/09/2015 foi disponibilizada na forma líquida.

Amostra 2: Preparou-se a suspensão celular, para ser submetida ao processo de ruptura em processador ultrassônico, utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,3. O extrato clarificado obtido em 20/01/2016 foi armazenado na forma líquida.

Amostra 3: O extrato enzimático clarificado obtido em 20/01/2016 foi armazenado na forma líquida, sendo a suspensão celular submetida ao processo de ruptura em agitador tipo vórtex (30 minutos) preparada utilizando-se tampão fosfato de sódio pH 7,3.

Amostra 4: A suspensão celular, submetida ao processo de ruptura em processador ultrassônico, foi preparada utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,3. O extrato enzimático foi dialisado por 36 horas. Amostra obtida em 18/09/2015 foi disponibilizada na forma liofilizada.

Amostra 5: Preparou-se a suspensão celular, para ser submetida ao processo de ruptura em processador ultrassônico, utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,3. O extrato enzimático foi dialisado por 36 horas e em seguida liofilizado. A amostra foi obtida em 20/01/2016.

Amostra 6: O extrato enzimático liofilizado obtido em 18/01/2016 teve a suspensão celular, preparada utilizando água deionizada, submetida ao processo de ruptura em processador ultrassônico.

Terminada a migração o gel foi submetido em coloração por *Comassie Brilliant Blue*. A massa molecular foi estimado pelo padrão de massa molecular 7L (Sigma), contendo as seguintes proteínas: soroalbumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa), α- lactoalbumina (14,4kDa).

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão da escolha do meio de cultura para preparação do inóculo, a cinética de crescimento celular da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 e o estudo dos métodos de ruptura utilizados para extração da enzima β- galactosidase do interior da célula. Na sequência são apresentados a influência da composição do meio de fermentação para produção de β-galactosidase em fermentação submersa conduzida em reator cônico de bancada, além dos resultados referentes à influência conjunta da aeração e agitação na síntese da referida enzima em fermentador. Os resultados e discussão da co-produção de bioetanol alcançada durante as fermentações para produção da enzima também são apresentados. Por fim, serão apresentados também os resultados obtidos para caracterização da enzima β-galactosidase produzida em relação aos parâmetros cinéticos, massa molecular, influência da temperatura e pH na atividade.

4.1 TESTES PRELIMINARES PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

Os resultados obtidos para o cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 utilizando três meios à base de permeado de soro de leite com concentrações baseadas em Pinheiro *et* al. (2003) e Santiago *et* al. (2004) estão apresentados na Figura 4.1.

As quantificações de células vivas realizadas por contagem em câmara de Neubauer no início e final do experimento (14 horas) mostraram que os meios estudados foram adequados para o crescimento da levedura e os meios com concentrações baseadas no trabalho de Santiago *et* al. (2004) (Meios 2 e 3) alcançaram maiores contagens de células por mililitro de meio fermentado quando comparados com o Meio 1, cuja composição foi proposta por Pinheiro *et* al. (2003).

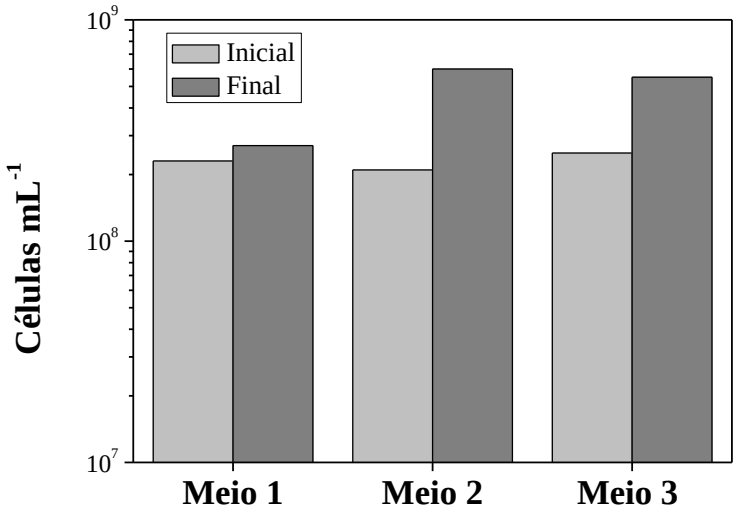


Figura 4.1 – Quantificação de células vivas no início e no final da preparação do inóculo utilizando diferentes meios de cultivo. Meio 1 (Pinheiro *et* al., 2003); Meio 2 e 3 (Santiago *et* al., 2004)

O inóculo obtido pelo cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 utilizando três meios à base de permeado de soro de leite foram analisados quanto à produção de β-galactosidase. O extrato clarificado obtido pela ruptura em agitador tipo vórtex das células de levedura foi utilizado para determinação da atividade enzimática e os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Atividade enzimática do inóculo obtido utilizando diferentes meios de cultivo

Meio de cultura	**Atividade enzimática específica ($U\ mg_{proteína}^{-1}$)**
Meio 1 (Pinheiro *et* al., 2003)	8,493
Meio 2 (Santiago *et* al., 2004)	18,443
Meio 3 (Santiago *et* al., 2004)	9,507

Os resultados de atividade enzimática obtidos utilizando diferentes meios de cultivo mostram que o Meio 2, proposto por Santiago *et* al. (2004) e preparado em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5, foi o que apresentou o melhor resultado em relação a atividade enzimática específica.

De posse dos resultados de quantificação de células vivas no início e final da preparação do inóculo utilizando diferentes meios de cultivo e da atividade alcançada em cada um dos meios, o Meio 2, composto por extrato de levedura (6,0 g L^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e permeado de soro de leite em pó, preparado em tampão fosfato 10^{-1} M pH 5,5, a fim de se obter uma concentração de lactose de 50 g L^{-1}, foi o meio escolhido para obtenção do inóculo em todas as etapas subsequentes do trabalho.

Nunes *et* al. (1993) estudaram a produção de β-galactosidase *K. marxianus* NRRL Y-2415 por fermentações em fermentador de bancada, utilizando como meio de cultura soro de queijo desproteinado por acidificação. O pH inicial da fermentação foi de 5,5, a temperatura foi mantida em 30 °C e aeração de 0,5 vvm. Neste estudo, verificou-se que o soro de queijo desproteinado dispensava a sua suplementação com nutrientes, mas a adição de sulfato de amônio e fosfato biácido de potássio aumentava o rendimento celular e a produção de β-galactosidase.

Santiago *et* al. (2004) concluíram que os meios de cultura contendo lactose como fonte de carbono, formulados com soro de queijo, se mostraram adequados para o crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 e para a síntese da enzima β-galactosidase, desde que suplementados com nutrientes adequados.

Hott *et* al. (2008) estudaram o tratamento térmico do soro de queijo para determinação de condições ideais para produção de β-galactosidase por fermentação com *K. marxianus*. Segundo os autores, a utilização de meios de cultivo alternativos de interesse industrial tem sido empregados para o crescimento de vários microrganismos com o objetivo de diminuir custos.

Srivastava *et* al (2016) utilizaram para o cultivo da levedura *K. marxianus* NCIM 3551 um meio consistindo em (g L^{-1}): extrato de levedura 15,0; sulfato de amônio 9,0; fosfato monopotássico 5,0; sulfato de magnésio 0,4 e lactose 30,0 em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5.

4.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR

A Figura 4.2 ilustra a curva de crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 em reator cônico de bancada.

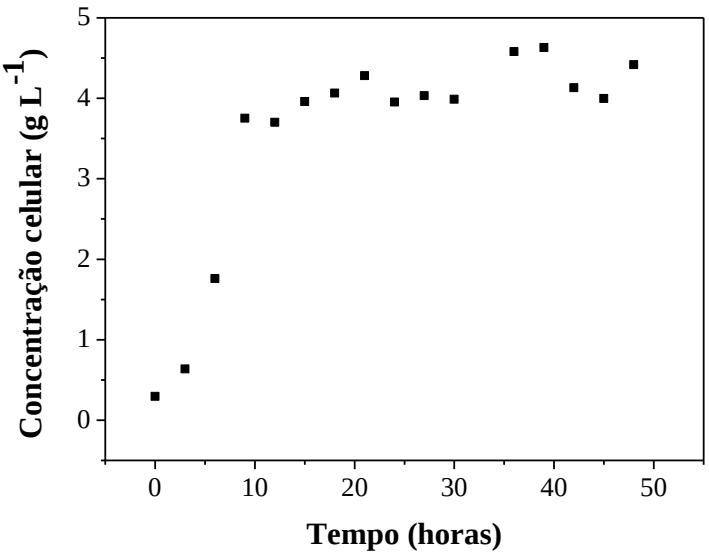


Figura 4.2 – Curva de crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537

Os resultados experimentais na fase exponencial foram ajustados segundo a Equação (3.1) utilizando o método Quasi-Newton e obteve-se coeficiente de determinação de 0,98 indicando um excelente ajuste. O gráfico do ajuste obtido pode ser visualizado na Figura 4.3. O valor da taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi de 0, 288 h^{-1} e o tempo da fase de latência (t_{lag}) ajustado foi de 0,087 horas, indicando que o inóculo já continha células ativadas, estando as células desde a incubação na fase exponencial e em 12 h já entrando na fase estacionária. O tempo de geração nesta fase foi de 2,41 horas (Equação 3.2) e alcançou uma concentração celular máxima experimental de aproximadamente 4 g L^{-1}, e, segundo a Equação (3.1) a concentração celular alcançada após 9 horas de fermentação foi de 3,94 g L^{-1}.

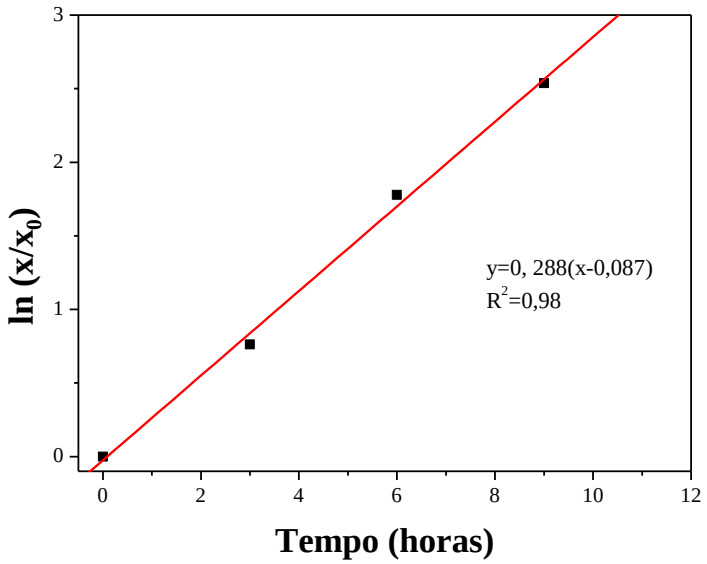


Figura 4.3 – Ajuste dos resultados experimentais à Equação 3.1 para determinação da taxa específica máxima de crescimento

Scholz (2011) realizou um estudo cinético de *K. marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β-galactosidase e obteve o valor da taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) igual a 0,862 h^{-1} na fermentação realizada a 30 °C, agitação de 220 min^{-1}, concentração de lactose de 8,9 g L^{-1}, concentração de milhocina 3,0 g L^{-1} e ausência de prodex.

Segundo Rajoka *et* al. (2003), a cinética de *K. marxianus* NIBGE Y-1 em diferentes fontes de carbono, obtiveram o valor da taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) igual a 0,36 h^{-1} ao utilizar lactose como substrato.

Com base nos resultados experimentais da Figura 4.2 optou-se por um tempo de preparação de inóculo de 15 horas, já dentro da fase estacionária, visando um aumento populacional.

4.3 ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASES DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de atividade enzimática e de concentração de proteínas, obtidos após ruptura das células de *K. marxianus* ATCC 46537 em 24 horas de fermentação em reator cônico de bancada, utilizando diferentes métodos de extração.

Tabela 4.2 – Resultados de atividade enzimática da ruptura das células de *K. marxianus* ATCC 46537 utilizando diferentes métodos de extração

Método de extração	Atividade Enzimática ($U\ mL^{-1}$)	Concentração de proteínas ($mg\ L^{-1}$)	Atividade Específica ($U\ mg_{proteína}^{-1}$)
Autólise por Clorofórmio	20,001	2461,68	8,125
Ruptura em agitador tipo vórtex	11,667	1623,998	7,184
Ruptura em sonicador	1,112	194,169	5,670
Ruptura em processador ultrassônico	10,011	1382,769	7,240

Como observado na Tabela 4.2, a ruptura de células de levedura foi alcançada com utilização de todos os métodos testados, sendo observado o maior valor médio para a atividade enzimática quando a ruptura foi realizada por autólise das células utilizando clorofórmio (20,001 U mL^{-1}), resultado próximo ao obtido por Santiago *et* al. (2004) para a mesma levedura. Contudo a utilização deste método é inviável na obtenção de β-galatosidase de *K. marxianus*, pelo fato da enzima β-galatosidase ter sua aplicação na indústria de alimentos, pelo risco de possíveis resíduos de clorofórmio no produto final, sendo assim, a ruptura das células de *Kluyveromyces* não deve ser conduzida por métodos químicos, pois implicaria a necessidade de remoção de contaminantes, aumentado os custos de produção. Por outro lado, os métodos mecânicos e físicos de ruptura celular não implicam em riscos de toxicidade, pois não incluem produtos químicos no extrato enzimático (KULA e SCHUTTE, 1987; PANDIT *et* al., 2005; MEDEIROS *et* al., 2008).

Os métodos de ruptura mecânica apresentaram valores inferiores em termos de atividade enzimática quando comparados com o método de extração química, todavia quando analisados os resultados de atividade específica apresentados na Tabela 4.2 pode-se observar que os métodos de ruptura utilizando agitador tipo vórtex e processador ultrassônico

alcançaram valores próximos ao obtido quando utilizado o método químico (autólise por clorofórmio).

A influência do tempo nos processos de extração utilizando agitador tipo vórtex e processador ultrassônico, estão apresentados em termos de atividade enzimática (U mL^{-1}) e atividade específica (U $mg_{proteína}^{-1}$) nas Figura 4.4 e 4.5, respectivamente.

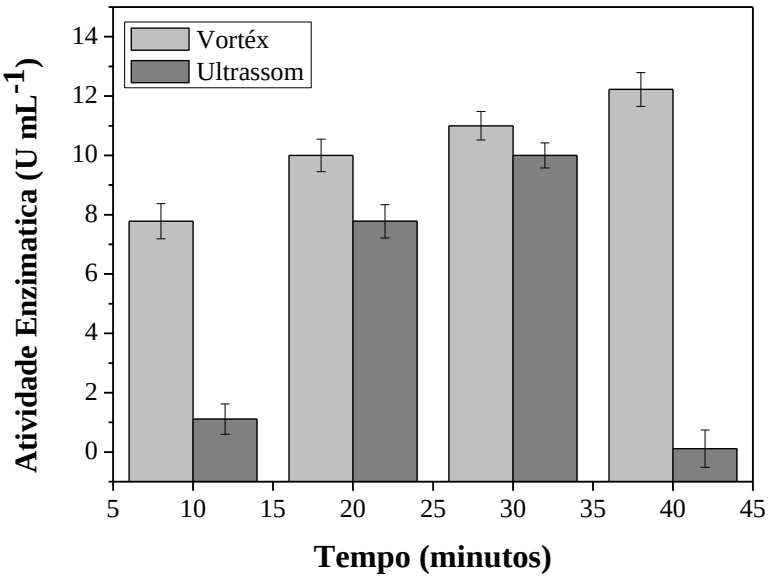


Figura 4.4 – Influência do tempo nos processos de ruptura em agitador tipo vórtex e processador ultrassônico na atividade enzimática da β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537.

Para a extração usando vórtex, o aumento do tempo implicou em aumento da atividade enzimática como observado na Figura 4.3, contudo quando se analisa a influência do tempo de agitação na atividade específica (Figura 4.4) verifica-se que o tempo de 30 minutos promoveu o melhor resultado em atividade enzimática específica, ou seja, o melhor resultado de atividade enzimática por miligrama de proteína total. A diminuição da atividade com o aumento no tempo de ruptura de 40 minutos (tempo total do processo de 80 minutos) pode ter ocorrido devido à desnaturação da enzima pelo longo tempo de aplicação dos pulsos no equipamento. Perda de atividade durante o processo de extração utilizando equipamentos semelhantes também tem sido verificado por diversos autores (PERSIKE *et* al., 2002; TAN *et* al., 2006; MEDEIROS *et* al. 2008).

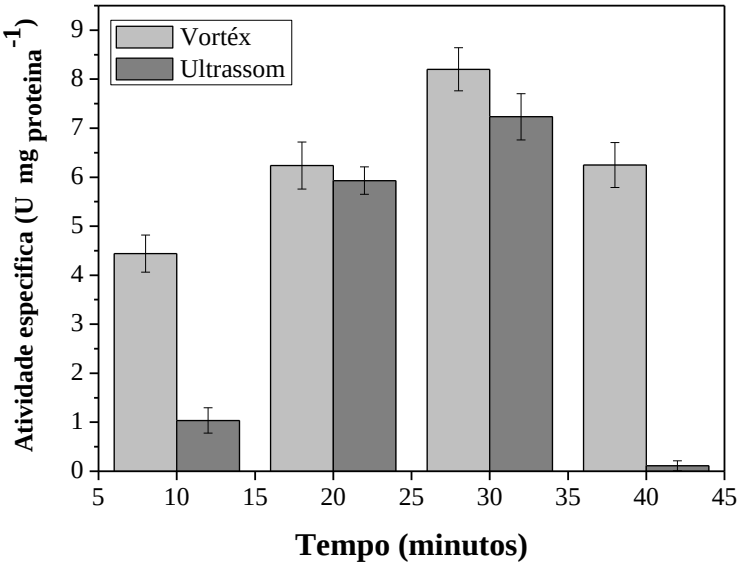


Figura 4.5 – Influência do tempo nos processos de ruptura em agitador tipo vórtex e processador ultrassônico na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537.

De acordo com as Figura 4.4 e 4.5, na extração utilizando processador ultrassônico, o aumento do tempo de 10 minutos até 30 minutos de ruptura proporcionou maiores valores para atividade enzimática e específica. O tempo de 40 minutos foi diferente dos demais; observou-se uma queda abrupta da atividade enzimática e específica. A diminuição da atividade enzimática específica pode ter ocorrido devido à dissipação de ondas ultrassônicas pelo equipamento.

Comparando-se os métodos de ruptura mecânica em agitador tipo vórtex que utiliza pérolas de vidro e o método de extração utilizando processador ultrassônico, ambos foram eficientes no processo de extração de β-galactosidase do interior das células de levedura *K. marxianus* ATCC 46537, sendo que o método abrasivo, utilizando pérolas de vidro, apresentou melhores resultados quando comparados com a extração em processador ultrassônico em todos os tempos estudados. Apesar dos valores próximos para ambos os processos de extração, a temperatura durante o processo, dever ser controlada, já que a geração de calor pode resultar em desnaturação da enzima e consequentemente perda da eficiência do processo.

Lemes *et* al. (2012) utilizaram processador ultrassônico (20 KHz e potência máxima de 150 W) com ponteira intermediária (70% de potência) para utilização em escala

laboratorial no processo de extração de β-galactosidade do interior das células de levedura *K. marxianus* CCT 7082 e obtiveram resultados em atividade enzimática (35,04 e 39,1 U L^{-1}) e rendimentos (876,0 e 977,5 U g^{-1}) similares ao método de extração por abrasão que utiliza pérolas de vidro respectivamente.

Gerde *et* al. (2012) utilizaram o método de extração ultrassônico para extração de lipídeos do interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, o qual se mostrou eficiente. Em ambos os tipos de algas, a extração de material intracelular aumentou com o aumento do tempo e da energia dissipada. No entanto, foi constatado que as condições operacionais devem ser bem estabelecidas e controladas, pois o processo sem controle pode resultar na formação de radicais livres que prejudicam a qualidade do óleo extraído neste processo.

Os processos de extração em agitador tipo vortéx e processador ultrassônico foram os métodos escolhidos para ruptura da levedura *K. marxianus* nas etapas subsequentes do trabalho.

4.4 INFLUÊNCIA DO pH E DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Utilizando um Delineamento Fatorial Fracionário foram realizados experimentos com três níveis para cada variável independente (Tabela 3.4). As respostas de atividades específicas resultantes foram analisadas estatisticamente pelo software *Statistica* 7.0. Uma estimativa do principal efeito foi obtida por meio da avaliação da diferença no desempenho do processo causada por uma mudança do nível mais baixo (-1) para o mais alto (+1) da variável correspondente. Os resultados obtidos para cada experimento deste Planejamento Fatorial Fracionário podem ser visualizados na Tabela 4.3.

As atividades específicas variaram de acordo com as condições de fermentação, de 8,537 a 35,535 U $mg_{proteina}^{-1}$. A atividade específica máxima foi obtida em fermentação submersa a pH 7,0 e concentrações de lactose, de extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ de 70,0, 1,0 e 0,0 g L^{-1}, respectivamente.

Tabela 4.3 – Os valores reais e os valores codificados (entre parênteses) e resultados experimentais de atividade específica obtido pelo Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} ensaios acrescidos de 3 pontos centrais

Experimento	**Lactose (g L^{-1})**	**Extrato de Levedura (g L^{-1})**	**$(NH_4)_2SO_4$ (g L^{-1})**	**pH**	**Atividade Específica (U $mg_{proteina}^{-1}$)**
1	10,0 (-1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	5,0 (-1)	18,263
2	70,0 (+1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	7,0 (+1)	35,535
3	10,0 (-1)	12,0 (+1)	0,0 (-1)	7,0 (+1)	17,940
4	70,0 (+1)	12,0 (+1)	0,0 (-1)	5,0 (-1)	22,291
5	10,0 (-1)	1,0 (-1)	8,0 (+1)	7,0 (+1)	15,991
6	70,0 (+1)	1,0 (-1)	8,0 (+1)	5,0 (-1)	23,925
7	10,0 (-1)	12,0 (+1)	8,0 (+1)	5,0 (-1)	8,537
8	70,0 (+1)	12,0 (+1)	8,0 (+1)	7,0 (+1)	21,525
9	40,0 (0)	6,5 (0)	4,0 (0)	6,0 (0)	17,894
10	40,0 (0)	6,5 (0)	4,0 (0)	6,0 (0)	21,016
11	40,0 (0)	6,5 (0)	4,0 (0)	6,0 (0)	18,491

Como pode ser visto na Tabela 4.4, todas as variáveis tiveram efeito estatisticamente significativo a 90% na atividade específica e estes resultados mostram uma significativa influência da concentração de lactose num aumento da atividade específica, o que indica que a utilização de valores mais elevados de concentração de lactose implicam em maior produção β-galactosidase. Quanto às concentrações de extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$, o sinal negativo indica que em maiores concentrações foram obtidos menores valores de atividade enzimática específica. A produção máxima β-galactosidase foi afetada de modo mais significativo (o nível de significância de 0,10) por lactose (efeito médio positivo de 10,64 U $_{mgproteina}^{-1}$), seguido de $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura e pH.

Santiago *et* al. (2004) estudaram a influência das concentrações de nutrientes no meio de cultura à base de soro de queijo com o objetivo de produzir β-galactosidase de *K. marxianus* e obtiveram uma atividade enzimática e concentração celular de 28 U mL^{-1} e 5,3 g L^{-1}, respectivamente, para a fermentação realizada a 30 °C, pH inicial de 5,5, sob agitação, com uma concentração celular inicial de 10^7 células mL^{-1}, a partir do meio com a seguinte

composição (g L^{-1}): lactose (50,0), extrato de levedura (12,0), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0), KH_2PO_4 (5,0) e $MgSO_4.7H_2O$ (0,6).

Tabela 4.4 – Estimativa de efeitos para a atividade de β-galactosidase[a] utilizando um Planejamento Fatorial Fracionário

Fator	Efeito (U $mg_{proteina}^{-1}$)	Erro Padrão	t(6)	p	Limite de Confiança (-90 %)	Limite de Confiança (+90 %)
Média	20,13	0,54	37,42	0,000000	19,08290	21,17313
Lactose	10,64	1,26	8,43	0,000152	8,18540	13,08740
Extrato de Levedura	-5,86	1,26	-4,64	0,003532	-8,30649	-3,40449
$(NH_4)_2SO_4$	-6,01	1,26	-4,77	0,003103	-8,46404	-3,56203
Ph	4,49	1,26	3,56	0,011889	2,04268	6,94468

[a] Todos os valores numéricos são fatores significativos (nível de confiança de 90%)

A fim de comparar a atividade enzimática alcançada neste trabalho com a atividade obtida por Santiago *et* al. (2004), foi necessária a conversão para a atividade enzimática obtida por Santiago *et* al. (2004) para uma concentração de células de 2,62 g L^{-1}, que é a concentração de células padrão para todas as amostras deste estudo, obtendo-se 13,84 U mL^{-1}. No presente trabalho, a atividade enzimática de 16,889 U mL^{-1} foi obtida em fermentação submersa com pH 6,0 e concentrações de lactose, de extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ de 40,0; 6,5 e 4,0 g L^{-1}, respectivamente. Este resultado indica que a utilização de concentrações mais baixas de lactose, de extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ quando comparados com as concentrações utilizadas por Santiago *et* al. (2004) implica num aumento de 22% da atividade enzimática. Esta observação é importante, uma vez que no presente trabalho obteve-se uma composição de meio de fermentação que aumentou a atividade enzimática, a um custo mais baixo, porque as concentrações de lactose, de extrato de levedura e de $(NH_4)_2SO_4$ utilizados foram menores.

4.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Baseado nos resultados obtidos da estimativa de efeitos do Delineamento Fatorial Fracionário para a resposta atividade de β-galactosidase verificou-se que a variável pH

apresentou menor efeito, e, portanto baseado em testes preliminares e no trabalho de Guido (2012) o mesmo foi fixado para todos os experimentos em 7,0. As faixas para as concentrações de lactose, de extrato de levedura e de $(NH_4)_2SO_4$ foram determinadas a partir de testes preliminares e baseados no trabalho de Manera *et* al. (2008) e Rech e Ayub (2007).

Os resultados apresentados na Tabela 4.5, para a atividade específica, obtidos a partir do Delineamento Composto Central, foram analisados estatisticamente.

Tabela 4.5 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da composição do meio de fermentação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*.

Experimentos	**Concentração (g L^{-1})**			**Atividade Específica (U $mg_{proteína}^{-1}$)**
	Lactose	**Extrato de Levedura**	**$(NH_4)_2SO_4$**	
1	70 (-1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)	28,21
2	70 (-1)	2,52 (-1)	10 (+1)	15,16
3	70 (-1)	10 (+1)	2,52 (-1)	24,09
4	70 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	21,44
5	130 (+1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)	35,62
6	130 (+1)	2,52 (-1)	10 (+1)	34,19
7	130 (+1)	10 (+1)	2,52 (-1)	25,03
8	130 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	29,44
9	50 (-α)	6,26 (0)	6,26(0)	28,07
10	150(+α)	6,26 (0)	6,26(0)	32,58
11	100 (0)	0 (-α)	6,26(0)	35,19
12	100 (0)	12,52 (+α)	6,26(0)	28,74
13	100 (0)	6,26(0)	0 (-α)	30,48
14	100 (0)	6,26(0)	12,52 (+α)	24,25
15	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	36,44
16	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	35,81
17	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	35,5

Analisou-se a significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t-Student, em que X_1 representa a concentração de lactose, X_2 a concentração de extrato de levedura e X_3 a concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, neste Delineamento Composto Central, foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações (Tabela 4.6), bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.6 os parâmetros significativos lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas.

Tabela 4.6 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de atividade enzimática específica.

Fatores	**Coeficiente de regressão**	**Erro Padrão**	**p-valor**
Média	36,13228	1,670025	0,000000
X_1 (L)	3,16451	0,787892	0,005083
X_1 (Q)	-2,65798	0,875029	0,018911
X_2 (L)	-1,76253	0,786512	0,059994
X_2 (Q)	-2,04522	0,868798	0,050782
X_3 (L)	-1,70164	0,786512	0,067257
X_3 (Q)	-3,68714	0,868798	0,003822
X_1X_2	-2,18750	1,025606	0,070370
X_1X_3	2,33500	1,025606	0,056912
X_2X_3	2,03000	1,025606	0,088271

Utilizando os resultados, para atividade enzimática específica apresentados, na Tabela 4.6, após a regressão múltipla, obteve a Equação 4.1 com os parâmetros significativos.

$$\text{Atividade específica} = 36,13 + 3,6X_1 - 2,66X_1^2 - 1,76X_2 - 2,05X_2^2 - 1,70X_3 - 3,69X_3^2 - 2,19X_1X_2 + 2,34X_1X_3 + 2,03X_2X_3 \quad (4.1)$$

De acordo com a Equação 4.1 pode ser verificado, por inspeção dos seus coeficientes, que um aumento na concentração de lactose (X_1) influencia positivamente na atividade específica. Já os coeficientes das variáveis, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$, indicam que um aumento nestas concentrações implica negativamente na atividade específica da enzima estudada.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.7, verifica-se que o F_{calc} foi significativo. O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.7.

Tabela 4.7 – ANOVA para a resposta de atividade específica.

Fonte de variação	**Soma de quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	**F_{calc}**	**p - valor**
Regressão	518,956	9	57,66	6,85	0,009460
Resíduos	58,905	7	8,42		
Total	577,861				

$F_T = F_{7;\,9;\,0,1}$=2,72

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos dados experimentais ao modelo foi 0,90 indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. O R^2=0,90 indica que 90 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras 4.6 a 4.8.

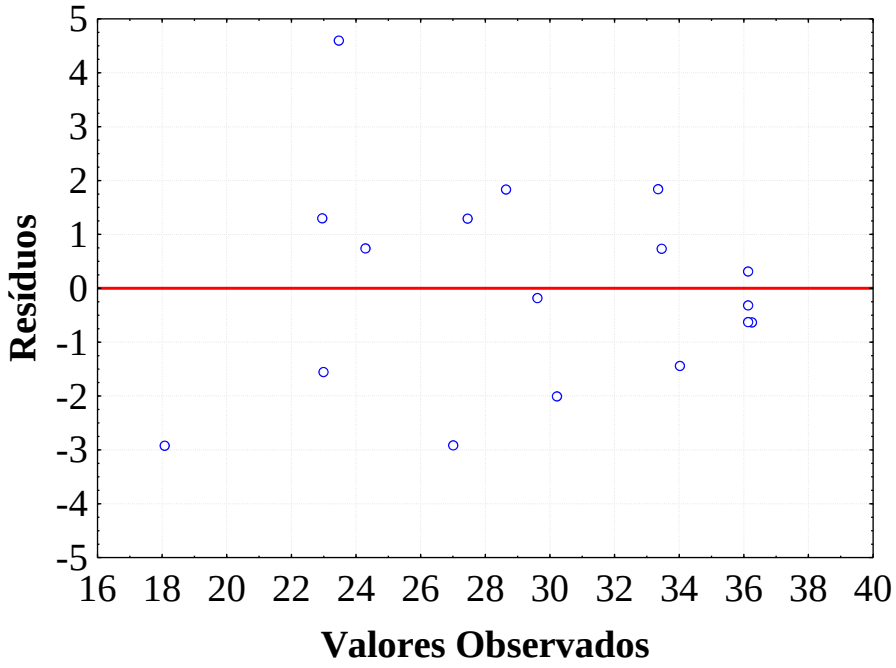


Figura 4.6 – Distribuição de resíduos relativos à atividade enzimática específica.

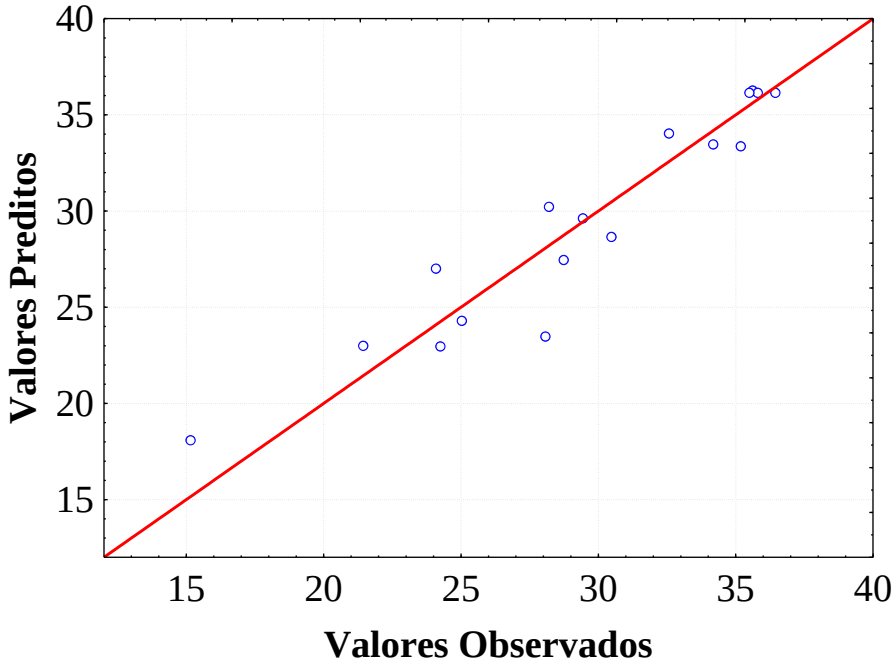


Figura 4.7 – Valores preditos em relação aos observados em relação à atividade enzimática específica.

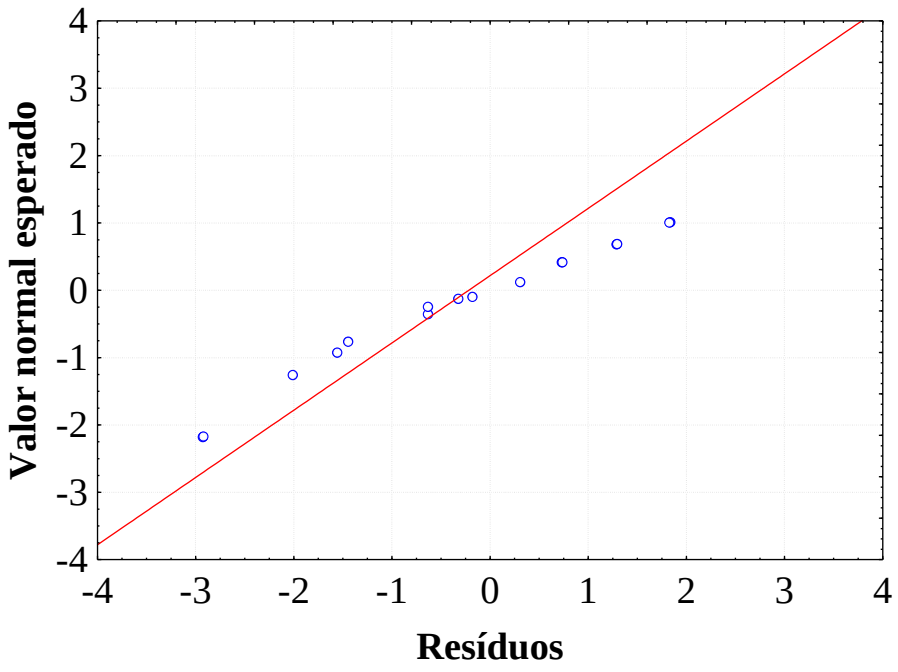


Figura 4.8 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a atividade enzimática específica.

Observando a Figura 4.6, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.7, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática específica apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.1. Os resíduos se mostraram aleatórios, independentes e identicamente distribuídos, com distribuição normal de média zero e variância constante conforme Figura 4.8.

Com o modelo obtido foi possível construir as superfícies de resposta para analisar a influência da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus.* As curvas de contorno para as regiões de interesse estão apresentadas na Figura 4.9.

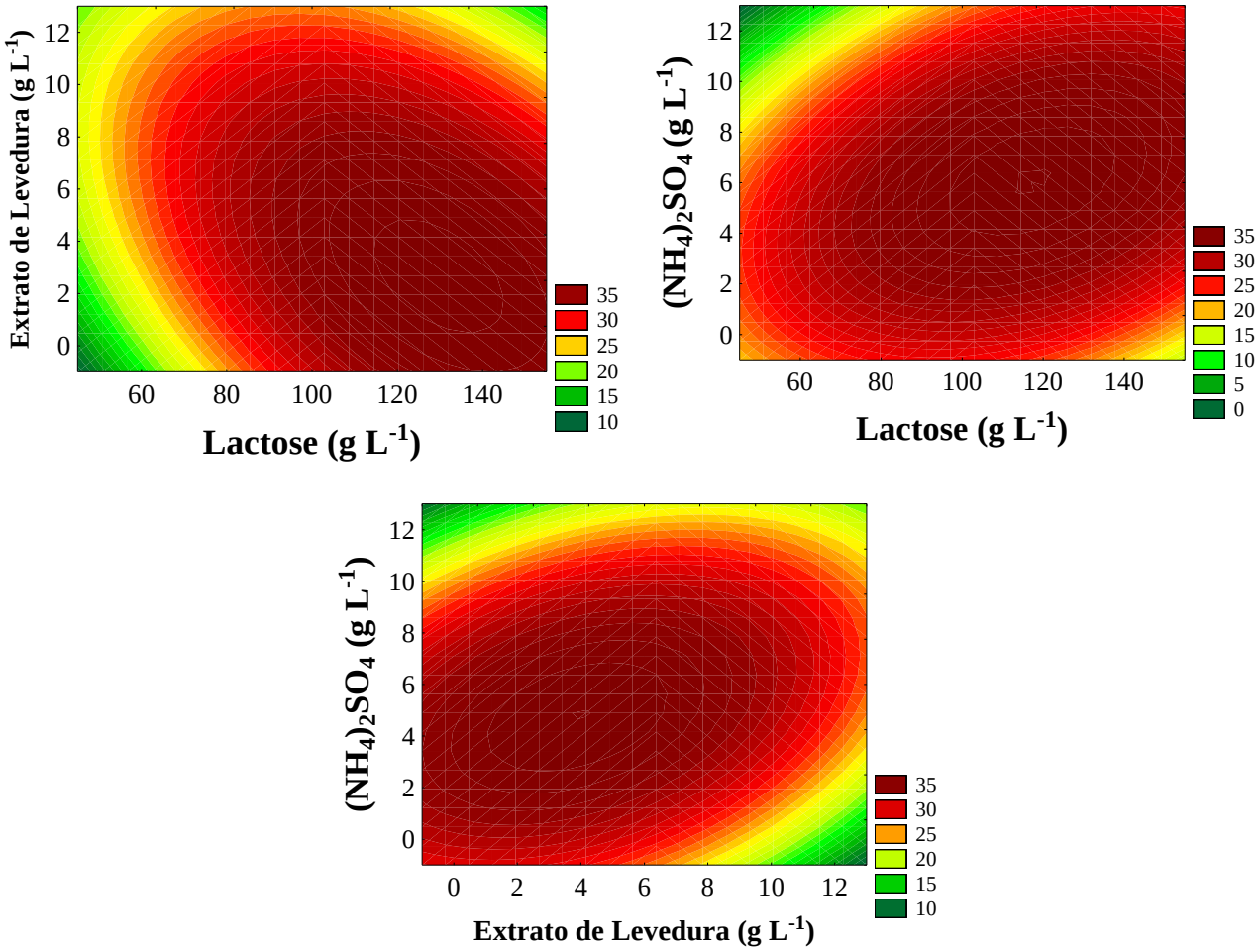


Figura 4.9 – Curvas de contorno da influência da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus*.

Os resultados obtidos para atividade específica da enzima β-galactosidase de *K. marxianus* variaram de 15,00 a 35,19 U $mg_{proteína}^{-1}$. O maior valor observado para atividade específica (35,19 U $mg_{proteína}^{-1}$) foi obtido com 130,0; 2,52 e 10,00 g L^{-1} para as concentrações de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ respectivamente. Pelos gráficos da Figura 4.9 podem ser verificadas regiões ótimas analisando a influência das variáveis estudadas na resposta de atividade específica sendo que os melhores resultados foram alcançados para concentração de lactose variando de 100 a 150 g L^{-1}, concentração de extrato inferior a 6 g L^{-1} e $(NH_4)_2SO_4$ com concentração entre 2 e 8 g L^{-1}.

Um experimento de validação do modelo foi realizado na ausência de extrato de levedura e utilizando 100 e 6,26 g L^{-1} para as concentrações de lactose e $(NH_4)_2SO_4$, respectivamente e obteve-se como resultado 32,66 U $mg_{proteína}^{-1}$ próximo ao valor predito pelo modelo de 37,07 U $mg_{proteína}^{-1}$.

Manera *et* al. (2008) estudaram a influência da composição do meio para a produção de β-galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 e obtiveram como condição ótima concentrações de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ de 28,2, 17,0 e 8,8 g L^{-1} respectivamente, alcançando uma atividade de 10,6 U mL^{-1} nesta condição.

4.5.1 Avaliação da composição do meio fermentativo na Co-Produção de bioetanol

Os resultados apresentados na Tabela 4.8, para a produção de bioetanol a partir da fermentação da lactose proveniente do permeado de soro de leite pela levedura *K. marxianus*, obtidos a partir do Delineamento Composto Central foram analisados estatisticamente.

Analisou-se a significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t-Student, em que X_1 representa a concentração de lactose, X_2 a concentração de extrato de levedura e X_3 a concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Neste Delineamento Composto Central foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações (Tabela 4.9), bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.9 os parâmetros significativos lineares (L), a interação e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas.

Tabela 4.8 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da composição do meio de fermentação na co-produção de bioetanol em pH 7,0.

Experimentos	**Concentração (g L^{-1})**			**Etanol (g L^{-1})**
	Lactose	**Extrato de Levedura**	**$(NH_4)_2SO_4$**	
1	70 (-1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)	22,41
2	70 (-1)	2,52 (-1)	10 (+1)	19,19
3	70 (-1)	10 (+1)	2,52 (-1)	23,89
4	70 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	20,62
5	130 (+1)	2,52 (-1)	2,52 (-1)	35,03
6	130 (+1)	2,52 (-1)	10 (+1)	34,67
7	130 (+1)	10 (+1)	2,52 (-1)	44,46
8	130 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	41,56
9	50 (-α)	6,26 (0)	6,26(0)	24,55
10	150(+α)	6,26 (0)	6,26(0)	48,67
11	100 (0)	0 (-α)	6,26(0)	28,11
12	100 (0)	12,52 (+α)	6,26(0)	33,87
13	100 (0)	6,26(0)	0 (-α)	35,8
14	100 (0)	6,26(0)	12,52 (+α)	28,52
15	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	49,30
16	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	48,82
17	100 (0)	6,26(0)	6,26(0)	50,04

Tabela 4.9 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de rendimento em etanol.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	49,52879	0,976123	0,000000
X_1 (L)	8,10074	0,460520	0,000000
X_1 (Q)	-5,02474	0,511451	0,000004
X_2 (L)	2,12361	0,459713	0,001255
X_2(Q)	-6,98665	0,507808	0,000000
X_3 (L)	-1,61251	0,459713	0,006643
X_3 (Q)	-6,56725	0,507808	0,000000
X_1X_2	1,67625	0,599462	0,020840

Utilizando os resultados para produção de bioetanol apresentados na Tabela 4.8, após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.2 com os parâmetros significativos.

$$\text{Etanol}\left(\text{g L}^{-1}\right) = 49,53 + 8,1\cdot X_1 - 5,03\cdot X_1{}^2 + 2,12\cdot X_2 - 6,99\cdot X_2{}^2 - 1,61\cdot X_3 - 6,57\cdot X_3{}^2 + 1,67\cdot X_1\cdot X_2 \quad (4.2)$$

De acordo com a Equação 4.2 pode ser verificado, por inspeção dos seus coeficientes, que um aumento na concentração de lactose (X_1) influencia positivamente na produção de bioetanol, o mesmo comportamento, contudo menos expressivo, é observado para a variável, extrato de levedura (X_2). Já o coeficiente da variável $(NH_4)_2SO_4$ (X_3) indica que um aumento desta concentração implica negativamente na obtenção de bioetanol.

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos dados experimentais ao modelo foi 0,99 indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. O R^2=0,99 indica que 99% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras 4.10 a 4.12.

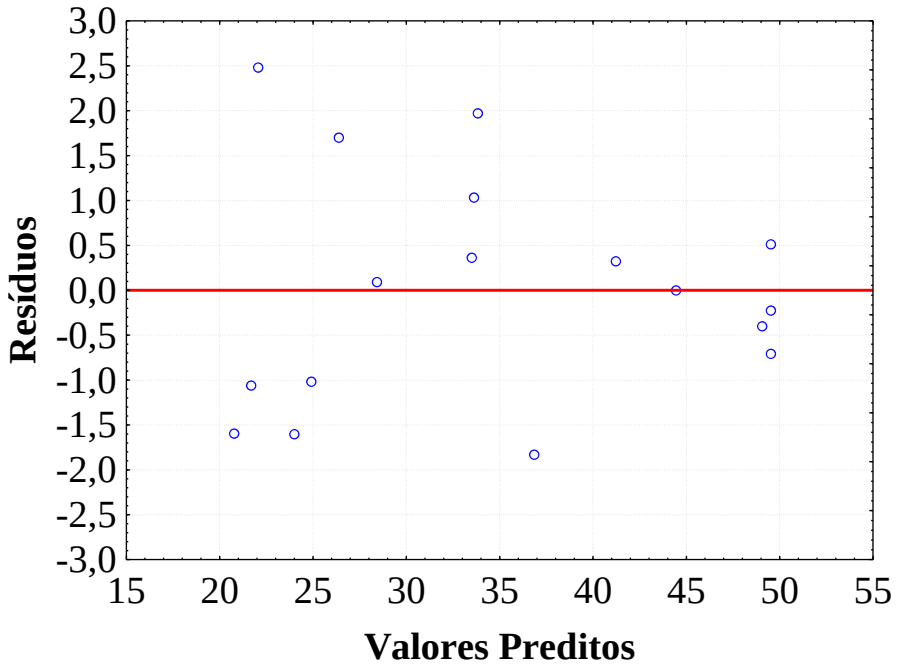


Figura 4.10 – Distribuição de resíduos relativos à produção de bioetanol.

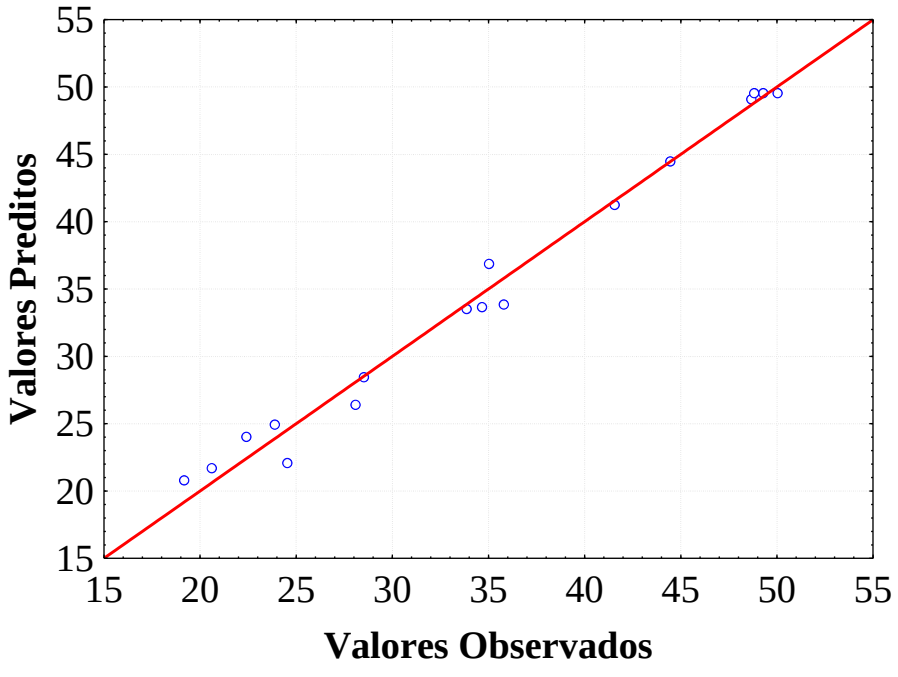


Figura 4.11 – Valores preditos em relação aos observados da produção de bioetanol

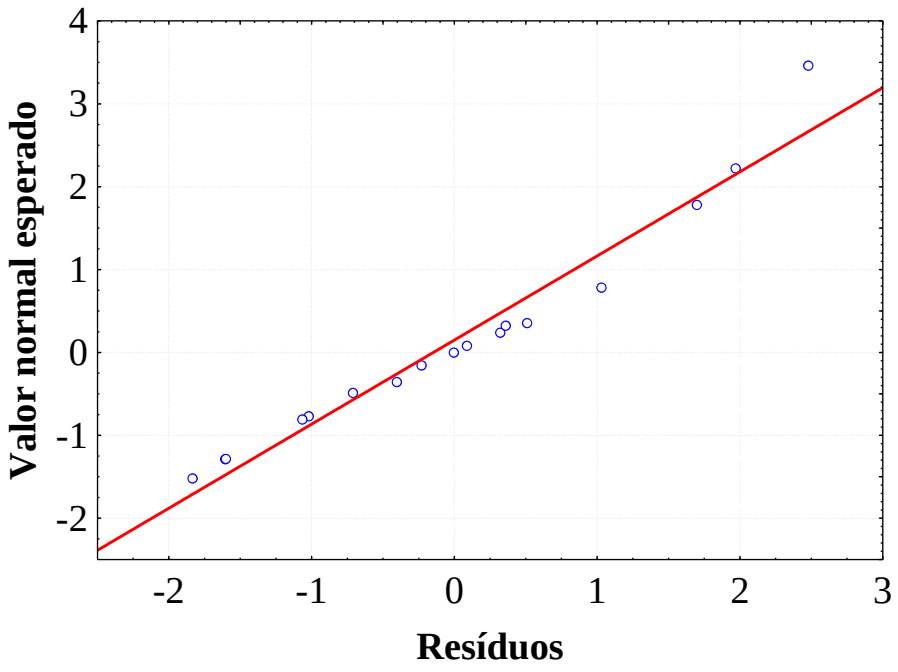


Figura 4.12 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para produção de bioetanol.

Observando a Figura 4.10, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.11, verifica-se que as respostas experimentais obtidas para produção de etanol apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.2.

Os resíduos se mostraram aleatórios, independentes e identicamente distribuídos, com distribuição normal de média zero e variância constante conforme Figura 4.12.

Com o modelo obtido foi possível construir as superfícies de resposta da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na produção de bioetanol a partir da fermentação do permeado de soro de leite pela levedura *K. marxianus* apresentadas na Figura 4.13.

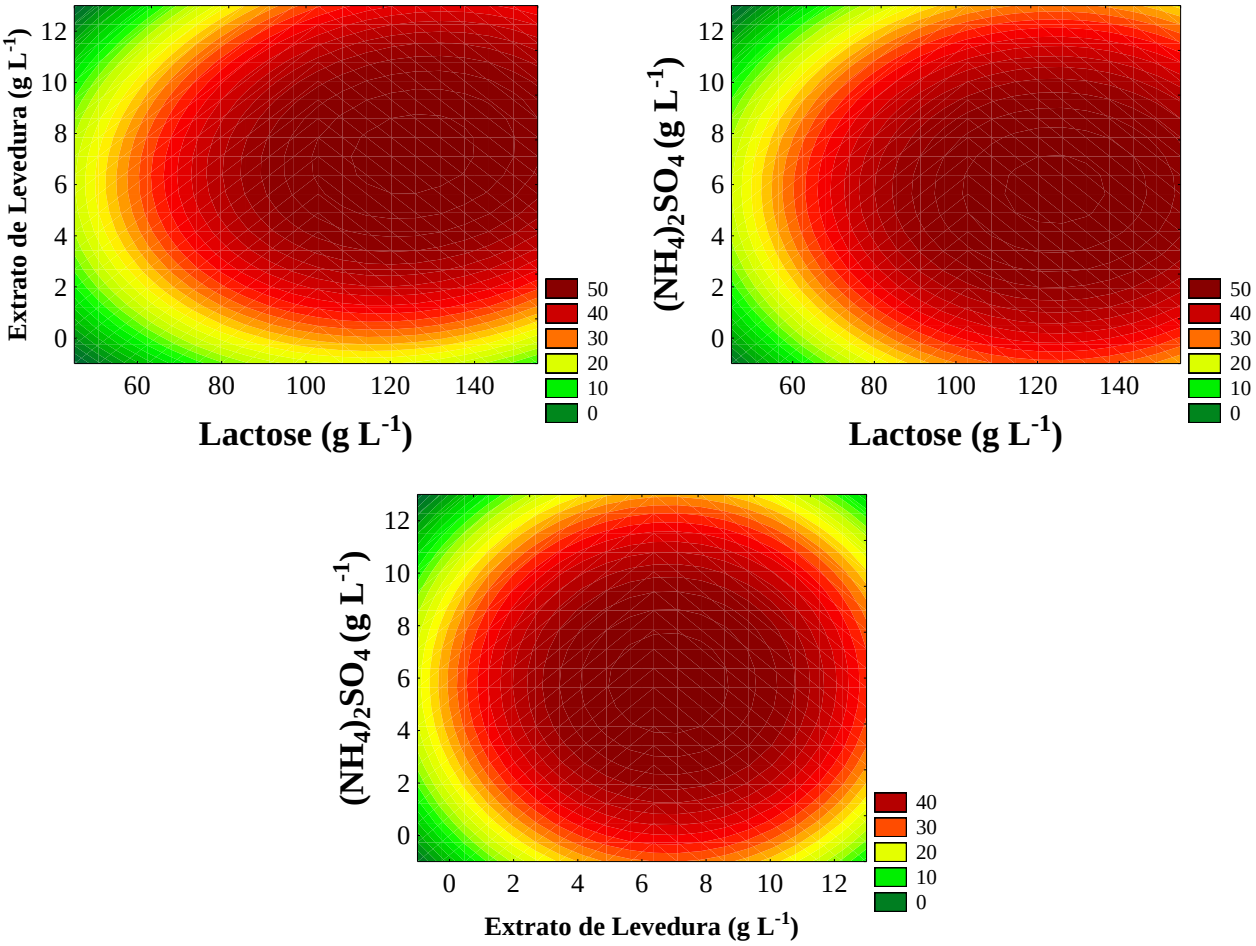


Figura 4.13 – Curvas de contorno da influência da concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ na co-produção de bioetanol em função das variáveis estudadas

Os resultados obtidos para produção de bioetanol a partir da fermentação do permeado de soro de leite utilizando a levedura *K. marxianus* variaram de 19,19 a 48,67 g L^{-1}. O maior valor observado para concentração de bioetanol (48,67 g L^{-1}) foi obtido com 150, 6,26 e 6,26 g L^{-1} para as concentrações de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ respectivamente, o que implica em um rendimento de 63,5 %. Pelos gráficos da Figura 4.13 podem ser verificadas regiões ótimas para produção de bioetanol analisando a influência das variáveis estudadas e os melhores resultados foram alcançados para concentração de lactose variando de 100 a 150 g L^{-1}, concentração de extrato de levedura variando de 4 a 10 g L^{-1} e na faixa de 4 a 8 g L^{-1} para a concentração de $(NH_4)_2SO_4$.

Comparando-se as superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.13 com as curvas de contorno da influência das mesmas variáveis (concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$) na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus* (Figura 4.9)

observa-se que as regiões ótimas para as variáveis em análise são próximas para cada uma das respostas de interesse (atividade enzimática e bioetanol). Para a resposta atividade específica os melhores resultados foram alcançados para concentração de lactose variando de 100 a 150 g L^{-1}, concentração de extrato de levedura inferior a 6 g L^{-1} e $(NH_4)_2SO_4$ com concentração entre 2 e 8 g L^{-1}.

Verifica-se pela análise conjunta das regiões ótimas para as respostas atividade enzimática e produção de etanol que há pequenas faixas das regiões que implicam em altos valores de atividade enzimática e etanol simultaneamente, sendo elas: concentração de lactose de 100 a 150 g L^{-1}, concentração de extrato de levedura entre 4 e 6 g L^{-1} e $(NH_4)_2SO_4$ com concentração entre 4 e 8 g L^{-1}.

As duas condições estudadas para uma maior produção de enzima e de etanol são próximas. Isso provém do fato de que quanto maior a atividade de β-galactosidase, maior a produção de glicose e galactose que são mais facilmente fermentadas a etanol do que a lactose.

Analisando os resultados em relação ao rendimento foi observado, para fermentação submersa utilizando concentração de lactose, extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ iguais a 50, 6,26 e 6,26 g L^{-1}, respectivamente, o rendimento máximo de 96,09 % alcançando uma concentração de bioetanol de 24,55 g L^{-1}. Apesar do alto rendimento, esta condição de fermentação não se apresenta como a melhor alternativa, visto que o fato da concentração de etanol atingir aproximadamente a metade do maior valor observado (48,67 g L^{-1}) pode implicar em elevados custos para recuperação do etanol por destilação, podendo inviabilizar o aproveitamento do permeado de soro de leite para esta finalidade.

Gabardo *et* al. (2014) investigaram a bioconversão de soro de leite e permeado de soro de leite em etanol utilizando diferentes cepas da levedura *K. marxianus*. Para condição de fermentação utilizando permeado de soro de leite para atingir uma concentração de 60 g L^{-1} e concentração de extrato de levedura igual a 3 g L^{-1} os autores obtiveram rendimentos que variaram de 48 a 99 %, alcançando uma concentração de etanol de 30,6 g L^{-1} para a cepa CCT 2653.

4.6 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO VOLUMÉTRICO (K_La)

Os coeficientes de transferência de oxigênio volumétrico (K_La) determinados usando um elétrodo para medição da concentração de oxigênio dissolvido, pelo método de gaseificação para cada combinação de agitação e aeração, na ausência de microrganismos, são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação no coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (K_La)

Agitação (rpm)	**Aeração (vvm)**	**k_La (h^{-1})**
73	0,24	6,3
73	1,26	7,4
427	0,24	25,8
427	1,26	30,5
0	0,75	5,2
500	0,75	33,1
250	0	0,0
250	1,5	15,8
250	0,75	13,4

O coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (K_La) apresentou variação na faixa entre 0 e 33,1 h^{-1}. O maior valor de K_La observado foi obtido quando se utilizou uma velocidade de agitação de 500 rpm e uma taxa de aeração de 0,75 vvm.

Alves *et* al. (2010) estudaram a maximização da produção de β-galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 pela investigação conjunta do efeito da aeração e agitação e obtiveram coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio entre 48,8 e 167,2 h^{-1}.

4.7 INFLUÊNCIA CONJUNTA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Um Delineamento Composto Central foi utilizado para investigar a influência conjunta da taxa de aeração e velocidade de agitação na atividade enzimática volumétrica da β-galactosidase de *K. marxianus*. Os resultados obtidos para este Delineamento estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*

Experimentos	**Agitação (rpm)**	**Aeração (vvm)**	**Atividade Enzimática (U mL_{caldo}^{-1})**
1	-1 (73)	-1 (0,24)	94,24
2	-1 (73)	1 (1,26)	112,10
3	1 (427)	-1(0,24)	113,34
4	1 (427)	1 (1,26)	128,28
5	-α (0)	0 (0,75)	83,60
6	+α (500)	0 (0,75)	110,93
7	0 (250)	-α (0,00)	96,04
8	0 (250)	+α (1,50)	125,16
9	0 (250)	0 (0,75)	129,44
10	0 (250)	0 (0,75)	132,26
11	0 (250)	0 (0,75)	139,58

Analisou-se a significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t-Student, em que X_1 representa a agitação, X_2 a aeração. Neste Delineamento Composto Central foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações (Tabela 4.12), bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.12 os parâmetros significativos lineares (L) e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.12 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de atividade enzimática específica.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	133,9414	3,096094	0,000000
X_1 (L)	9,2469	3,796048	0,002789
X_1 (Q)	-16,5031	4,549736	0,000349
X_2 (L)	9,0836	3,718808	0,002752
X_2 (Q)	-9,1921	4,250638	0,004955

Utilizando os resultados para atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado apresentados na Tabela 4.11, após a regressão múltipla, obteve a Equação 4.3 com os parâmetros significativos.

$$\text{Atividade enzimática volumétrica} = 133,94 + 9,25X_1 - 16,50X_1^2 + 9,08X_2 - 9,19X_2^2 \qquad (4.3)$$

Por inspeção dos coeficientes da Equação 4.3 pode ser verificado que um aumento na agitação (X_1) e na aeração (X_2) implica em um aumento da atividade enzimática volumétrica.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.13, verifica-se que o F_{calc} foi significativo. O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.15.

Tabela 4.13 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática volumétrica.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p - valor
Regressão	3021,629	4	755,407	26,24	0,000607
Resíduos	172,702	6	28,784		
Total	3194,331				

$F_T = F_{4;\,6;\,0,10}$=3,18

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos dados experimentais ao modelo foi 0,95 indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. O R^2=0,95 indica que 95% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras 4.14 a 4.16.

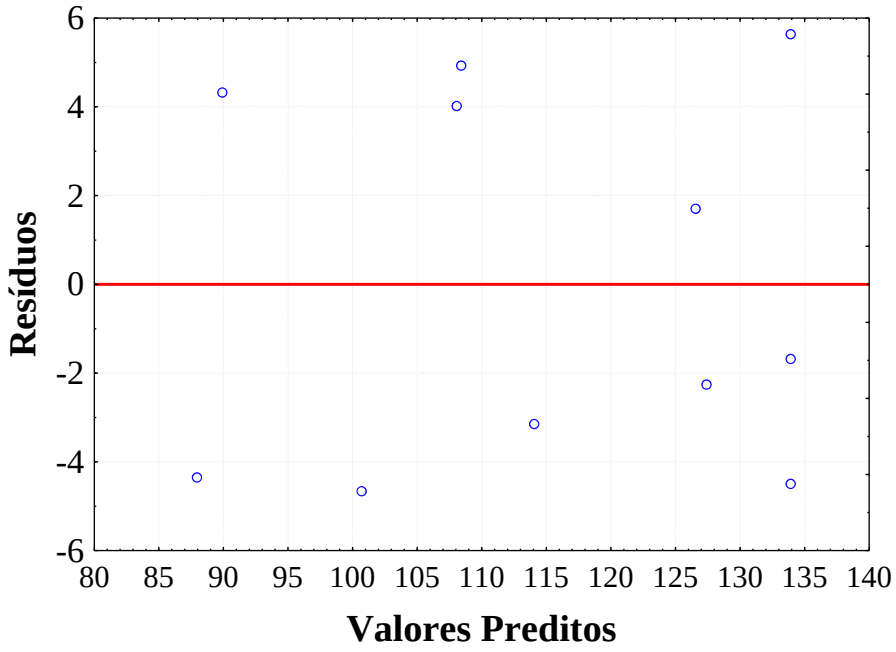


Figura 4.14 – Distribuição de resíduos relativos à atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado

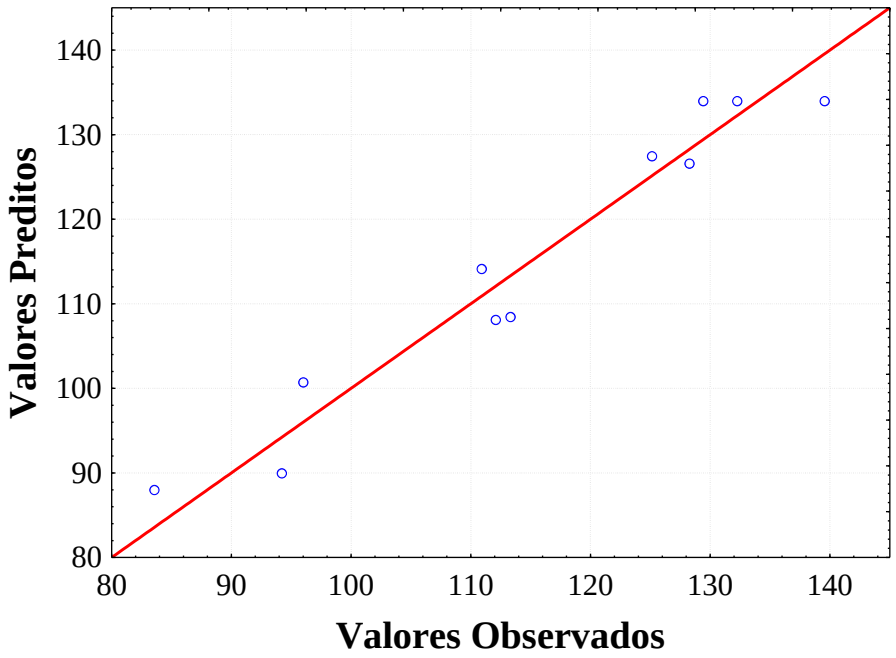


Figura 4.15 – Valores preditos em relação aos observados relativos à atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado.

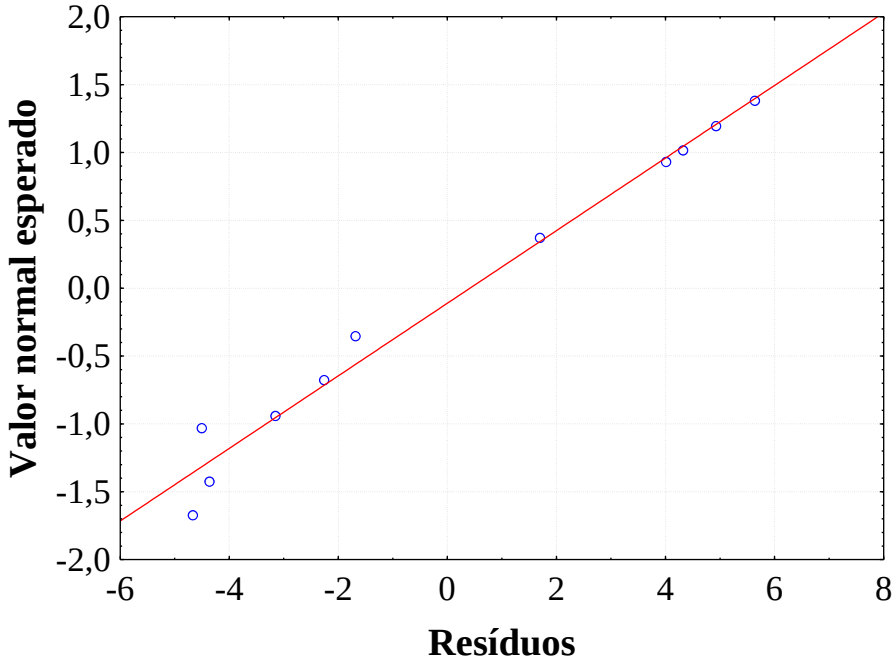


Figura 4.16 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a atividade enzimática volumétrica.

Pode ser visualizado na Figura 4.14 que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Pela análise da Figura 4.15 observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática volumétrica apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.3.

Os resíduos se mostraram aleatórios, independentes e identicamente distribuídos, com distribuição normal de média zero e variância constante conforme Figura 4.16.

Com o modelo obtido foi possível construir a curva de contorno (Figura 4.17) para analisar a influência conjunta da aeração e agitação na atividade enzimática volumétrica de β-galactosidase de *K. marxianus*.

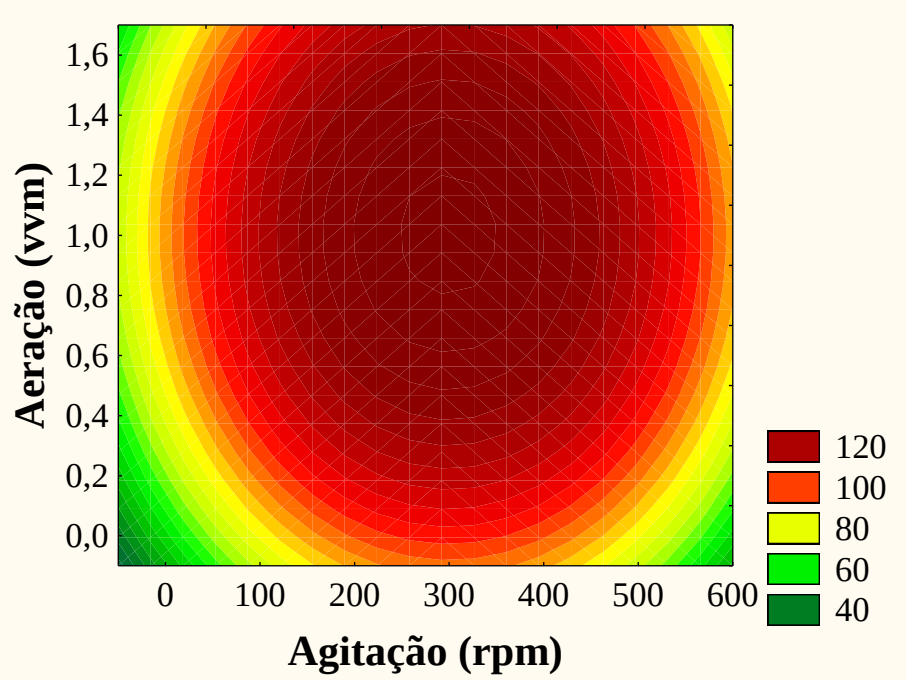


Figura 4.17 – Curva de contorno da influência da agitação e aeração na atividade volumétrica da enzima β-galactosidase de *K. marxianus*.

A atividade enzimática de β-galactosidase de *K. marxianus* por mililitro de caldo fermentado variou de 83,60 a 139,58 U mL_{caldo}^{-1}. O maior valor observado foi obtido no ponto central (250 rpm e 0,75 vvm). Pela análise da Figura 4.17 verifica-se que os melhores resultados para atividade enzimática volumétrica foram alcançados para a velocidade de agitação entre 200 e 400 rpm e a taxa de aeração variando de 0,6 a 1,4 vvm.

Um experimento de validação do modelo foi realizado utilizando velocidade de agitação de 300 rpm e taxa de aeração de 1 vvm e obteve-se como resultado 125 U mL_{caldo}^{-1} representando um erro de 8,65 % em relação ao valor predito pelo modelo.

Pelos resultados apresentados para influência conjunta da velocidade de agitação e taxa de aeração no coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (K_La) e na atividade enzimática verifica-se que estas variáveis (aeração e agitação) afetam de forma diferente o K_La e a atividade enzimática.

Schneider *et* al. (2001) estudaram a produção de β-galactosidase de *K. marxianus* e não observaram uma proporcionalidade entre K_La e atividade enzimática. Neste estudo os autores obtiveram um aumento na atividade enzimática de 22 para 33 U mL^{-1} empregando combinações de agitação (rpm) e aeração (vvm) de 500/2,0 e 700/0,66, mantendo o coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico constante em aproximadamente 60 h^{-1}.

4.7.1 Influência conjunta da aeração e agitação na co-produção de bioetanol

A partir do Delineamento Composto Central foi-investigado a influência conjunta da taxa de aeração e velocidade de agitação na co-produção de bioetanol por fermentação submersa utilizando a levedura *K. marxianus*. As fermentações foram realizadas na ausência de extrato de levedura e concentrações de lactose e $(NH_4)_2SO_4$ iguais a 100,0 e 6,26 g L^{-1}, respectivamente. Os resultados obtidos para este Delineamento estão apresentados na Tabela 4.14.

Analisou-se a significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t-Student, em que X_1 representa a agitação, X_2 a aeração. Neste Delineamento Composto Central foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações (Tabela 4.15), bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.15 os parâmetros significativos lineares (L) as interações e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.14 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da aeração e agitação na produção de β-galactosidase de *K. marxianus*

Experimentos	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Etanol (g L^{-1})
1	-1 (73)	-1 (0,24)	32,73
2	-1 (73)	1 (1,26)	33,92
3	1 (427)	-1(0,24)	36,94
4	1 (427)	1 (1,26)	32,15
5	-α (0)	0 (0,75)	32,35
6	+α (500)	0 (0,75)	34,02
7	0 (250)	-α (0,00)	35,17
8	0 (250)	+α (1,50)	33,31
9	0 (250)	0 (0,75)	36,48
10	0 (250)	0 (0,75)	36,24
11	0 (250)	0 (0,75)	36,4

Tabela 4.15 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao DCC sobre o resultado de produção de bioetanol.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	36,3770	0,1221	0,000000
X_1 (L)	0,6006	0,1497	0,000485
X_1 (Q)	-1,5620	0,1794	0,000011
X_2 (L)	-0,7610	0,1466	0,000143
X_2 (Q)	-0,9558	0,1676	0,000091
X_1 X_2	-1,4950	0,2115	0,000032

Utilizando os resultados para produção de bioetanol apresentados na Tabela 4.14, após a regressão múltipla, obteve a Equação 4.4 com os parâmetros significativos.

$$\text{Etanol (g L}^{-1}) = 36,37 + 0,60X_1 - 1,56X_1^2 - 0,76X_2 - 0,96X_2^2 - 1,50X_1X_2 \qquad (4.4)$$

Por inspeção dos coeficientes da Equação 4.4 pode ser verificado que um aumento na velocidade de agitação (X_1) implica em maiores produção de bioetanol, quando que um acréscimo na taxa de aeração (X_2) implica em uma diminuição da produção de bioetanol.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.16, verifica-se que o F_{calc} foi significativo. O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10 %. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.19.

Tabela 4.16 – ANOVA para a resposta produção de etanol.

Fonte de variação	**Soma de quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	**F_{calc}**	**p - valor**
Regressão	31,993	5	6,3986	143,15	0,000022
Resíduos	0,224	5	0,0447		
Total	32,217				

$F_T = F_{5;\ 5;\ 0,10}$=3,45

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos dados experimentais ao modelo foi 0,99 indicando uma excelente concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. O R^2=0,99 indica que 99% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras 4.18 a 4.20.

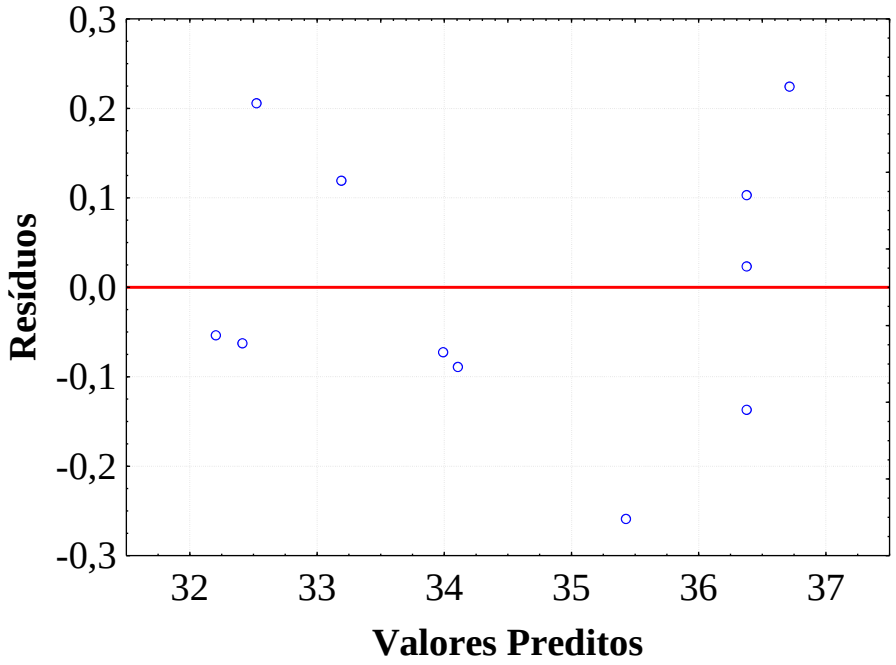


Figura 4.18 – Distribuição de resíduos relativos à produção de bioetanol

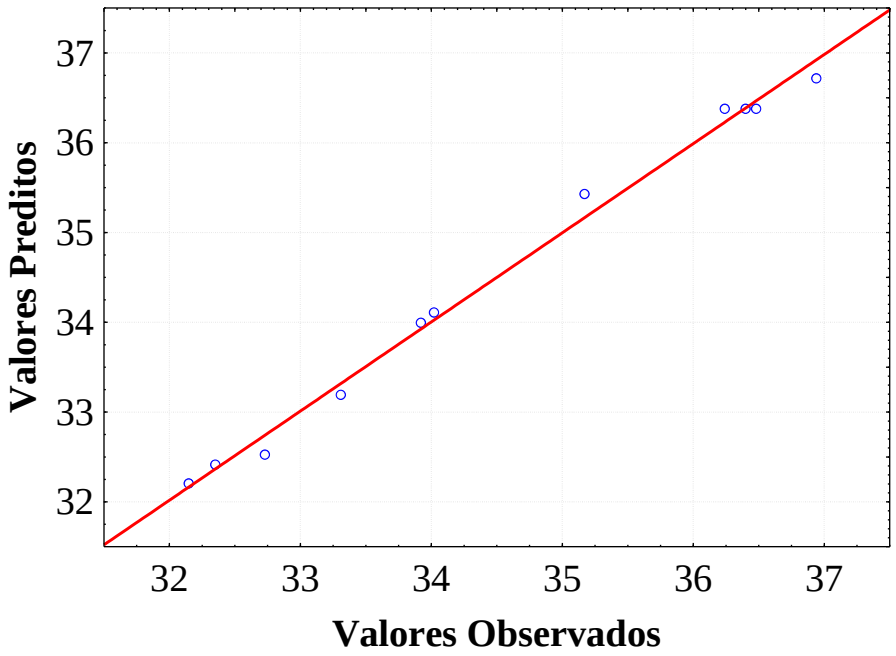


Figura 4.19 – Valores preditos em relação aos observados relativos à produção de bioetanol.

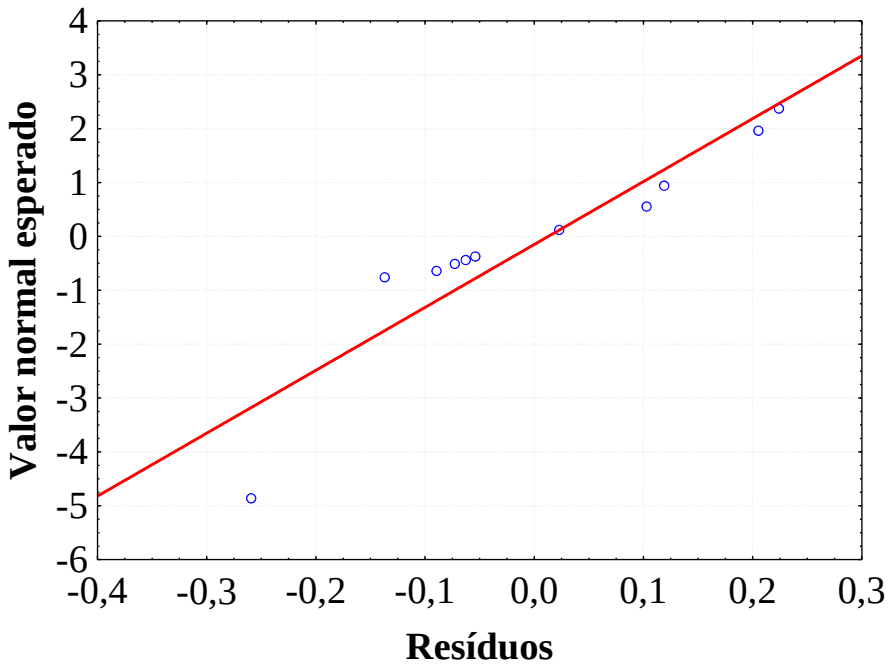


Figura 4.20 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a produção de bioetanol.

Pode ser visualizado na Figura 4.18 que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Pela análise da Figura 4.19 observa-se que as respostas experimentais obtidas para produção de etanol apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.4.

Os resíduos se mostraram aleatórios, independentes e identicamente distribuídos, com distribuição normal de média zero e variância constante conforme Figura 4.20.

Com o modelo obtido foi possível construir a curva de contorno (Figura 4.21) para analisar a influência conjunta da aeração e agitação na produção de bioetanol a partir de fermentação de permeado de soro de leite utilizando a levedura *K. marxianus*.

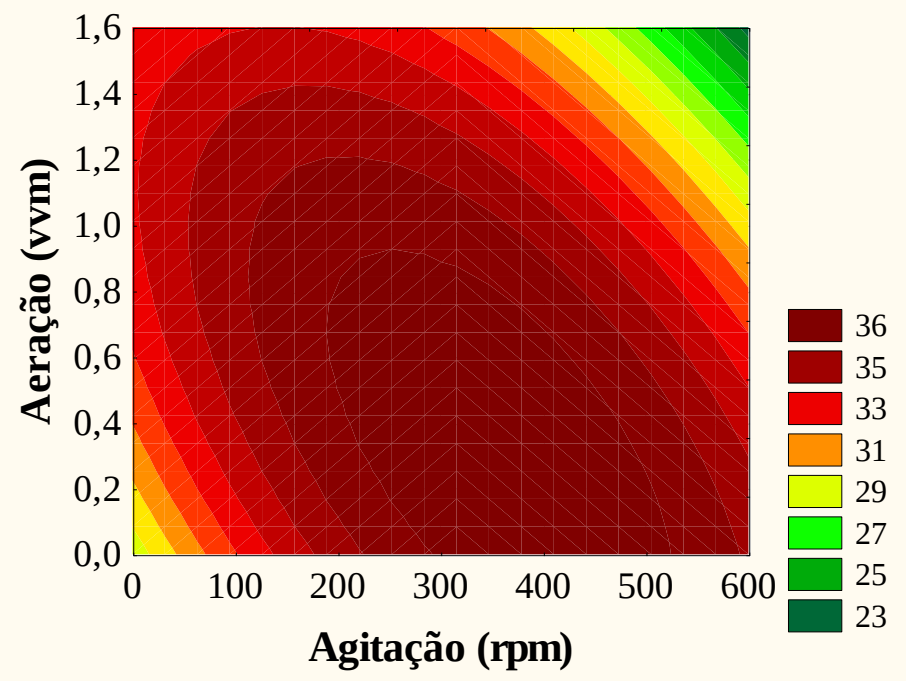


Figura 4.21 – Curva de contorno da influência da agitação e aeração na produção de bioetanol a partir de fermentação de permeado de soro de leite utilizando a levedura *K. marxianus*.

A concentração final de bioetanol variou de 32,15 a 36,94 g L^{-1}. O maior valor observado para concentração de bioetanol (36,94 g L^{-1}) foi obtido na fermentação em que se utilizou velocidade de agitação de 427 rpm e taxa de aeração de 0,24 vvm, o que implica em um rendimento de 72,3%. Pela análise da Figura 4.21 verifica-se que os melhores resultados para co-produção de etanol foram alcançados para velocidades de agitação acima de 150 rpm e taxa de aeração inferior a 1,2 vvm. Dentro da faixa avaliada as variáveis agitação e aeração apresentaram pouca influência na produção de etanol.

O experimento de validação do modelo realizado utilizando velocidade de agitação de 300 rpm e taxa de aeração de 1 vvm resultou em 35,32 g L^{-1} de bioetanol representando um erro de 2,88% em relação ao valor predito pelo modelo (36,37 g L^{-1}).

Comparando-se a curva de contorno da influência da agitação e aeração na produção de bioetanol a partir de fermentação de permeado de soro de leite utilizando a levedura *K. marxianus* (Figura 4.21) com a curva de contorno obtida para o estudo da influência das mesmas variáveis (aeração e agitação) na atividade específica de β-galactosidase de *K. marxianus* (Figura 4.17) observa-se que as regiões ótimas para as variáveis em análise são próximas para cada uma das respostas de interesse (atividade enzimática e bioetanol). Para a

resposta atividade específica os melhores resultados foram alcançados para velocidade de agitação entre 200 e 400 rpm e taxa de aeração variando de 0,6 a 1,4 vvm.

Verifica-se pela análise conjunta das regiões ótimas para as respostas atividade enzimática e produção de etanol que há faixas das regiões que implicam em altos valores de atividade enzimática e etanol simultaneamente, sendo elas: velocidade de agitação de 200 a 400 rpm com taxa de aeração entre 0,4 a 1,2 vvm.

As duas condições estudadas para uma maior produção de enzima e de etanol são próximas. Isso provém do fato de que quanto maior a atividade de β-galactosidase, maior a produção de glicose e galactose que são mais facilmente fermentadas a etanol do que a lactose.

Trigueros *et* al. (2016) realizaram uma otimização do meio e modelagem cinética para a fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado como um substrato para a levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Para hidrólise do permeado de soro de queijo estes autores utilizaram a enzima β-galactosidase comercial (Lactozym Pure® 6500 L, Novozymes). Os autores obtiveram, por simulação do modelo cinético, uma concentração de etanol máxima igual a 35 g L^{-1} para fermentação na qual utilizou-se 175 g L^{-1} de permeado de soro de queijo hidrolisado.

Parashar *et* al. (2016) estudaram a utilização do permeado do soro de leite como substituto para água de processo e co-substrato em fermentações de trigo em etanol e obtiveram sucesso. Segundo os autores este é o primeiro estudo que demonstrou o potencial de integral resíduos laticínios em fermentação de grãos.

4.8 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE β-GALACTOSIDASE A PARTIR DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

As Figuras 4.21 a 4.23 mostram os resultados médios referentes à cinética (atividade da enzima, biomassa, pH, oxigênio dissolvido, lactose e etanol) de fermentação realizada em triplicata, utilizando as condições maximizadas (300 rpm e 1,0 vvm) na produção de β-galactosidase a partir de *K. marxianus* ATCC 46537. Nesta condição maximizada, foi obtido aproximadamente 125 U mL_{caldo}^{-1} para atividade enzimática e uma concentração de célula de 20 g L^{-1}.

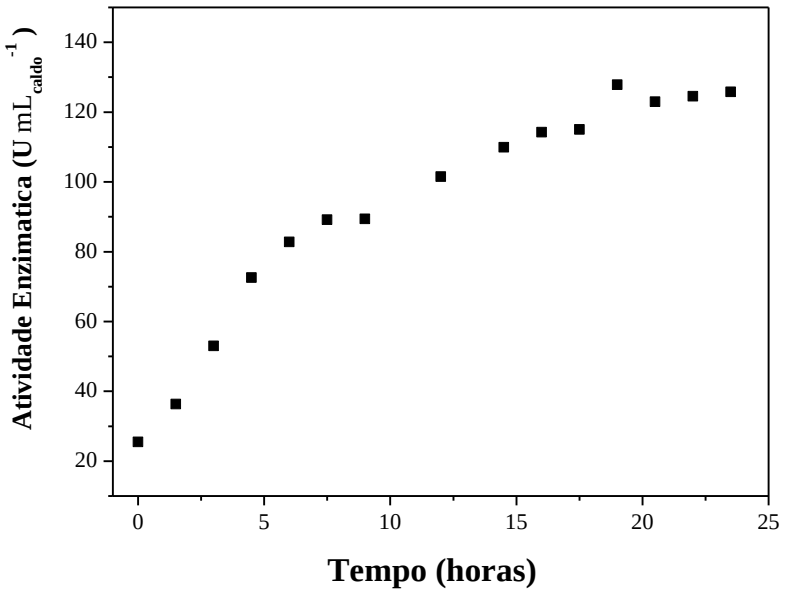


Figura 4.21 – Perfil de atividade enzimática durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus*.

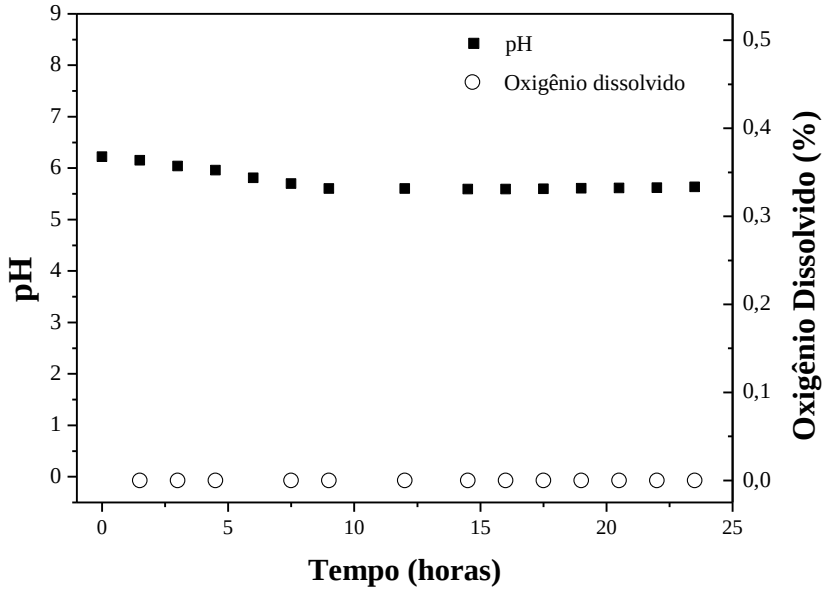


Figura 4.22 – Variação do pH e oxigênio dissolvido durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus*.

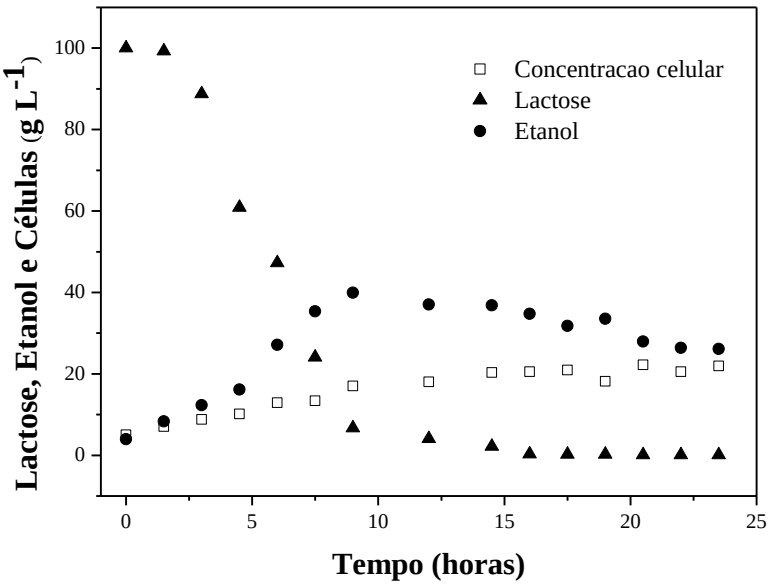


Figura 4.23 – Perfil de concentração de lactose, etanol e biomassa durante fermentação cinética nas condições otimizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β-galactosidase de *K. marxianus.*

Verifica-se pela análise da Figura 4.21 que a atividade enzimática por mililitro de caldo fermentado alcança aproximadamente 125 U mL_{caldo}^{-1} após 19 horas de fermentação, mantendo-se nesta patamar até 24 horas. Os resultados apresentados na Figura 4.22 mostram a manutenção do pH do meio em torno de 6,0 e a concentração de oxigênio dissolvido a 0 %. Esta última observação indica uma alta taxa de respiração celular e que o crescimento celular tenha sido limitado pelo consumo de O_2.

A Figura 4.23 mostra o perfil do consumo de substrato (lactose) e a produção de etanol e massa celular. Observa-se que após 15 horas de fermentação, já havia ocorrido o completo consumo da lactose e por consequencia a ausência de açúcar residual. A produção de etanol atingiu o seu máximo, aproximadamente 40 g L^{-1} após 9 horas de fermentação, e após este tempo foi observado um pequeno declínio da concentração de etanol no meio fermentado, que pode estar associado à volatilidade do mesmo.

O crescimento celular, cujo perfil pode ser observado na Figura 4.23, atingiu aproximadamente 20 g L^{-1} após 15 horas de fermentação, mantendo-se neste patamar até o final da fermentação (24 horas). Estes resultados indicam que o crescimento celular pode estar associado ao consumo de lactose.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

4.9.1 Determinação das constantes cinéticas

Os resultados experimentais das velocidades iniciais de reação de hidrólise da lactose (V) para a enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537, em função da concentração inicial de substrato e na ausência de produtos da reação, estão apresentados na Tabela 4.14.

Verifica-se (Tabela 4.17) que após o experimento 4, em que iniciou-se a reação com concentração de 50 g L^{-1} de lactose, não houve acréscimo na atividade, mantendo-se constante conforme Figura 4.14. Posteriormente, foi realizado uma regressão não linear pelo software *Statistica* 7.0, utilizando o método numérico Levenberg-Marquardt, com o qual estimaram-se os valores das constantes $V_{máx}$ e K_m que foram respectivamente 11,01 U mL^{-1} e 3,62 g L^{-1} (10,58 mM). Os dois parâmetros mostraram-se significativos ao nível de 5% (valor-p<0,05).

Tabela 4.17 – Atividade enzimática (V) em função da concentração inicial de lactose (S).

Experimentos	**Concentração inicial de lactose (g L^{-1})**	**Atividade enzimática (U mL^{-1})**
1	5	5,89
2	10	8,44
3	20	9,14
4	30	10,44
5	50	10,89
6	60	10,28
7	80	10,44
8	110	10,67
9	140	9,89

Na Figura 4.24, observa-se boa aproximação dos pontos experimentais com o ajustado pelo modelo de Michaelis-Menten, em que foi obtido um coeficiente de determinação de 98%.

Neste intervalo de estudo, não foi verificado inibição pelo substrato. A Equação final de Michaelis-Menten está representada na Equação 4.5.

$$V = \frac{11,01 \cdot S}{3,62 + S} \tag{4.5}$$

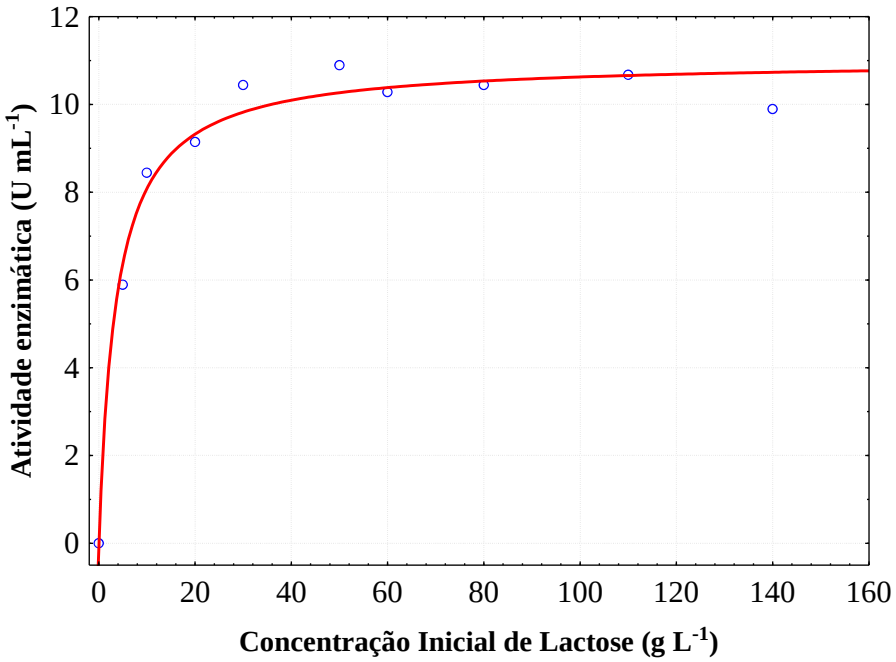


Figura 4.24 – Influência da concentração de lactose (S) na velocidade inicial da reação da enzima β-galactosidase de *K. marxianus*.

A Figura 4.25 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados.

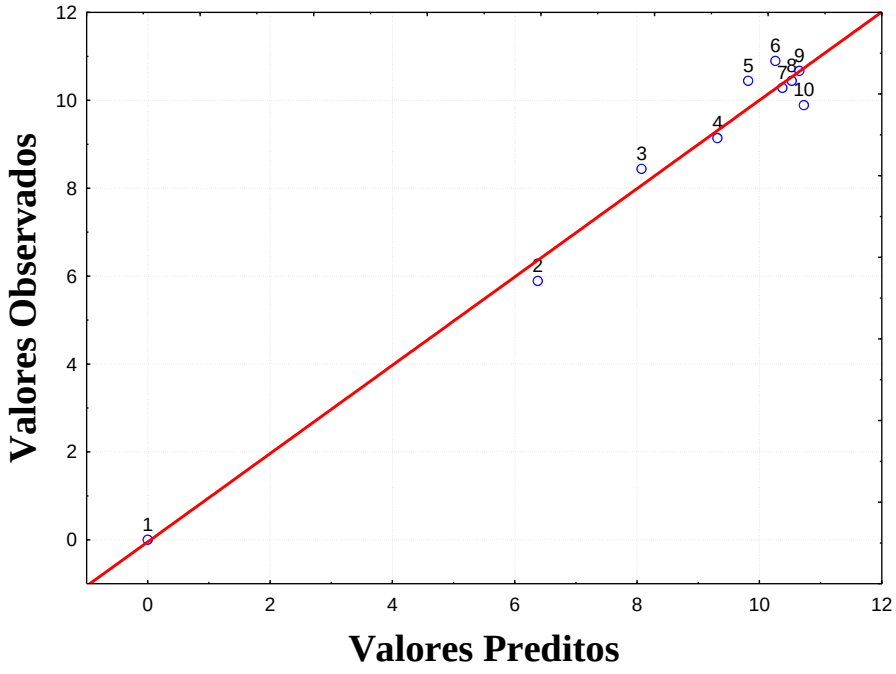


Figura 4.25 – Valores preditos em função dos valores observados.

Observando a Figura 4.25, observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Segundo Whitaker (1994), quanto menor o valor de K_m maior a afinidade do catalisador pelo substrato. Alves *et* al. (2008) realizaram a caracterização da enzima β-galactosidase bruta obtida de *K. marxianus* CCT 7082 e obtiveram valores de K_m de 15,1 mM e $V_{máx}$ de 18,9 U mL^{-1}. Ao se compararem esses dados aos obtidos no presente estudo, verifica-se que o K_m da enzima bruta obtida de *K. marxianus* CCT 7082 foi aproximadamente 43% maior àquele obtido quando se utilizou a enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537, portanto, a enzima proveniente da cepa ATCC 46537 apresentou maior afinidade pelo substrato do que a enzima obtida de *K. marxianus* CCT 7082.

Song *et* al. (2010) encontraram valor de K_m para β-galactosidase de *Guehomyces pullulans* 17-1 purificada por cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca de cátions de 3,3 mM.

Heidtmann *et* al. (2012) caracterizaram a enzima β-galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio e obtiveram os valores das constantes $V_{máx}$ e K_m iguais a 99,0 U mL^{-1} e 3,7 mM respectivamente. A unidade U foi definida pelos autores como

a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de o-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

4.9.2 Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase

A influência da temperatura na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi estudada conforme o item 3.8.2. Os resultados das atividades enzimáticas em função das temperaturas estudadas estão ilustrados na Figura 4.26.

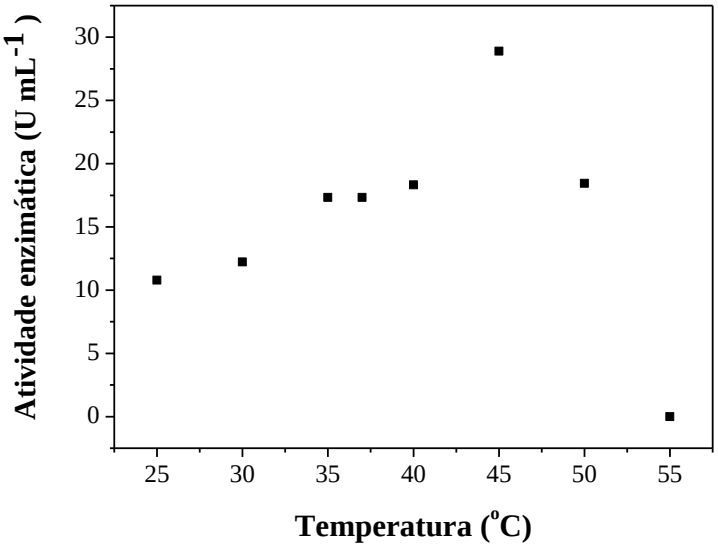


Figura 4.26 – Influência da temperatura na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 em tampão lático pH 6,5.

A enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 apresentou maior atividade na temperatura de 45 ºC. Como a enzima não é altamente purificada pode haver mais de uma proteína com atividade e com temperatura ótimas diferentes, explicando o perfil de temperatura da Figura 4.26.

Segundo Alves *et* al., (2008), uma maior atividade enzimática para β-galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 bruta foi alcançada a 37 °C. Assim, a enzima β-galactosidase produzida no presente trabalho pela fermentação, utilizando a levedura *K marxianus* ATCC 46537, apresentou maior atividade a uma temperatura mais elevada (45 °C) quando comparada à mesma enzima, porém de outra linhagem. O processo de produção e extração pode ter removido do meio, proteases ou contaminantes que poderiam conduzir a uma maior

desnaturação ou uma inibição em temperaturas acima de 37 °C, obtendo-se, assim, alta atividade em temperaturas mais elevadas.

Brady *et* al. (1995) estudaram o efeito da temperatura e do pH na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* IMB3 durante o crescimento em meio contendo lactose e também verificaram maior atividade entre 45 e 50 °C, na faixa das temperaturas estudadas (20-60 °C) e notaram um decréscimo de atividade fora dessa faixa de temperatura. Tomaska *et* al. (1995) estudaram a influência da temperatura na atividade para a mesma enzima, porém proveniente de *K. marxianus* CCY e SY2, e obtiveram temperaturas ótimas entre 50 e 52 °C, respectivamente.

Rhimi *et* al. (2010) estudaram a influência da temperatura na faixa de (4-50 °C) e o pH (4-8,5) para β-galactosidase de *Streptococcus thermophilus* LMD9, e encontraram, respectivamente, faixas de 25-40 °C e 6,5-7,5. Song *et* al. (2010), estudando as condições ótimas para β-galactosidase de *Guehomyces pullulans* 17-1 purificada, obtiveram temperatura ótima de 50 °C e pH ótimo em tampão citrato 100 mM de 4,0.

Heidtmann *et* al. (2012) caracterizaram a enzima β-galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082, fracionada com sulfato de amônio, e obtiveram temperatura ótima entre 45 e 50 °C.

4.9.3 Influência do pH na atividade enzimática

O estudo da influência do pH na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi realizado conforme o item 3.8.3. Os resultados das atividades enzimáticas em função dos valores de pH estudados estão ilustrados na Figura 4.27.

O extrato enzimático produzido pela levedura *K. marxianus* ATCC 46537 apresentou altos valores de atividade relativa em tampão lático na faixa de pH de 5,5 a 7,3, indicando a possibilidade de aplicação desta enzima para hidrólise em valores de pH próximos a neutralidade.

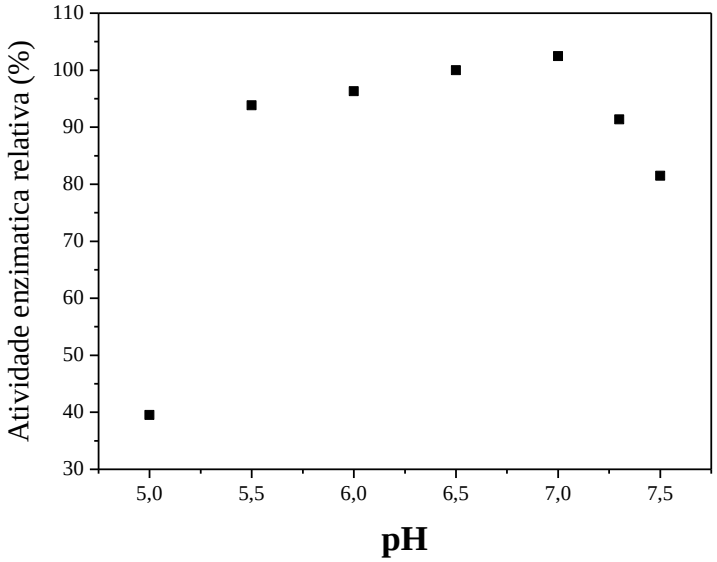


Figura 4.27 – Influência do pH na atividade de β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537.

Heidtmann *et* al. (2012) estudaram a influência do pH na atividade *K. marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio a 37 °C, testando a variação de pH em diferentes tampões: acetato de sódio (pH 5,0; 5,6), citrato de sódio (pH 5,6; 6,0), tris-HCl (pH 7,3; 7,6) e fosfato de sódio (pH 6,6; 7,0; 7,3) e observaram que o tampão fosfato de sódio proporcionou maior atividade enzimática, tanto para a enzima fracionada com sulfato de amônio (pH 7,0), como no estudo para a mesma enzima, bruta, de Alves et al., (2008) (pH 6,6).

Os valores ótimos de pH obtidos para a β-galactosidase produzida no presente trabalho coadunam com a literatura em que são reportados valores de pH ótimos na faixa de 6,0-7,3 para enzimas obtidas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; JURADO et al., 2002).

4.9.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 12,5% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (1970) e o gel obtido apresentado

na Figura 4.28 mostra os resultados obtidos para seis amostras obtidas por diferentes tratamentos.

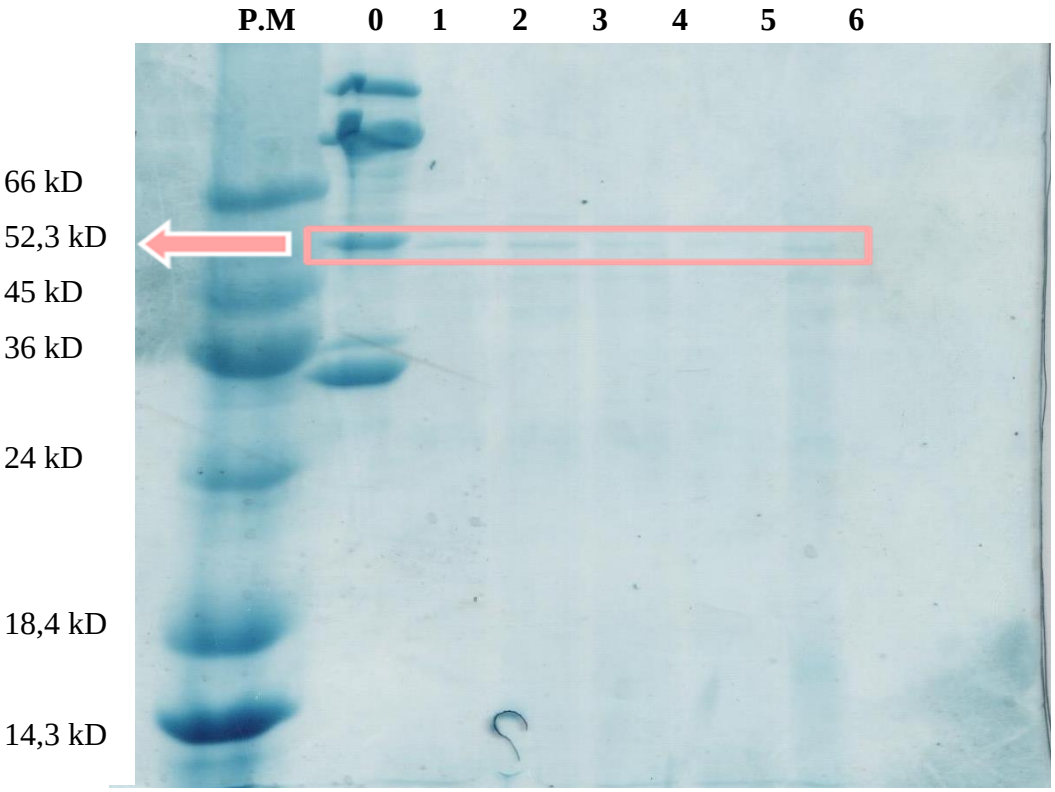


Figura 4.28 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para amostras obtidas por diferentes tratamentos. P.M, padrão de massa molecular 7L (Sigma); Faixa 0, Lactozyme® 2600; Faixas 1 a 6, extratos enzimáticos produzidos conforme item 3.8.4.

O resultado da eletroforese apresentado na Figura 4.28 mostra que para as Amostras 1 a 5, preparada em tampão fosfato de sódio pH 7,3, independemente dos tratamentos aplicados, foi obtido uma subunidade de massa molecular de aproximadamente 52,3 kDa coincidente com a amostra de referência (Amostra 0 - Lactozyme® 2600), indicando a presença de subunidades da enzima no extrato produzido no presente trabalho.

Segundo Pereira-Rodriguez *et* al. (2012) Lactozyme® 2600 é uma preparação enzimática comercial da enzima β-galactosidase de *K. lactis*, que possui 99% de identidade com enzima β-galactosidase de *K. marxianus*. Esta enzima é homotetramérica com uma massa molecular de aproximadamente 118 kDa. Segundo estes autores a enzima β-galactosidase de *K. lactis* apresentou uma forma tetramérica no cristal, constituída por quatro

moléculas construídas de unidades assimétricas. Vários estudos têm relatado a presença de duas formas ativas na análise de eletroforese de amostras β-galactosidase de *K. lactis* purificada, que foram atribuídos à presença de dímeros e tetrâmeros (BECERRA *et* al., 1998). O padrão observado de oligomerização no cristal corresponde a uma "dimerização de dímeros" que é consistente com o experimental, segundo Pereira-Rodriguez *et* al. (2012).

Assim, é possível que exista um equilíbrio entre os dímeros associados e dissociados, embora mais estudos precisem ser realizados para elucidar ainda mais as condições que regem o equilíbrio de associação e suas possíveis implicações biológicas. Não foi observado nenhuma subunidade da enzima na análise da Amostra 6 e este resultado pode estar associado à resolução da metodologia empregada bem como à baixa concentração utilizada nas amostras para as análises.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O meio de cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 para obtenção do inóculo que resultou em melhores resultados foi o meio composto por extrato de levedura (6,0 g L^{-1}), $(NH_4)_2SO_4$ (6,0 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g L^{-1}) e permeado de soro de leite em pó, preparado em tampão fosfato 10^{-1} M pH 5,5, a fim de se obter uma concentração de lactose de 50 g L^{-1}.
- O valor da taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi de 0, 288 h^{-1}, tempo de geração de 2,41 horas e uma concentração celular máxima experimental de aproximadamente 4 g L^{-1}.
- Os métodos de ruptura em agitador tipo vórtex e em processador ultrassônico foram eficientes no processo de extração de β-galactosidase.
- Através dos resultados do Delineamento Fatorial Fracionário obteve-se que a produção máxima β-galactosidase foi afetada, de modo mais significativo, pela concentração de lactose, seguido de $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura e pH.
- Os melhores resultados obtidos pelo Delineamento Composto Central para avaliação da composição do meio na atividade específica de β-galactosidase foram alcançados para as concentrações de lactose de 100 a 150 g L^{-1}, extrato de levedura inferior a 6 g L^{-1} e $(NH_4)_2SO_4$ entre 2 e 8 g L^{-1}.
- Os melhores resultados para atividade enzimática (U mL_{caldo}^{-1}) obtidos pela avaliação conjunta da influência da agitação e aeração foram alcançados para agitação entre 200 e 400 rpm e aeração variando de 0,6 a 1,4 vvm.
- Nas condições maximizadas (300 rpm e 1,0 vvm) para produção de β-galactosidase a partir de *K. marxianus* ATCC 46537 foi obtido atividade enzimática de aproximadamente 125 U mL_{caldo}^{-1}.
- A co-produção de bioetanol foi observada em todas as fermentações.
- Observou-se através da análise simultânea das curvas de contorno da influência da agitação e aeração na co-produção de bioetanol e na atividade específica de β-galactosidase que há uma pequena faixa em que há produção de altos valores de atividade enzimática e etanol simultaneamente, sendo elas: agitação de 200 a 400 rpm e aeração entre 0,4 a 1,2 vvm.

- As condições estudadas para uma maior produção de enzima e de etanol foram próximas. Isso provém do fato de que quanto maior a atividade de β-galactosidase, maior a produção de glicose e galactose que são mais facilmente fermentadas a etanol do que a lactose.
- Os resultados experimentais indicam uma alternativa promissora para a valorização do permeado de soro de leite na produção conjunta de β-galactosidase e bioetanol.
- As constantes cinéticas $V_{máx}$ e K_m foram respectivamente 11,01 U mL^{-1} e 3,62 g L^{-1} (10,58 mM).
- A enzima β-galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 apresentou maior atividade a uma temperatura de 45 °C.
- O extrato enzimático produzido apresentou altos valores de atividade relativa em tampão lático na faixa de pH de 5,5 a 7,3.
- A eletroforese em gel de poliacrilamida do extrato enzimático apresenta uma subunidade de massa molecular 52,3 kDa coincidente com a amostra de referência (Lactozyme® 2600), indicando a presença de subunidades de β-galactosidase no extrato produzido.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar estratégias de imobilização para a enzima β-galactosidade de *K. marxianus* ATCC 46537 produzida em fermentação submersa.
- Estudar a cinética de hidrólise de lactose empregando β-galactosidase de *K. marxianus* imobilizada.
- Caracterizar o biocatalisador imobilizado em termos de pH, temperatura, estabilidade, reuso e estocagem.
- Estudar o processo de hidrólise enzimática em reator de leito fixo utilizando β-galactosidase imobilizada.

CAPÍTULO 7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A.C.; RUBIO-TEXEIRA, M.; POLAINA, J. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 44, p. 553-557, 2004.

ALEGRE, R. M. **Contribuição ao estudo de aproveitamento de soro de queijo para produção de lactose e etanol.** Campinas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UNICAMP, 178p. 1988.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A., DURAN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ALVES, F. G.; DUARTE, S H.; PEREIRA, L. P.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Caracterização da β-galactosidase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. In: SIMPÓSIO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL, 3., 2008, Cascavel. **Anais**... Cascavel: Universidade do Oeste do Paraná, 2008.

ALVES, F.G.; MAUGERI FILHO, F.; BURKERT, 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.

ANDRADE, A.C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e** *Saccharomyces cerevisiae*. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANDREAS, N.J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K.M. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, p. 629–635, 2015.

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuos processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. **Food and Bioproductos Processing**, v. 90, n. 2, p. 351- 359, 2012.

BAILEY J. E.; OLLIS D. F. **Bichemical Engineering Fundamentals**. Second edition. New York, 1986.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas.** 2008 . 179f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2008.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 435, 2015.

BECERRA, M., CERDÁN, M.E., GONZÁLEZ-SISO, M.I. Micro-scale purification of β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active, **Biotechnology Techniques,** v.12, p. 253-256, 1998.

BELO, E.V.C. **Construcão de uma linhagem floculante de *Kluyveromyces marxianus* com potencial para produzir etanol.** 2013. 47f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Visçosa, 2013.

BERGKAMP, R.J.; BOOTSMAN, T.C.; TOSCHKA, H.Y.; MOOREN, A.T.; KOX, L.; VERBAKEL, J.M.; GEERSE, R.H.; PLANTA, R.J. Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 309–317, 1993a.

BERGKAMP, R.J.; GEERSE, R.H.; VERBAKEL, J.M.; PLANTA, R.J. Cloning and sequencing of the URA3 gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Yeast** v. 9, p. 677–681, 1993b.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: **Biochemical Engineering**. New York: Editora Marcel Dekker, 716 p, 1997.

BLOWEY, R. W. Factors Affeting Milk Quality. In: **Bovine Medicine**. Diseases and husbandry of cattle.Oxford: Blackwell, 1992, p. 329 – 334, 1992.

BNDES, CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro: BNDES, 316 p. 2008.

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. 858-864, 2008.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L.; MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of β-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 696-699, 1995. http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)00115-8

BRADY, D.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. Ethanol production at 45 degrees C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Bioprocess Eng.** v. 16, p. 101–104, 1997.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: Um desafio para as fábricas de queijo. **Leite e Derivados**, n. 15, p. 13-19, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51. Diário Oficial da União.** Brasília: MAPA, 2002.

BRITO, A.B.N. **Estudo da Cristalização de lactose em diferentes solventes.** 2007. 132f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2007.

BUNACIU, A.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; HOANG, V.D. Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review. **Food Chemistry**, v. 196, p. 877–884, 2016.

CABALLERO, R.; OLGUIN, O.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GBMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker'syeast. **Food Research International,**v. 28, p. 37-41, 1995.

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

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.

CARMINATTI, C. A. **Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β-galactosidade** *Kluyromyces lactis***.** 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC. 2001.

CARVALHO, F., PRAZERES, A.R., RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science Total Environmental.** v. 445–446, p. 385–396, 2013.

CASTRO, F.P.; CUNHA, T.M.; OGLIARI, P.J.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. Influence of different contento of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 993-997, 2009.

CHANDRAPALA, J.; WIJAYASINGHE, R.; VASILJEVIC, T. Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems. **Journal of Food Engineering,** v. 178, p. 181-189, 2016.

CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renew Energy**, v. 36, p. 3541-3549, 2011

CHRISTENSEN, A.D.; KADAR, Z.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; THOMSEN, M.H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 283-289, 2011.

COENEN, T.M.M.; BERTENS, A.M.C.; HOOG. S.C.M.; VERSPEEK-RIP, C.M. **Food and Chemical Toxicology,** v. 38, p. 671-677, 2000.

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

CRUZGUERRERO, A.; GARCIAPENA, I.; BARZANA, E.; GARCIAGARIBAY, M.; GOMEZRUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* cdbb-l-278-a wild inulinase hyperproducing strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering,** v. 80, p.159–163, 1995.

DEKKER, P.J.T.; DAAMEN, C.B.G., in: J.W. Fuquay (Ed.), Encyclopedia of Dairy Science, 2nd ed., **Academic Press**, London, p. 276–283, 2011.

DERMIKI, M.; NTZIMANI, A; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese "Myzithra Kalathaki" using modified atmosphere packaging. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 284-294, 2008.

DINIZ, R.H.S.; SILVEIRA, W.B.; FIETTO, L.F.G; PASSOS, F.J.V. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 541–550, 2012.

DINIZ, R.H.S.; RODRIGUES, M.Q.R.B.; FIETTO, L.G.; PASSOS, F.M.L.; SILVEIRA, W.B. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v. 3, p. 111–117, 2014.

DOMINGUES, L., LIMA, N., TEIXEIRA, J.A., Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo. In: **Actas da 6.a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente**, vol. 3. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. p. 271-280, 1999.

DRAGONE, G., MUSSATTO, S.I., SILVA, J., TEIXEIRA, J.A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass Bioenergy**, v. 35, p. 1977-1982, 2011.

DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v. 4, p.1131-1135, 1998.

ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Lactose hydrolysis by β-galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 426-437, 2009.

FARIAS, F. F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos Carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**. v. 8, n. 3, 2004.

FERNANDEZ C.; CARRACEDO, B.; MARTINEZ, E.J.; GOMEZ, X.; MORAN, A. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate, **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering,** v. 49 (2), p. 210–217, 2014.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por β-galactosidase de** *Aspergillusoryzae* **imobilizada em reator de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 136 p., 2010.

FISCHER, J; GUIDINI, C. Z.; SANTANA,L. N. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO; E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β-galactosidase from *Aspergillusoryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, 178-186, 2013.

FLORENTINO, E. R. Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática. Natal. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 150p. 2006.

FLORES, M.V.; VOGET, C.E.; ERTOLA, R.J.J. Permeabilization of yeasts cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994.

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

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

FRASCARI, D.; CAPPELLETTI, M.; DE SOUSA MENDES, J.; ALBERINI, A.; SCIMONELLI, F.; MANFREDA, C.; LONGANESI, L.; ZANNONI, D.; PINELLI, D.; FEDI, S. A kinetic study of biohydrogen production from glucose: molasses and cheese whey by suspended and attached cells of *Thermotoga neapolitana*, **Bioresource Technology,** v. 147, p. 553–56, 2013.

FRYE, R.E. **Lactose intolerance**. Clínica Fellow, Departamento de Neurologia, Hospital de Crianças de Boston, Escola Médica Harvard, 2002.

GABARDO, S., RECH, R., AYUB, M.A.Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1194, 1201, 2012.

GABARDO, S., RECH, R., ROSA, C.A., AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v.69, p. 89-96, 2014.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z. Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: Predicting values to be used in immobilized bioreactors. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.56, p. 2305-2309, 2011.

GÄNZLE, M.G.; HAASE, G.; GELLEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 685-694, 2008.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, pp. 2-12, 1985.

GERDE, J.A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D. WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

GHALY, A.E.; KAMAL, A.; 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.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, p. 43-46, 2001.

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth

and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 374-381, 2013.

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

GOYAL N.; GANDHI, D.N. Comparative analysis of Indian paneer and cheese whey for electrolyte whey drink, **World Journal of Dairy and Food Sciences** v. 4 (1), 70-72, 2009.

GRAND R.J.; MONTGOMERY, R.K. Lactose malabsorption. **Current Treatment Options in Gastroenterology.** v. 11, p. 19-25, 2008.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. β-Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionicbinding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.71, p. 139–145, 2011.

GUIDO, E. S. **Produção simultânea de β-galactosidase e inulinase por** *Kluyveromyces marxianus* **CCT 7082**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2012.

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

GÜNERKEN, W.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-CONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS,R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, 243-260, 2015.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 251-258, 2003.

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

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects (Review). **International Dairy Journal**, v. 22, p. 104-109, 2012.

HARRIS, E.L.L. **Protein purification methods: a practical approach.** 2 ed. Nova York: Oxford; 2001.

HEIDTMANN, R.B.; DUARTE, S.H.; PEREIRA, L.P.; BRAGA, A.R.C. Kinetics and thermodynamic characterization of β-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.

HOBMAN, P.G. Review of process and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.11, p. 2630-2653, 1984.

HOLSINGER, V.H. Lactose. In: WONG, P.N; JENNES,R.; KEENEY,M.; MARTH,E.H. **Fundamentals of Dairy Science**. New York, Van Nostrand Reinhold. 3 ed. pp. 279-342, 1988.

HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3, p.1-38, 1997.

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

HOTT, S.; AMARAL, L.M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Tratamento térmico do soro de queijo para determinação de condições ideais para produção de b-galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nov/dez, nº 365, 63, p. 32-35, 2008.

http://www.3dchem.com/ Acessado em 26/01/2016

http://www.evapodry.com/powder-and-lactose-plant.html, Acessado em 25/10/2015.

HU, K.; DICKSON, J.M. **Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation**, John Wiley and Sons Ltd., 2015.

INSUMOS. **Intolerância à lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose.** São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/. Acesso em abril/2010.

JELEN, P., **Whey Processing, Encyclopedia of Dairy Sciences**, vol. 4, Academic Press, London, 2000.

JENSEN, R. **Handbook of Milk Composition**. San Diego: Academic Press, Inc.; 1995

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

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

KADAR, Z.; SZENGYEL, Z.; RECZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products,** v. 20, p. 103–110, 2004.

KAMRAN, A.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S.A.U. Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β-galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 99-103, 2016.

KATINONKUL, W.; LEE, J.-S.; HA, S. H.; PARK, J.-Y. Enhancement of enzymatic digestibility of oil palm empty fruit bunch by ionic-liquid pretreatment. **Energy**, v.47, p. 11–16, 2012.

KISHORE, D.; KAYASTHA, A.M., Optimisation of Immobilisation Conditions for Chick Pea β-Galactosidase (CpGAL) to Alkylamine Glass Using Response Surface Methodology and its Applications in Lactose Hydrolysis. **Food Chemistry**. v. 134, p.1650-1657, 2012.

KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A.; SURAZYNSKI, A. Utilizacion de la β-D-galactosidase en la Elaboration de la Lecha Condensada Azucarada. **Le Lait**. v 527, p. 10-15, 1973.

KLEIN, M. P**. Imobilização de β-galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91 p., 2010.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

KOLLER, M.; BONA, R.; CHIELLINI, E.; FERNANDES, E.G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*, **Bioresource Technology**, v. 99 (11), p. 4854–4863, 2008.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products, **Journal of Dairy Science,** v. 62, p. 1149–1160, 1979.

KOSSEVA, M.R.; PANESAR, P.S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOULOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresource Technology,** v. 82, p. 177–181, 2002.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains, **Journal of Food Science and Technology**, v. 49 (5), p. 614–619, 2012.

KULA, M.R.; SCHUTTE, H. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. **Biotechnology Progress,** v.3, p. 31-42, 1987.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**, Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LANE, M.M., MORRISEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews,** v. 2, p. 1-10, 2010.

LAVARI, L.; PAEZ, R.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic *lactobacilli*, **Journal of Dairy Research,** v. 81 (3), p. 267-274, 2014.

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.

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

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnología Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3, 593 p., 2001.

LIU, G.X.; KONG, J.; LU, W.W.; KONG, W.T.; TIAN, H.; TIAN, X.Y.; HUO, G.C. β-Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentun* K4. **Journal Dairy Scientific**, v. 94, p. 5811–5820, 2011.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. London, v. 27, p. 93-103, 2008.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LONNERDAL, B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 554, p. 11-25, 2004.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77(6), p.1537–43, 2003.

LORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 71–75, 2000.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, P.L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactosebased medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 30, p. 715–720, 2003.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J.; ROGERS, P.L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 32, p. 284–288, 2005

MADRONA, G.S.; TERRA, C.O.; PENHA, C.B. Efeito da substituição do açúcar por oligofrutose em bebida láctea achocolatada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.3, p. 29- 37, 2009.

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.

MAHONEY, R.R .Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n° 2, p. 147-154, 1998.

MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; KIT, W. K. Lactose content of modified enzyme treated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 439-443, 1999.

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C.A.V; KALIL, S.J. Optimization of the Culture Medium for the production of β-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology,** v. 46, 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 β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientarium Technology**, v.33, n. 2, p. 155 – 161, 2011.

MATHUR, B.N.; PATEL, J.N.; SARMA, S.C. Application of Ultra-filtration for desproteinization of whey for lactose production. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 34, p. 231-231, 1980.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products.** Woodhead Pulishing, England, 392 p., 2003.

MCCLURE, W. F.; STANFIELD, D. L. **Near-infrared spectroscopy of biomaterials.** In J. M. Chalmers & P. R. Griffiths (Eds.), Handbook of vibrational spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd., 2002.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; FREITAS, R.J.S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C.R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal,** v. 6, p. 33–39, 2000.

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. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEEHAN, C.; BANAT, I.M.; MCMULLAN, G.; NIGAM, P.; SMYTH, F.; MARCHANT, R. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Environment International,** v. 26, p. 75–79, 2000.

MONTALTO M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; VASTOLA, M.; CAMMAROTA, G.; MANNA, R.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. **World Journal of Gastroenterology,** v.12, p. 187–191, 2006.

MORRISSEY, P.A. Lactose: chemical and physicochemical properties. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. London: Elsevier Applied SciencePublishers, v. 3. p. 1-34, 1985.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDINI, E. β-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.

NICKERSON, T. A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Connecticut: The AVI Publishing Co. 2nd ed., p. 224-260, 273-324, 1974.

NICKLAS, T. A.; QU, H.; HUGHES, S. O; HE, M.; WAGNER, S. E.; FOUSHEE, H. R.; SHEWCHUK, R. M. Self-perceived lactose intolerance results in lower intakes of calcium and dairy foods and is associated with hypertension and diabetes in adults. The American **Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 191-199, 2011.

NIGAM, P.S., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p.52–68, 2011.

NOVO NORDISK. Publicação. Enzymes Process Division. Bioindustrial Group. 1993.

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

NUNES, M.F.A.; MASSAUGER, S.; MONTE ALEGRE, R. Produção e Propriedades de β-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415. **Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 25-30, jan/jun. 1993.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. β-galactosidase immobilization for Milk lactose hydrolysis: A simple experimental and modelling study of batch and contínuos reactors. **Biochemical education**, v. 28, n. 3, p. 164-168, 2000.

ODA, Y.; NAKAMURA, K. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **FEMS Yeast Research,** v. 9, p. 742–748, 2009.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de β-galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável.** 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

OMAR, A.M.E.; ROOS, Y.H. Glass transition and crystallization behaviour of freeze- dried lactose-salt mixtures. **LWT,** v. 40, 536-543, 2007.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p., 2005.

ORTOLANI, C.; PASTORELLO, E.A.; **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology,** v. 20, p. 467–483, 2006.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 84, p. 106-111, 2009.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations, **Bioresource Technology,** v. 98 (16), p. 2978–2984, 2007.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PADILLA, B.; FRAU, F.; RUIZ-MATUTE, A.I.; MONTILLA, A.; BELLOCH, C.; MANZANARES, P.; CORZO, N. Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by beta-galactosidases from dairy *Kluyveromyces*, **Journal of Dairy Research,** p. 1–9, 2015.

PAKIZEH, M.; NAMVAR-MAHBOUB, M. Experimental study of lactose hydrolysis and separation in continuous stirred tank-ultrafiltration membrane reactor, **Chemical Engineering and Processing**, v. 2, p. 1-4, 2011.

PAL, R.; TEWARI, S.; RAI, J.P. Metals sorption from aqueous solutions by *Kluyveromyces marxianus*: process optimization, equilibrium modeling and chemical characterization. **Biotechnology Journal,** 2009.

PALOMO, J.M.; ORTIZ.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipase for lipase purification via specific lipase-lipase interactions**. Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 267-273, 2004.

PANDIT, A.B.; HARRISON, S.; FARKADE, V.D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimise the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247-257, 2005.

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

PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production, **Food Chemistry**, v. 105, p. 1–14, 2007.

PARASHAR, A.; JIN, Y.; MASON, B.; CHAE, M.; BRESSLER, D.C. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science,** v. 99, p. 1859–1867, 2016.

PAS, M.; PISKUR, B.; SUSTARIC, M.; RASPOR, P. Iron enriched yeast biomass – A promising mineral feed supplement. , **Bioresource Technology,** v. 98, p. 1622–1628, 2007.

PECOTA, D.C.; RAJGARHIA, V.; DA SILVA, N.A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus.* **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 408–416.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**. Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M.I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase. **Journal of Structural Biology**, v. 177, p. 392-401, 2012.

PERSIKE, D.S.; BONFIM, T.M.; SANTOS, M.H.R.; LYNG, S.M.O., CHIARELLO, M.D. FONTANA, J.D. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Bioresour. Technol.**, v. 82, p. 79-85, 2002.

PESSELA, B.C.C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, L.J.; CARRASCOSA, V.A.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β-galactosidase on Sepabeads supports decrease product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products, **Enzyme and Microbial Technology,** v.33, p. 199-205, 2003.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces strains*. In: **Symposium on Yeast as a Cell Factory**. Elsevier Science Inc, Vlaardinger, Netherlands, pp. 756–762, 1998.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Lett. Appl. Microbiol**., v. 37, p. 438-442, 2003.

PINTO, G.A. **Biorefinaria de soro de queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 246 f., 2008.

PIVARNIK, L. F.; SENEGAL, A.G.; RAND, A.G. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β-galactosidase (lactase) in food processing. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 38, p. 33. 1995.

PORTO, L.M. **Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção da Ricota.** Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG, 2001.

PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. **Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção de ricota.** Boletim CEPPA, v. 23, n. 1, p. 173-182, 2005.

POVOLO S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose, **Bioresource Technology,** v. 101 (20), p. 7902–7907, 2010.

PRAKASHAM, R.S.; SUBBA RAO, C.H.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P.N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology,** v. 102, p. 204–211, 2007.

PRAKASHAM, R.S.; SUBBA RAO, CH.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P.N. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. **Biotechnology Progress,** v. 21, p. 1380–1388, 2005.

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

PRETTO, F.M.; SILVEIRA, T. R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**. Porto Alegre, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.

QURESHI, N.; FRIEDL, A.; MADDOX, I.S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: use of pervaporation membrane to recover and concentrate product, **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 98 (23), p. 9859–9867, 2014.

RABELO, A.P.B.; TAMBOURGI, E.B.; PESSOA JR, A. Bromelain partitioning in two phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography**, v. 807,p. 61-8, 2005.

RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; PROCENTESE, A.; RUSSO, M.E.; SALATINO, P.; MARZOCCHELLA, A. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor, **Bioresource Technology,** v. 138, p. 259–265, 2013.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of β-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Biotechnology and Technology**, v. 41, n° 4: 31 5 – 320, 2003.

RAJOKA, M.I. Kinetic parameters and thermodynamic values of beta-xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus.* **Bioresource Technology,** v. 98, p. 2212–2219, 2007.

RAO, C.H.S.; SATHISH, T.; MAHALAXMI, M.; LAXMI, G.S.; RAO, R.S.; PRAKASHAM, R.S. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm. **Journal of Applied Microbiology,** v. 104, p. 889–898, 2008.

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.

REED, G; NAGODAWITHANA, T. **Enzymes in Food Processing.** New York, Academic Press. 3ª ed. 1993.

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

RHIMI, M.; BOISSON, A.; DEJOB, M.; BOUDEBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a β-galactosidase from the dairy *Streptococcus therm*ophilus LMD9 strain. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 515-525, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.011

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

ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 1288–1296, 2014.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances,** v. 24, p. 212-225, 2006.

SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymaticlysisof microbial cells. **Biotechnology Letters,** v. 29, p. 985-994, 2007.

SANDER, S.L.; KUIPERS, B.J.H.; DIJKHUIZENA, L.; KAMERLING, J.P. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. **Carbohydrate Research Volume**, v. 425, p. 48-58, 2016.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T.J.; CALABRO, V.; VILLADSEN, J.; SIN, G. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: a batch fermentation and kinetic study, **Bioresource Technology**, v. 102 (16), p. 7513–7520, 2011.

SANTIAGO, P.A., MARQUEZ, L.D.S., CARDOSO, V.L., RIBEIRO, E.J. Estudo da Produção de β-Galactosidase por Fermentação de Soro de Queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Campinas - Brazil) 24, 567-572, 2004.

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

SANTOS, L.D. **Fermentação alcoólica empregando leveduras floculantes em sistema de reatores torre.** Uberlândia. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Engenharia Química, 143p. 2014.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A.P.R.; PASTORE, G.M. Produção de galactoligossacarídeo por *Scopulariopis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

SCHEPERS, A.W.; THIBAULT, J.; LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-

stage process: model and experiments, **Enzyme and Microbial Technology,** v. 38 (3–4), 324–337, 2006.

SCHMIDELL, W.L.; AQUARONE, U.A.; BORZANI, E.W. **Biotecnologia industrial: volume 2: engenharia bioquímica.** Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

SCHNEIDER, A.L.S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M.F.; JONAS, R.; FURLAN, S. **Biotechnology letters**, 23, 547-550, 2001. Doi:10.1023/A:1010338904870

SCHOLZ, E.B. **Estudo cinético de** *Kluyveromyces marxianus* **CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β-galactosidase.** Dissertação de Mestrado. Mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 89p., 2011.

SCHULTZ, N.; CHANG, L.F.; HAUCK, A.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 69, p. 515–520, 2006.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 17 (4), p. 397-409, 2004.

SHAH, N. P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P. J. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption.**International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1992.

SHEN, Q.; YANG, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β-galactosidase immobilization. **Process Biochemistry,** v. 46, p. 1565-1571, 2011.

SHUKLA, T. P. B-galactosidase Technology: a Solution to the lactose problema. CRC, **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 5, p. 325-356, 1975.

SIEKSTELE, R.; BARTKEVICIUTE, D.; SASNAUSKAS,K. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). **Yeast** v. 15, p. 311–322, 1999.

SILVA, C.A.; HERMAN-GOMEZ, R.C. Qualidade protéica do soro de leite fermentado pela levedura *Kluyveromyces fragilis*. **Ciência Rural**, v.30, p. 515-520, 2000.

SILVA, P. H. F. Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola -Leite**, n° 6, 1997.

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

SISO, G.M.I, The biotechnological utilization of cheese whey: a review, **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1–11, 1996.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From 'gutter-to-gold'.**International Dairy Journal**, v. 18.P. 695-704, 2008.

SONG, C.; LIU, G. L.; XU, J. L.; CHI, Z. M. Purification and characterization of extracellular β-galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 954-960, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j. procbio.2010.02.025

SPARVOLI, A. C. **Má absorção de lactose do adulto em uma população nordestina.** Campinas: Ed. da Unicamp, 1989.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. Zaragoza, Espanha. Editora Acribia. 1975.

SRIVASTAVA, A.; MISHRA, S.; CHAND, S. Synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551**, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 123, p. 147–153, 2016.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 10, p. 631-637, 2000.

TAN, W.S.; KAMARUDDIN, S.; LING, R.C.; CHEW, T.K.; WOI HO, C. Efficient mechanical cell disruption of Escherichia coli by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1829, 2006.

TANRISEVEN, A,S.; DOGAN, E. A novel method for the immobilization of de β-galactosidase. **Process Biochesmitry**, v.38, p. 27-30, 2002.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozarela e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p. 589-595, 2006.

TOMASKA, M.; STREDANSKY, M.; GEMEINER, P.; STURDIK, E. Improvement of the thermostability of β-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 7, p. 649-652, 1995. http://dx.doi.org/10.1016/0032- 9592(94)00056-5

TORRES, A. N. Benefícios e malefícios do uso do leite de vaca na alimentação humana. **Nutrição Brasil**, v. 3, n. 4, jul./ago. 2004.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TRIENEKENS, J.; ZUURBIER, P. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. **International Journal of Production Economics**, v. 113, p. 107–122, 2008.

TRIGUEROS, D.E.G.; FIORESE, M.L.; KROUMOV, A.D.; HINTERHOLZ, C.L.; NADAI, B.L.; ASSUNCÃO, G.M. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal,** v. 110, p.71-83, 2016.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. Da Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 192 p.

USDA, United States Department of Agriculture**. Dairy: World Markets and Trade.** 2015.

USDEC, U. S. Dairy Export Council.Reference Manual for U. S. Whey and Lactose products.**Whey and Lactose: natural milk products**. Disponível em <www.fas.usda.gov>. Acesso em junho/2009.

VALDUGA, E.; PAVIANI, L.C.; MAZUR, S.P.; FINZER, J.R.D. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alimentos e Nutrição**, v.17, p. 393-400, 2006.

VALENTINO F.; KARABEGOVIC, L.; MAJONE, M.; MORGAN-SAGASTUME, F.; WERKER, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels, **Water Research,** v. 77, p. 49–63, 2015.

VAN DE VOORDE, I.; GOIRIS, K.; SYRYN, E.; VAN DEN BUSSCHE, C.; AERTS, G. Evaluation of the cold-active Pseudoalteromonashaloplanktis -galactosidase enzyme for lactose hydrolysis in whey permeate as primary step of d-tagatose production. **Process Biochemistry**, v. 49, 2134-2140, 2014.

VASALA A.; PANULA, J.; NEUBAUER, P. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms, **Journal of Biotechnology,** v. 117 (4), p. 421–431, 2005.

VASALLO, M.D.; PUPPO, M.C.; PALAZOLO, G.G.; OTERO, M.A.; BERESS, L.; WAGNER, J.R. Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: surface and emulsifying properties. **LWT- Food Science and Technology,** v. 39, p. 729–739, 2006.

VASILEVA, N.; IVANOV, Y.; DAMYANOVA, S.; KOSTOVA, I.; GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β-galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 82, p. 339-346, 2016.

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzymeand Microbial Technology**, v. 50, 188-194, 2012.

VESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. **Journal of the American College of Nutrition,** v. 19, p. 165-175, 2000.

VIEIRA, D.C.; LIMA, L.N.; MENDES, A.A.; ADRIANO, W.S.; GIORDANO, R.C; GIORDANO, R.L.C.; TARDIOLI, P.W. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54– 64, 2013.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. Nova York: John Wiley & Sons, 1984.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. ed. Davis: University of California,1994. 625 p.

XIA, Y.; ZHAO, J.; CHEN, H.; LIU, X.; WANG, Y.; TIAN, F.; ZHANG, H.P.; ZHANG, H.; CHEN, W. Extracellular secretion in *Bacillus subtilis* of a cytoplasmic thermostable beta-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science,** v. 93, p. 2838–2845, 2010.

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

YU, J.L.; YUE, G.J.; ZHONG, J.; ZHANG, X.; TAN, T.W. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. **Renew Energy,** v. 35, p. 1130, 1134, 2010.

YU, L.; O'SULLIVAN, D.J. Production of galactooligosaccharides using a hyperthermophilic β-galactosidase in permeabilized whole cells of *Lactococcus lactis.* **Journal of Dairy Science** v. 97, p. 694–703, 2014.

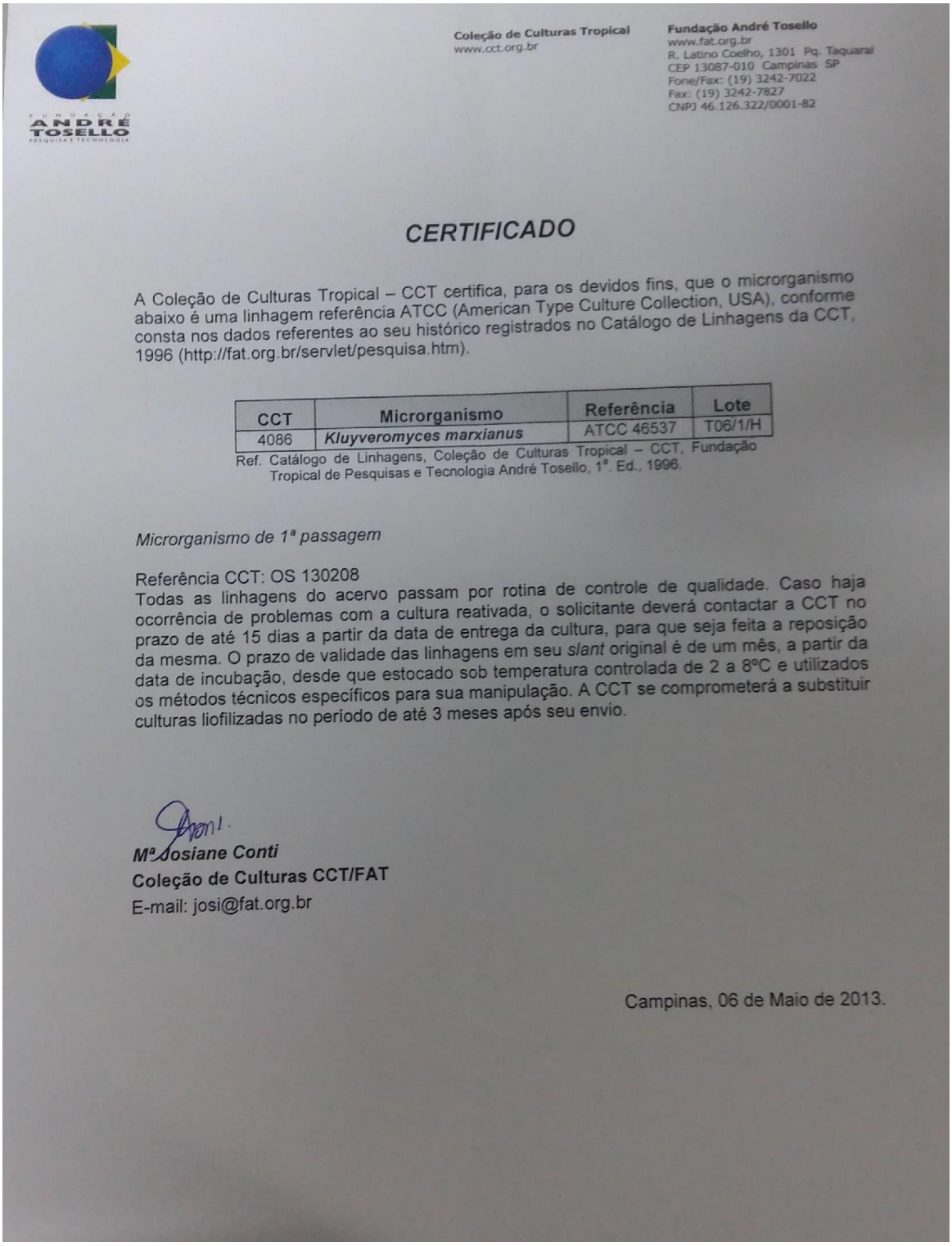
ZAFAR, S.; OWAIS, M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Engineering Journal,** v. 27, p. 295–298, 2006.

ZHENG, X.; XUA, Z.; TANGA, B.; LIA, S.; GAOC, J.; CHIA, B.; XUA, H. Construction and co-expression of polycistronic plasmids encoding thermophilic l-arabinose isomerase and hyperthermophilic β-galactosidase for single-step production of d-tagatose. **Biochemical Engineering Journal,** v. 109, p. 28–34, 2016.

ZHOU, H.X.; XU, J.L.; CHI, Z.; LIU, G.L.; CHI, Z.M. β-Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 17– 24, 2013.

ANEXO

ANEXO A



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

CERTIFICADO

A Coleção de Culturas Tropical – CCT certifica, para os devidos fins, que o microrganismo abaixo é uma linhagem referência ATCC (American Type Culture Collection, USA), conforme consta nos dados referentes ao seu histórico registrados no Catálogo de Linhagens da CCT, 1996 (http://fat.org.br/servlet/pesquisa.htm).

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
4086	***Kluyveromyces marxianus***	ATCC 46537	T06/1/H

Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1ª. Ed., 1996.

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 130208
Todas as linhagens do acervo passam por rotina de controle de qualidade. Caso haja ocorrência de problemas com a cultura reativada, o solicitante deverá contactar a CCT no prazo de até 15 dias a partir da data de entrega da cultura, para que seja feita a reposição da mesma. O prazo de validade das linhagens em seu *slant* original é de um mês, a partir da data de incubação, desde que estocado sob temperatura controlada de 2 a 8ºC e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação. A CCT se comprometerá a substituir culturas liofilizadas no período de até 3 meses após seu envio.

Mª Josiane Conti
Coleção de Culturas CCT/FAT
E-mail: josi@fat.org.br

Campinas, 06 de Maio de 2013.

ANEXO B

SOORO
A dádiva do soro de leite.

Especificação Técnica

Permeado de Soro de Leite em Pó

ET024
Revisão: 05

Produto

Produto obtido da filtração por membranas de ultrafiltração retirando a proteína de soro, concentrando em evaporador a vácuo e seco através do processo tipo spray dryer.

Aplicações

O permeado de soro de soro de leite em pó pode ser utilizado nas aplicações de biscoitos, pães, chocolates, queijos processados entre outros.

Ingredientes

Permeado de Soro de Leite Resfriado.

Não contém Glúten

Embalagem

Sacos de papel multifolhados com saco de polietileno interno, contendo 25 kg. Pallet PBR 1100kg.

Características Sensoriais

Pó uniforme sem grumos.
Sabor e odor lácteos.
Cor branco a amarelado.

Condições de Armazenamento e Transporte

Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local fresco e arejado. Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

Parâmetros Físico Químicos

	Mínimo	Máximo
Umidade (%)	-	3
Acidez (% ácido lático)[1]	-	2
pH	6,0	6,7
Cinzas (% sais minerais)	-	6
Lactose (%)	88	-
Proteína (%)	1,5	-

1- Método C - IN 68/2006 MAPA

Informações Nutricionais

Porção de 100g	
Valor Calórico	370 kcal
Carboidratos	90 g
Proteínas	2,0 g
Gorduras Totais	<0,05g
Gorduras Saturadas	<0,05g
Gorduras Trans	<0,05g
Fibras Alimentares	<0,10g
Sódio	674 mg
Cálcio	530 mg

Parâmetros Microbiológicos

	Máximo
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$5x10^4$
Coliformes Totais (UFC/g)	$1x10^2$
Coliformes Fecais (UFC/g)	$1x10^1$
Staphylococcus aureus (UFC/g)	$1x10^2$
Salmonella (25g)	Ausente*
Bacillus cereus (UFC/g)	Máx 1×10^3

* Análise semestral

Validade

Armazenado nas condições recomendadas, 12 meses a partir da data de fabricação.

Monitoramento

O monitoramento de contaminantes (Antibióticos, Pesticidas, Metais pesados, Micotoxinas, Microrganismos Patogênicos e Materiais Estranhos) é realizado de acordo com o Plano de Amostragem Interno e Legislações Vigentes.

Registro no Ministério da Agricultura nº 011/1328

ACEITE DO CLIENTE

Empresa:	**Data:** 24/03/15
Nome:	**Visto:**
Função:	

Fone +55 (45) 3284-5300
Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda
Caixa Postal 1066 - CEP 85960-000 - Rodovia BR 163 km 277 - Marechal Cândido Rondon - Paraná
www.sooro.com.br

APÊNDICE

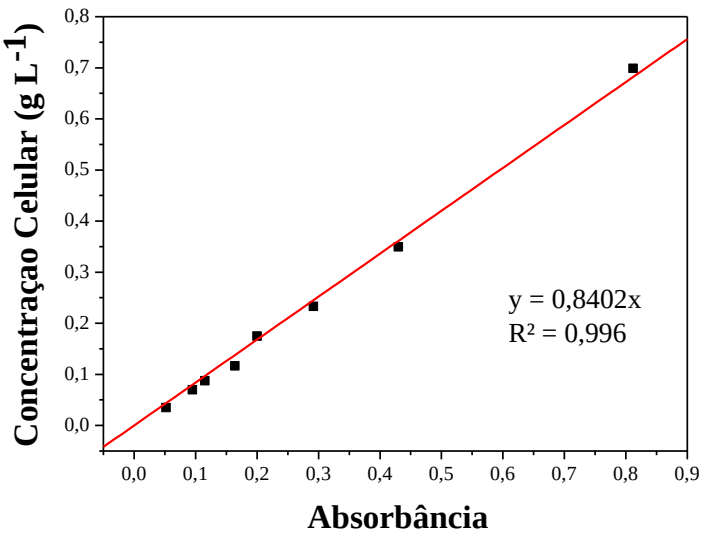
APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

A concentração celular foi obtida por massa seca, 100 mL do caldo fermentado foram retiradas do reator e centrifugado sob refrigeração (27 200 g, 4 ºC, 10 minutos), o sobrenadante era descartado, o decantado era ressuspendido em água deionizada e colocadas em estufa a uma temperatura de 80°C até que sua massa permanecesse constante. A massa seca era obtida pela diferença entre a massa final e a massa do recipiente.

Os resultados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Absorbância	Concentração de Células (g L^{-1})
0,8120	0,6987
0,4300	0,3494
0,2920	0,2329
0,2000	0,1747
0,1640	0,1165
0,1150	0,0873
0,0950	0,0699
0,0520	0,0349



APÊNDICE B

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação da concentração de proteínas totais foi obtida a partir da determinação da concentração de nitrogênio total pelo analisador TOC-L Modelo CSH da Shimadzu, convertida em proteína total através do fator de conversão obtido pela curva padrão utilizando albumina de soro bovina (BSA) como proteína. As amostras foram diluídas, filtradas e injetadas.

Os resultados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Concentração de Nitrogênio Total (mg L^{-1})	**Concentração de albumina (mg L^{-1})**
7,027	50
14,70	100
29,58	200
48,03	300
65,72	400
83,37	500
167,70	1000
263,20	1500
331,30	2000