



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



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR
FERMENTAÇÃO DE SORO DE QUEIJO COM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

PATRÍCIA APARECIDA SANTIAGO

UBERLÂNDIA

2002

SISBI/UFU



1000205297



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



MON
577.15
Sp935c
TES/ME/11

**Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de
queijo com *Kluyveromyces marxianus***

Patrícia Aparecida Santiago

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

Uberlândia - MG

2002

0073-54260

FU-00013862-6

D

SISBI/UFU

205297

2X.1

Universidade Federal de Uberlândia
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação / ms

- S235c Santiago, Patrícia Aparecida, 1976-
Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus* / Patrícia Aparecida Santiago. - Uberlândia, 2002.
83f. : il.
Orientador: Eloizio Julio Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.
1. Enzimas - Teses. 2. Enzimas microbianas - Teses. 3. β -galactosidase - Teses. I. Ribeiro, Eloizio Julio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 577.15 (043.3)

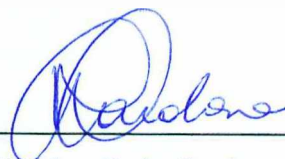
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 23 /08/2002.

BANCA EXAMINADORA:



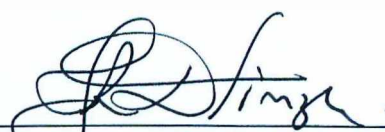
Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Orientador (PPG-EQ/UFU)



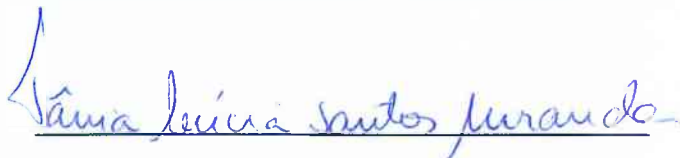
Prof.ª Dra Vicelma Luiz Cardoso

Co-orientadora (PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer

(PPG-EQ/UFU)



Prof.ª Dra. Tânia Lúcia Santos Miranda

(DEQ/UFMG)

Dedico este trabalho aos meus
pais, Maria José e Gilberto que com
muito carinho, dedicação e incentivo me
ensinaram os verdadeiros valores humanos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. A Ele entrego os momentos de indecisões, tristezas e desânimo. E com Ele compartilho todas as minhas vitórias.

À minha família, meus pais, Maria José e Gilberto, meus irmãos Fernanda e Leonardo, e meu sobrinho fofo Dudu, agradeço pelo incomensurável amor. Sem eles certamente não teria chegado aqui.

Aos professores Eloízio Júlio Ribeiro e Vicelma Luiz Cardoso, obrigada pela orientação, pelos brilhantes ensinamentos que muito contribuíram pelo meu crescimento profissional e pessoal, obrigada também pela confiança, pelo incentivo e amizade dispensada nestes anos. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer pela colaboração e pelas sugestões que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Engenharia Química: Zuleide Ferreira e Roberta Alves que muito me ensinaram no desenvolvimento prático deste trabalho. As funcionárias do laboratório da UFU: Aparecida, Mara e Lúcia pelo carinho neste período.

Aos funcionários da FEQUI: Cleide, Silvino, José Henrique, Anísio, Natércia, pela disponibilidade em todos os momentos.

Ao Engenheiro Édio José pelo auxílio na parte computacional deste trabalho.

Aos professores da Faculdade de Engenharia Química pela formação profissional e incentivo ao longo de todos esses anos.

À Prof.^a Rosane Rech, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo auxílio na interpretação do método fenol – ácido sulfúrico.

Ao CAPES, pelo apoio financeiro concedido na forma de Bolsa de Estudo à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

À aluna Elyzabeth Barbosa, cuja dedicação foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas e eternas “irmãs”: Flávia, Thaís, Carol, Gizela, Virgínia, Marisa Trevizoli, agradeço não somente, por todos esses anos de amizade, mas também pela cumplicidade e apoio em todos os momentos, compartilhando nossas tristezas e comemorando nossas vitórias.

À República “Las Muchachas” – Jú Meola, Tati, Jú Elisinha, Gisele, Ceci, Keilinha, minha segunda casa em Uberlândia. Agradeço por todos os anos de amizade, companheirismo. Nunca vou esquecer vocês.

Às amigas de república: Gisele Garducci e Catarina Sombrio, pelas longas conversas na sala regadas a muito café, pela paciência e amizade durante esse valioso período de convivência.

Aos amigos de Uberlândia: “Batatinha”, Regina, Tadeu, e aos que deixei: André (Piu), Márcia Trinca, Daniele Brendolan, e todos aqueles que não citei, mas que fizeram parte da minha história.

Aos amigos que fiz: Aderjane, Ana Paula, Catiuse, Débora Justini, Júlia Lima, Líbia, Lílian, Manduca, Marília, Rafael, Rebecca, Sílvia Mônica, em especial, Larissa e Luciana (Pará).

Aos meus familiares: Tia Maria Helena, Tia Lúcia, Vó Ruth, Rodrigo, Renato e todos os meus primos, tios, e cunhados, obrigada pela força e pelo carinho especial.

Enfim, a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram durante toda a minha vida para o meu crescimento profissional e pessoal.

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossa vida e nos marcam para sempre” (Cecília Meireles).

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Nomenclatura	v
Resumo	vi
<i>Abstract</i>	vii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – ENZIMAS.....	4
2.2 - LEITE E SORO DE QUEIJO.....	4
2.2.1- Propriedades do leite.....	4
2.2.2 - Soro de queijo.....	6
2.2.2.1 – Matéria-prima.....	6
2.2.2.2 – Propriedades do soro.....	7
2.3 – LACTOSE.....	9
2.3.1 – Ocorrência.....	9
2.3.2 – Propriedades químicas da lactose.....	9
2.3.3 – Hidrólise da lactose.....	11
2.4 - β -GALACTOSIDASE.....	13
2.4.1- Propriedades.....	13
2.4.2 - Fontes de β -galactosidases.....	14
2.4.3 – Características dos microrganismos produtores de β -galactosidase.....	18
2.4.4 – Condições para a produção de β -galactosidase.....	18
2.4.5 - Recuperação da enzima dos meios fermentados.....	21
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 - MATERIAIS.....	22
3.1.1 – Microrganismo.....	22
3.1.2 - Meio de cultura para a manutenção das cepas.....	22
3.1.3 – Soro de queijo.....	22

3.1.4 - Soluções tampão	23
3.1.4.1 – Tampão fosfato	23
3.1.4.2 – Tampão lático	23
3.1.5 – Meio de cultura para fermentação.....	24
3.1.6 - Unidade experimental para a determinação da atividade enzimática.....	24
3.1.7 - Unidade experimental para a fermentação.....	26
3.2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
3.2.1 – Preparação dos meios.....	27
3.2.2 – Esterilização.....	28
3.2.3 – Pré-tratamento do soro de queijo	28
3.2.3 – Preparo do pré- inóculo	28
3.3 – PLANEJAMENTO FATORIAL.....	29
3.4 – FERMENTAÇÕES	29
3.5 – ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES	30
3.5.1 – Determinação do crescimento celular	31
3.5.2 – Determinação dos açúcares totais - lactose	31
3.5.3 - Extração de β -galactosidase das células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> por autólise.....	32
3.5.4 – Determinação da Atividade Enzimática.....	32
3.5.5 - Determinação de glicose	34
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 - RESULTADOS PRELIMINARES.....	35
4.1.1 – Influência da suplementação de sais e extrato de levedura na produção de β - galactosidase pelo <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 46537 em meio à base de lactose (PA).....	36
4.1.2 – Influência da suplementação de sais e extrato de levedura na produção de β - galactosidase pelo <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 46537 em meio contendo soro de queijo	37
4.2 – RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL	42
4.2.1- Introdução	42
4.2.2-Fermentações relativas aos meios com lactose a 30,0 g/L.....	42
4.2.3-Fermentações relativas aos meios com lactose a 50,0 g/L.....	46
4.2.4-Fermentações relativas aos meios com lactose a 70,0 g/L	48
4.3- ANÁLISE CONJUNTA DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA E NA SÍNTESE DA ENZIMA	52

4.4- FERMENTAÇÃO EM MINIFERMENTADOR	55
5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	58
5.1 - CONCLUSÕES	58
5.2 – SUGESTÕES	59
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	65
ANEXO A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	66
ANEXO B - MÉTODOS ANALÍTICOS.....	67
Anexo B1 - Determinação da Atividade Enzimática.....	67
Anexo B.2 – Determinação dos Açúcares Totais - Lactose.....	69
ANEXO C.....	71
Anexo C1 - Valores Experimentais Preliminares para a massa celular seca, concentração de lactose no meio, pH, e atividade enzimática para as fermentações realizadas.	71
Anexo C2 - Resultados experimentais para a massa celular seca, concentração de lactose no meio, pH, e atividade enzimática para as fermentações realizadas a base de soro de queijo.....	74
ANEXO D - RESULTADOS REFERENTES À FERMENTAÇÃO EFETUADA NO MINIFERMENTADOR.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura molecular básica de uma molécula de lactose.	10
Figura 2.2: Mecanismo de reação proposto para a ação da β -galactosidase na lactose. E: enzima; LAC, lactose; GAL, galactose; GAL^+ , estado de transição; GLC, glicose; ROH, açúcar receptor; GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeo).....	14
Figura 3.1 – Representação esquemática da unidade experimental para a determinação da atividade enzimática.	25
Figura 3.2 – Unidade experimental para determinação da atividade enzimática	26
Figura 3.3 - Unidade experimental utilizada para conduzir as fermentações finais	27
Figura 4.1 - Fermentação em meio à base de solução lactose (PA), S = 50,0 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6,0 g/L.	36
Figura 4.2 - Influência da adição de sais na concentração celular (g/L) no meio a base de soro de queijo contendo 30,0 g/L de lactose, com sais e na ausência de extrato de levedura.....	38
Figura 4.3 - Influência da adição de sais na atividade enzimática (UGI/mL) no meio a base de soro de queijo contendo 30,0 g/L de lactose com sais e na ausência de extrato de levedura.	39
Figura 4.4 - Influência da adição de extrato de levedura na concentração celular (g/L) no meio a base de soro de queijo contendo 60 g/L de lactose com extrato de levedura e na ausência de sais.....	40
Figura 4.5 - Influência da adição de extrato de levedura na atividade enzimática (UGI/mL) no meio a base de soro de queijo contendo 60,0 g/L de lactose com extrato de levedura e na ausência de sais.....	41
Figura 4.6 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.....	43
Figura 4.7 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.....	44
Figura 4.8 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.....	45
Figura 4.9 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.....	46
Figura 4.10 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.....	47
Figura 4.11 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.....	48
Figura 4.12 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.....	49
Figura 4.13 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.....	50

Figura 4.14 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.....	51
Figura 4.15 – Concentração celular em função da concentração inicial de lactose (x) e extrato de levedura (y), para variáveis não codificadas (a) e para variáveis codificadas (b).	53
Figura 4.16 – Atividade enzimática em função da concentração inicial de lactose (x) e extrato de levedura (y), para variáveis não codificadas (a) e para variáveis codificadas (b).	54
Figura 4.17 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição média do leite bovino.	5
Tabela 2.2 – Principais componentes do extrato seco do soro de queijo <i>in natura</i>	7
Tabela 2.3 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.....	11
Tabela 2.4 - Propriedades lactases microbianas.	16
Tabela 2.5 - Principais lactases comerciais e suas propriedades.	17
Tabela 3.1 – Concentrações dos sais no tampão lático.	23
Tabela 3.2 – Composição do meio de cultivo à base de lactose (PA).	24
Tabela 3.3 – Composição do meio de cultivo à base de soro de queijo.....	24
Tabela 3.4 – Experimentos definidos pelo planejamento 3 ²	30
Tabela 4.1 – Resumo dos máximos valores de concentração celular e atividade enzimática para os 9 experimentos	52
Tabela A.1- Composição do leite de mamíferos domésticos e experimentais.	66
Tabela B.1 – Valores obtidos para a curva padrão para determinação da atividade enzimática.	68
Tabela B.2 - Valores obtidos para a curva padrão do método fenol – ácido sulfúrico	70
Tabela C.1 – Valores experimentais para fermentação em meio à base de solução lactose (PA), S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.....	71
Tabela C.2 - Valores experimentais para as fermentações à base de soro de queijo, desproteinado por acidificação, sem adição dos sais.	72
Tabela C.3 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 30 g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.....	74
Tabela C.4 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 30 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.....	75
Tabela C.5 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 30 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.....	76
Tabela C.6 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.....	77
Tabela C.7 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.....	78
Tabela C.8 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.....	79

Tabela C.9 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.	80
Tabela C.10 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.	81
Tabela C.11 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.	82
Tabela D.1 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.....	83

NOMENCLATURA

Símbolo	Definição	unidades
μ	velocidade específica de crescimento celular	h^{-1}
C	concentração	g/L
h	hora	
L	litro	
pH	potencial hidrogeniônico, onde $pH = \log [H^+]$	
rpm	rotações por minuto	rpm
T	temperatura	(°C)
t	tempo de reação	
UGI	unidade de atividade enzimática	UGI/mL
V	velocidade de reação	
v/v	volume por volume	
VVM	volume de ar por volume de meio por minuto	

RESUMO

A hidrólise enzimática de lactose por β -galactosidase desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, sendo uma das aplicações a obtenção de leite lactose-hidrolisado para consumo por indivíduos intolerantes à lactose e a prevenção da cristalização em produtos de laticínio. Este trabalho foi desenvolvido estudando as influências das concentrações de nutrientes no meio de cultura a base de soro de queijo, com o objetivo de produzir β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*. Soro de queijo desproteínado por acidificação foi utilizado como meio de cultura. As fermentações foram conduzidas em incubador rotativo por 12 horas a 30°C; pH inicial 5,5; sob agitação de 150 rpm e concentração celular inicial de 1×10^7 células/mL, variando as concentrações iniciais de lactose, extrato de levedura e sais. Durante o processo fermentativo os parâmetros avaliados foram: consumo de lactose, concentração celular e a atividade enzimática. Para extração da enzima, as células obtidas no final de cada fermentação foram separadas por centrifugação, ressuspensas em 10 mL de tampão fosfato pH 6,5 e distribuídas em erlenmeyers, aos quais foi adicionado 2% (v/v) de clorofórmio. Na determinação da atividade enzimática utilizou-se o método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose. Uma atividade enzimática de 28,0 UGI/mL foi obtida, utilizando como meio de cultura, soro de queijo, numa concentração de lactose de 50 g/L, enriquecido com os sais K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4$, nas concentrações 5,0; 6,0 e 0,6 g/L, respectivamente e extrato de levedura a 12 g/L. Nestas condições a concentração celular atingiu 4,8 g/L de massa seca. O soro de queijo mostrou-se um meio adequado, tanto para crescimento como para a síntese da enzima e os sais citados foram indispensáveis para a síntese da mesma. A adição de extrato de levedura ao meio de cultura, na faixa de concentração estudada, implicou em aumento, tanto do crescimento celular quanto da atividade enzimática.

Palavras-chave: β -galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, soro de queijo, produção de β -galactosidase

Abstract

The enzymatic hydrolysis of lactose for β -galactosidase plays an important role in the processing of milky products as the production of lactose-hydrolyzed milk for consumption for intolerant persons to lactose and the prevention of the crystallization in dairy products. In this work was studied the influences of nutrient concentrations in the culture medium based on cheese whey with the objective of producing β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. The fermentations were carried out in a shaker by 12 hours at 30°C, initial pH 5,5 under agitation of 150 rpm starting with a initial cellular concentration of 1×10^7 cells/mL, varying the initial concentrations of lactose, yeast extract and salts. During the fermentative process the analyzed parameters were: lactose consumption, cellular concentration and the enzymatic activity. For extraction of the enzyme, the cells obtained in the end of each fermentation were separate for centrifugation, suspended in 10 mL of phosphate pH 6,5 buffer and distributed in erlenmeyers, to the which it was added 2% (v/v) of chloroform. For enzymatic activity determination was used the initial rates method for the reaction of lactose hydrolysis. An enzymatic activity of 28,0 UGI/mL was obtained, using as culture medium cheese whey, in a concentration of lactose of 50 g/L, supplemented with the salts K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ and $MgSO_4$, in the concentrations of 5,0; 6,0 and 0,6 g/L, respectively and yeast extract of 12 g/L. In these conditions the cellular concentration reached 4,8 g/L of dry mass. The cheese whey supplemented with salts and yeast extract was an appropriate medium for cellular growth and enzyme synthesis.

Keywords: β -galactosidase, *Kluyveromyces marxianus*, cheese whey, β -galactosidase production

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Um dos alimentos mais importantes que a humanidade conhece, o leite, é considerado a primeira fonte de nutrientes para os mamíferos e a maior fonte de cálcio absorvível à disposição do homem. Por ser um produto acessível à população, apresentar excepcional valor nutritivo e custo relativamente baixo, programas nutricionais e indústrias de laticínios em diversas partes do mundo estimulam o consumo de leite e de seus derivados lácteos, entre eles, o queijo.

No decorrer dos anos, estudos referentes aos efeitos nutricionais e fisiológicos do leite na dieta humana tornaram-se de grande interesse dos profissionais de saúde e do público, visto que aproximadamente 75% da população mundial apresentam sintomas relacionados a uma intolerância à lactose, segundo o INSTITUTO NACIONAL DE DOENÇAS DIGESTIVAS, RENAS E DIABETES (EUA) filiado ao INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE AMERICANO. Estes números variam de 2% (Suécia) chegando a 100% (Índios Americanos) em função de alguns fatores como: raça e região de procedência.

Tal problema decorre da presença de lactose no leite. Este dissacarídeo, popularmente conhecido como “açúcar do leite”, necessita ser hidrolisado a glicose e galactose para ser absorvido pelo intestino humano. No aparelho digestivo, o volume de lactose não hidrolisada chega ao intestino grosso onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido láctico e gases (gás carbônico e hidrogênio). A presença de lactose e destes compostos nas fezes do intestino grosso aumenta a pressão osmótica e drena a água do corpo, causando os seguintes sintomas: diarreia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços (WHITE *et al.*, 1976).

Esse problema fisiológico, definido como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, é conhecido como Deficiência de Lactase do Adulto e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade desta enzima no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita da enzima ou uma diminuição gradativa desta com o avanço da idade (WHITE *et al.*, 1976; TEIXEIRA, 2000).

Com a finalidade de atender à dieta de tais pessoas, tem-se como alternativa a hidrólise da lactose em seus constituintes monossacarídeos, glicose e galactose. Este procedimento permite aumentar a utilização do potencial nutritivo deste alimento e seus derivados,

melhorando suas propriedades físicas e químicas como solubilidade e digestibilidade, obtendo assim, alimentos lácteos com baixos teores de lactose, ideais para esse tipo de consumidor (MAHONEY, 1997; KARDEL *et al.*, 1995; PIVARNIK *et al.*, 1995).

Nas indústrias de laticínios, a hidrólise proporciona outras vantagens como: a prevenção da cristalização, melhorando as características organolépticas, como cor e sabor, em produtos lácteos - doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes; o aumento na facilidade de corte e cremosidade das misturas para sorvete; a diminuição do tempo de maturação dos queijos Manchego e Cheddar e aumento em cerca de 10% na sua produção dos queijos, *Cottage* e *Quark*; e a produção de oligossacarídeos (KARDEL *et al.*, 1995; MAHONEY, 1997). Esta última aplicação é mais recente e está relacionada com a atividade de transgalactosilação da β -galactosidase. Na década de 50, pesquisadores observaram que a hidrólise enzimática da lactose era acompanhada pela transferência de grupos galactosil, para formar outros açúcares denominados oligossacarídeos (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; PRENOSIL *et al.*, 1987; ALMEIDA & PASTORE, 2001). Os oligossacarídeos, também denominados de ingredientes nutricionais, são responsáveis por melhorar a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no sabor e nas características físico-químicas destes, além disso, apresentam propriedades benéficas para a saúde do consumidor, prevenindo cáries dentárias, estimulando a proliferação de *Lactobacillus bifidus* no intestino, bactéria responsável pela restauração da flora intestinal após tratamento por antibióticos e inibindo o crescimento de microrganismos enteropatógenos tais como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus* (ALMEIDA & PASTORE, 2001).

A importância industrial da β -galactosidase e o fato de que não é tradição a produção em grande quantidade desta enzima no Brasil, incentivaram a realização do presente trabalho que faz parte de uma área em desenvolvimento desde 1996, nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia sobre a utilização e produção desta enzima.

Com a finalidade de produzir a β -galactosidase, o objetivo geral desse trabalho foi estudar a influência da composição do meio de cultura a base de soro de queijo no crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* e na produção da enzima. Para tal, como objetivos específicos investigou-se à influência da suplementação dos meios de cultura com sais e a influência das concentrações de lactose e extrato de levedura nos meios de fermentação, visando a produção da enzima.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica, que participam nas reações químicas que ocorrem em células vivas. O termo enzima é derivado do latim e significa “no levedo”. Esta denominação foi utilizada pela primeira vez em 1877, porém, desde a antiguidade as enzimas são utilizadas pelo homem, contudo, eram empregadas artesanalmente nos processos de produção de queijo e suas propriedades pouco conhecidas (LEHNINGER, 1995).

As enzimas atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade daquelas em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, a temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como reduzindo as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (BAILEY & OLLIS, 1986).

Ao contrário dos catalisadores sintéticos comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo dessa forma, os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluentes. Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam. As enzimas, de um modo geral, são mais frágeis, porém à temperatura ambiente, são mais ativas que os catalisadores sintéticos (RIBEIRO, 1989; SEGEL, 1993).

Com o rápido crescimento de produtos industrializados e o desenvolvimento tecnológico, novas prioridades estão sendo estabelecidas para promover o aumento na qualidade e no tempo de conservação dos alimentos. Nos últimos anos, o uso comercial de enzimas tem expandido, de um papel insignificante, para um importante aspecto do processamento de alimentos.

Neste contexto, a Indústria Alimentícia passou a introduzir novas técnicas em sua linha de fabricação, utilizando a catálise biológica, envolvendo enzimas e outros compostos

que fossem capazes de conferir aos alimentos, algumas propriedades importantes do ponto de vista comercial, tais como antioxidantes, aromatizantes, e adoçantes (REED & NAGODAWITHANA, 1993; MARIOTTI *et al.*, 2000).

A adição de enzimas aos produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de rações contribui modificando matérias-primas ou obtendo produtos específicos, destacando-se os usos em panificação, na modificação de materiais amiláceos, na fabricação de sucos de fruta, na modificação de proteínas, na fabricação de bebidas alcoólicas e de laticínios (VITOLLO, 2001).

Dentre as enzimas empregadas nas indústrias de alimentos, destaca-se o uso da enzima β -galactosidase (lactase) no processamento de leite e de seus derivados lácteos (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; REED & NAGODAWITHANA, 1993; LADERO *et al.*, 2000).

O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase, é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as β -galactosidasas são também galacto-transferases, enriquecendo os produtos lácteos com galactooligossacarídeos, constituindo assim, importantes pesquisas na última década (REUTER *et al.*, 1999; ALMEIDA & PASTORE, 2001).

2.2 - LEITE E SORO DE QUEIJO

2.2.1- PROPRIEDADES DO LEITE

O leite é produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos durante o período de lactação, para a alimentação de seus filhotes. Por apresentar alto valor nutritivo e custo relativamente baixo, o leite, freqüentemente, é o principal alimento das crianças e complemento indispensável na dieta dos adultos, (WALSTRA & JENNESS, 1984; OLIVEIRA, 1982; SCRIBAN, 1985). Segundo dados coletados pelo LEITE BRASIL, o consumo de leite no Brasil em 1999 foi de 8,5 bilhões de litros, incluindo leite longa vida, pasteurizado, leite em pó e informal.

O leite é utilizado como matéria-prima para a fabricação de um grande número de derivados lácteos, entre eles o queijo, a coalhada, o iogurte e o sorvete (OLIVEIRA, 1982; SCRIBAN, 1985).

Na sua complexidade, o leite é caracterizado como um líquido branco opaco, duas vezes mais viscoso que a água, de sabor ligeiramente açucarado e de odor pouco acentuado apresentando pH entre 6,5 a 6,7 (VEISSEYRE, 1972).

Os componentes principais do leite são os que se encontram em maior concentração e distribuídos em diferentes estados de dispersão, uma solução verdadeira representada pelos sais e lactose, uma emulsão envolvendo gorduras em solução e uma dispersão coloidal de proteínas estabilizada por vitaminas, oligossacarídeos, enzimas, anticorpos e hormônios (WALSTRA & JENNESS, 1984; ABLV, 1997).

De um modo geral, a composição qualitativa básica do leite das várias espécies de mamíferos é a mesma, seja qual for a origem, porém, a porcentagem de cada um dos componentes principais varia bastante. Esta variação é mais marcante de uma espécie de animal para outra, mas variações em menor escala ocorrem entre raças, podendo variar ainda com o estado de saúde, com a idade, o tipo e qualidade da alimentação (OLIVEIRA, 1982; BOBBIO & ORSATTI, 1992).

Sob o ponto de vista comercial, o leite produzido pela espécie bovina é o de maior interesse. A Tabela 2.1 fornece a composição média do leite bovino.

Tabela 2.1 - Composição média do leite bovino (BOBBIO & ORSATTI, 1992).

COMPONENTES	PORCENTAGEM (%)
Água	86
Proteína	3,5 (85% caseína)
Gordura	4,0
Lactose	5,0
Minerais	0,7
Fosfolipídeos	0,03
Cálcio	0,1

O valor nutritivo de um alimento baseia-se (1) na energia que proporciona, (2) no conteúdo de seus nutrientes essenciais (ácidos graxos, aminoácidos, sais minerais e vitaminas), (3) na digestibilidade de seus nutrientes e (4) na presença de alérgenos perigosos e toxinas (WALSTRA & JENNESS, 1984).

No caso do leite seus aspectos nutritivos devem-se à sua composição. Os sais minerais presentes no leite (cálcio, potássio, fósforo, sódio), desempenham muitas funções, entre elas,

o cálcio e o fósforo exercem função estrutural nos ossos e dentes, sendo o leite responsável por proporcionar grande parte do total de cálcio necessário para o ser humano (WALSTRA & JENNESS, 1984).

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais que os animais necessitam consumir, já que estes não podem sintetizá-las. O leite contém, em pequenas quantidades, todas as vitaminas conhecidas (tanto lipossolúveis: vitaminas A, D, E, como as hidrossolúveis: vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, C). O valor nutritivo das proteínas do leite (caseína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulina, lisozima), formadas por várias frações protéicas e consideradas proteínas completas como as da carne e do ovo, são indispensáveis para a síntese das proteínas específicas do organismo humano (WALSTRA & JENNESS, 1984; BOBBIO & ORSATTI, 1992; PORTO, 2001).

2.2.2 - SORO DE QUEIJO

2.2.2.1 – Matéria-prima

Queijo é um alimento sólido derivado dos seguintes produtos: leite, nata, leite desnatado (total ou parcialmente), soro de manteiga ou de mistura de qualquer um deles, obtido a partir da coagulação enzimática (com renina) ou ácido láctico, seguido da dessoragem do coágulo (RIBEIRO, 2001).

O componente mais importante do queijo é a proteína, sendo tecnologicamente referenciado como um concentrado protéico-gorduroso, embora os teores de gordura e água podem variar bastante, dependendo do tipo e do tempo de conservação do produto (OLIVEIRA, 1982; PORTO, 2001).

Dos sub-produtos provenientes do processo de produção de queijos nas indústrias de laticínios sob a forma de efluente líquido, o soro de queijo é o mais importante. A importância deste resíduo é devido ao enorme volume, sua composição, sua ampla capacidade de reutilização e, principalmente, pelo enorme poder poluente (PORTO, 2001).

A cada ano, 145 milhões de toneladas de soro de queijo e 6 milhões de toneladas de lactose são produzidas em todo o mundo. Infelizmente, nos últimos 50 anos, metade da produção mundial não tem utilizado esse subproduto, mas descartando-o diretamente em rios (BECERRA *et al.*, 2001). Esta situação gerou não só um grande problema ambiental como

também a necessidade de novas estratégias para aproveitar esse sub-produto e gerar energia.

2.2.2.2 – Propriedades do soro

O soro é a parte líquida do leite obtida após a precipitação da caseína para a produção de queijos e outros produtos de leite acidificado. Na produção de queijo 75 a 85 % do volume do leite resulta em soro. Os principais constituintes do soro apresentam uma composição global semelhante à do leite, do qual se extraiu caseína e gordura com aproximadamente 94% de água, 0,8% de proteína, 0,2 % de matéria gordurosa, 4,8 % de lactose, 0,5 % de cinzas minerais e outras substâncias, incluindo vitaminas (WALSTRA & JENNESS, 1984; PORTO, 2001).

Segundo OLIVEIRA (1982), cerca da metade dos sólidos totais presentes no leite permanece no soro, no qual a quantidade de extrato seco representa em média 7% do peso total. Os componentes hidrossolúveis do leite, tais como lactose, alguns sais, vitaminas e as proteínas que não coagulam com a caseína, as albuminas e as globulinas, ficam dissolvidos no soro. Este extrato é bastante rico e sua composição média em peso é apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Principais componentes do extrato seco do soro de queijo *in natura* (VILANI, 2001).

Componentes	Composição
Lactose	70 a 80 %
Compostos nitrogenados	10 a 14 %
Sais minerais	1,5 a 4,0%
Lipídeos	0,05 a 0,6%

A composição do soro varia com a natureza do leite utilizado, com as perdas dos seus constituintes ocorridas durante a fabricação do queijo, o tipo de queijo a ser produzido, o tratamento térmico utilizado e os processamentos utilizados (VILANI, 2001).

Basicamente, há dois tipos de soro lácteo:

Soro doce – proveniente da coagulação enzimática do leite em pH próximo de 6,7, sendo obtido nos processos de fabricação de queijos tipo Cheddar, Minas frescal, Minas

padrão, Mussarela, Prato e Suíço. Sua acidez titulável em ácido láctico é de 0,15 a 0,18%, correspondente a um pH de 6,3 a 6,7 (PONSANO *et al.*, 1992).

Soro ácido - resultante da produção de caseína ou de queijos com leites coagulados inicialmente por ácido, tal como a do tipo cottage, *quark*, requeijão e da ricota. Esse tipo de soro apresenta uma acidez titulável de 0,5 a 0,6% em ácido láctico e apresenta pH de 4,6 a 4,7 (PONSANO *et al.*, 1992).

A principal diferença nas composições dos soros ácido e doce refere-se ao teor de ácido láctico, sendo o teor de gordura levemente superior no soro doce.

O soro lácteo tem sido utilizado para vários fins, em função principalmente do seu alto valor nutritivo e também devido às exigências ambientais recentes com relação ao descarte de efluentes líquidos em corpos receptores.

Até pouco tempo atrás, o soro era considerado, no Brasil, um problema ambiental por ser altamente poluente devido à alta taxa de matéria orgânica. Além da quantidade de lactose presente de aproximadamente 68,7% dos sólidos totais, ou 4,8% no soro líquido, era mais um problema do que um produto, pois era descartado, trazendo complicações para o meio ambiente devido sua alta DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), ou destinado apenas à alimentação de animais, em geral, suínos (VILANI, 2001).

Uma forma de aproveitamento do soro de queijo após a remoção da gordura e caseína é como matéria-prima para a produção de lactoalbumina, lactose, fosfatos do leite, mistura de esteróis, gordura-solúvel, vitamina K e vitaminas solúveis em água. Além dessas alternativas tem-se a utilização desse subproduto com alto teor de proteínas e vitaminas no processamento do leite para a fabricação de certos derivados. Produtos tais como soro em pó, proteína do soro, queijo ricota, lactose, ácido láctico, álcool, vinagre e embutidos (hambúrgueres, salsichas, bolos de carne) enriquecidos com concentrados protéicos, bebidas lácteas e na alimentação animal (PORTO, 2001).

A lactose purificada obtida do soro de queijo é utilizada em diversas indústrias como a farmacêutica a fim de fornecer compressibilidade, lubrificação e firmeza na confecção de comprimidos, no revestimento de pílulas e em cosméticos; na indústria química, para a produção de ácidos láctico e cítrico, corantes e espumas de poliuretano; na indústria de alimentos, a lactose por ser menos doce que os outros açúcares comerciais, confere aos alimentos maior viscosidade e textura sem obter um produto tão doce; em produtos de confeitaria e biscoitos é usada em recheios, como carregador de flavorizantes e corantes; em produtos de panificação a adição de lactose à massa aumenta a cor dourada da crosta do pão

(frequentemente uma característica desejável) (WONG *et al.*, 1988; PORTO, 2001). Além disso, por não ser fermentada pela levedura *Saccharomyces sp.* ao ser adicionada na produção de cerveja, é responsável por acentuar o sabor e contribuir com a viscosidade dos produtos (PORTO, 2001).

Outra utilização da lactose obtida do soro é como fonte de carbono para alguns microrganismos, tais como: *Escherichia coli*, *Saccharomyces thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e outros, para a produção de produtos metabólicos, como ácidos, álcool, enzimas e oligossacarídeos (BARBOSA *et al.*, 1985; BARALLE, 1985; NUNES *et al.*, 1993; GRUBB & MAWSON, 1993; SILVA & CASTRO-GOMEZ, 1995; PONSANO & CASTRO-GÓMES, 1995; CARVALHAL *et al.*, 1996; RECH, 1998; BELEM & LEE, 1999; FODA & LOPEZ-LEIVA, 2000; FURLAN *et al.*, 2001; ABAD *et al.*, 2001; VASILJEVIC & JELEN, 2001).

2.3 – LACTOSE

2.3.1 – OCORRÊNCIA

A lactose é o carboidrato mais importante do leite e conhecida popularmente como “açúcar do leite”. Praticamente, o leite e o soro de queijo são as fontes exclusivas de lactose. No leite é encontrada nas proporções (em termos de sólidos totais) de 40%, 50% no leite desnatado e 75% no soro de leite. Além das altas concentrações de lactose no leite e nas glândulas mamárias, baixas concentrações aparecem no sangue e na urina, especialmente durante a gravidez e amamentação (SPREER, 1975; GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1988; PORTO, 2001).

A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono de microrganismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (WALSTRA & JENNESS, 1984).

2.3.2 – PROPRIEDADES QUÍMICAS DA LACTOSE

Quimicamente, a lactose é um dissacarídeo redutor constituída por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica β -1 \rightarrow 4. Pelo fato de ambas as moléculas que compõem a lactose se apresentarem na forma de anel piranosídico, esta deve

ser denominada propriamente de 4-0- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranoose (WALSTRA & JENNESS, 1984; HOLSINGER, 1988). Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 2.1.

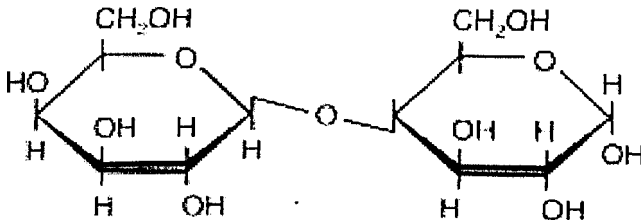


Figura 2.1 – Estrutura molecular básica de uma molécula de lactose.

As reações químicas da lactose implicam na ligação hemiacetal dos carbonos 1 e 5 da molécula de glicose, da ligação glicosídica β - 1 \rightarrow 4, dos açúcares cíclicos e da ligação -C-C- dos anéis.

A estrutura hemiacetal se apresenta na forma de um equilíbrio entre os anômeros α e β que diferem na configuração de -OH e -H de C-1. Estes anômeros diferem em rotação ótica específica e em solubilidade (WALSTRA & JENNESS, 1984; HOLSINGER, 1988).

As duas formas anoméricas α e β da lactose são responsáveis pelas diferentes propriedades físicas deste açúcar como solubilidade e doçura. A forma α é a mais estável dos tipos cristalinos em temperaturas ordinárias. Em soluções supersaturadas, abaixo de 93,5°C, ela cristaliza na forma β anidra. Quando uma solução de lactose ou produtos derivados do leite, contendo altos teores de lactose, são secos rapidamente, a lactose ocorre como um cristal amorfo higroscópico. Os cristais hidratados de lactose são duros e dão a impressão de natureza arenosa (WALSTRA & JENNESS, 1984; HOLSINGER, 1988).

Em comparação com outros açúcares, como sacarose, glicose e frutose, a solubilidade da lactose é baixa. Outras características como a baixa digestibilidade e reduzido poder edulcorante limitam a aplicação comercial da lactose (MAHONEY, 1997; HOLSINGER, 1997).

Na Tabela 2.3 é apresentado o poder edulcorante de alguns açúcares, entre eles a lactose, e sua solubilidade com o aumento da temperatura.

Tabela 2.3 -Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos (ZADOW, 1984).

	Poder edulcorante	Solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	-	82	87

Com o objetivo de ampliar a utilização de produtos lácteos, uma das alternativas é hidrolisar enzimaticamente a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Esta conversão por meio da enzima β -galactosidase é interessante tanto do ponto de vista tecnológico com a finalidade de produzir um açúcar mais doce, mais facilmente fermentável e mais solúvel, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose e aumentando o período de estocagem, como do ponto de vista nutricional, possibilitando a obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digestível para pessoas com problemas relacionados à intolerância a lactose (MAHONEY, 1997).

A intolerância à lactose é definida como síndrome clínica de desconforto intestinal, que ocasiona ao paciente diarreia e flatulência, após a ingestão de lactose. Testes efetuados para esta síndrome consiste em fornecer 0,2 g de lactose por kg de massa corporal ao paciente, ministrada em solução aquosa de 20% p/v e durante as horas seguintes, amostras de sangue indicam os níveis de glicose. Nas pessoas tolerantes à lactose, a concentração de glicose no sangue aumenta, e se for intolerante essa concentração aumenta pouco ou não aumenta (TEIXEIRA, 2000; UNIFESP, 2002).

2.3.3 – HIDRÓLISE DA LACTOSE

A lactose pode ser hidrolisada tanto pelo método ácido ou catalítico, como pelo método enzimático, utilizando a enzima β -galactosidase (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1997; LADERO & GARCIA-OCHA, 2000).

A principal vantagem da hidrólise ácida é o baixo custo por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, contudo opera em condições severas de pH e temperatura (pH = 1-2, T = 100 a 150°C). Devido essa característica, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de sub-produtos indesejáveis e desnaturação de proteínas (COUGHLIN & NICKERSON, 1975; MAHONEY, 1997).

O método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e α -D-glicose (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

Realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas (pH = 3,5 - 8,0; T = 5 a 60°C), reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do processo sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY & OLLIS, 1986).

A aplicação industrial das enzimas deve-se ao fato destas apresentarem alta especificidade entre enzima e substrato e possibilitar o controle de atividade da enzima mediante ajuste das condições da reação (temperatura e pH) interrompendo a reação quando necessário (SEGEL, 1993).

As enzimas são empregadas na forma solúvel, normalmente em processos batelada ou na forma imobilizada, mais indicada em operações contínuas.

Os métodos convencionais de fermentação que utilizam células livres em processos batelada possuem limitações, como baixa produtividade, inibição pelo produto e variação do produto proveniente de diferentes bateladas (COONEY, 1983).

A vantagem de imobilização da enzima é aumentar sua estabilidade já que a maioria é relativamente instável, seu custo é alto e a recuperação na forma ativa da enzima solúvel no processo final é difícil (VASILJEVIC & JELEN, 2001; ZHOU & CHEN, 2001).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e as mesmas podem ser usadas repetidas e continuamente, tornando as moléculas de enzimas insolúveis no meio aquoso. O uso de enzimas imobilizadas minimiza os inconvenientes encontrados nos processos onde se utiliza a enzima solúvel. Finalmente, uma enzima imobilizada pode ser fixada em posição próxima a outras enzimas, participando de uma

seqüência catalítica, aumentando, assim, a conversão em processos multietapas. Essas características de imobilização são atrativas se uma grande quantidade de substrato é requerida e se as enzimas envolvidas são muito onerosas (RIBEIRO, 1989; TREVISAN *et al.*, 1996; REED & NAGODAWITHANA, 1993).

Torna-se evidente a grande importância nutricional e comercial da hidrólise da lactose no leite e de seus derivados, sendo a hidrólise enzimática, um dos métodos mais interessantes para esta finalidade (TEIXEIRA, 2000).

No caso de hidrólise do leite, utiliza-se a enzima lactase na forma imobilizada. Para isto, alguns procedimentos devem ser estudados: interação iônica, ligação covalente e oclusão em géis hidrofílicos tais como Sephadex, DEAE celulose, AE celulose e policrilamida, bem como materiais hidrofóbicos como nylon, resinas fenolíticas, sílica porosa e vidro poroso (TOMÁS, 1998).

2.4 - β -GALACTOSIDASE

2.4.1- PROPRIEDADES

A enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, com capacidade de transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc) para formar glicose e galactose (BLANCH & CLARK, 1997; HOLSINGER, 1997).

Popularmente conhecida como lactase ou formalmente como β -D-galactosideo-galactohidrolase, é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; MAHONEY, 1997).

Com poucas exceções, as β -galactosidases são sintetizadas intracelularmente por microrganismos que utilizam o açúcar para produzir energia (BECERRA *et al.*, 2001).

Atuam também como catalisador biológico da reação que hidrolisa ligações β -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos, e compostos tais como orto e para-nitrofenil- β -D-galactosídeos, sendo esses dois últimos usados para determinar a atividade de β -galactosidase (BLANCH & CLARK, 1997).

Segundo PRESONIL *et al.* (1987), o mecanismo de hidrólise da lactose foi descrito pela primeira vez em 1960 por WALLENFELS e MALHOTRA utilizando lactase produzida

por *Escherichia coli*. O mecanismo da reação proposto pelos autores é apresentado na Figura 2.2.

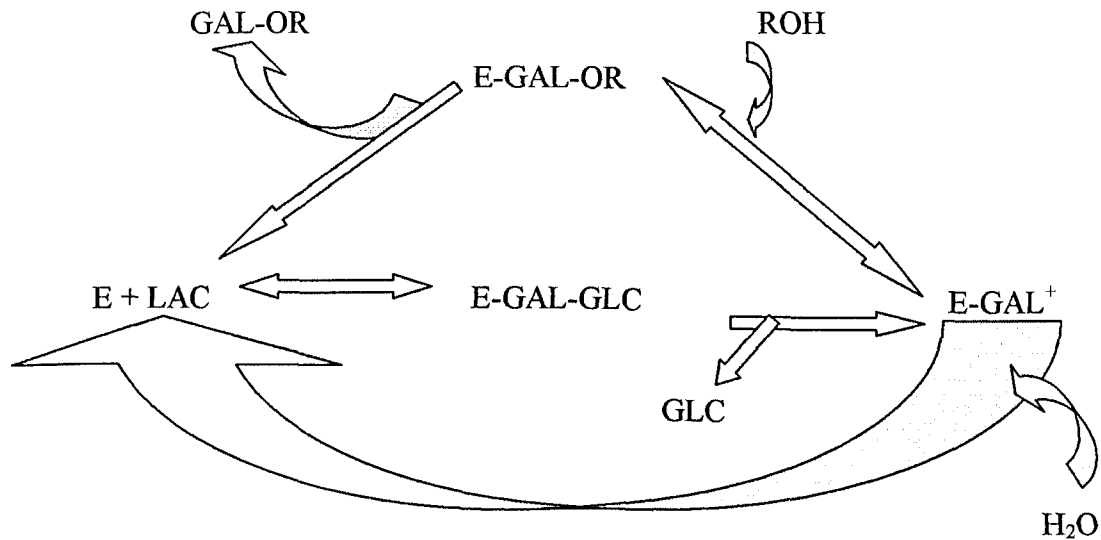


Figura 2.2: Mecanismo de reação proposto para a ação da β -galactosidase na lactose. E: enzima; LAC, lactose; GAL, galactose; GAL⁺, estado de transição; GLC, glicose; ROH, açúcar receptor; GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeo) (MAHONEY, 1998).

2.4.2 - FONTES DE β -GALACTOSIDASES

Essa enzima pode ser encontrada na natureza, distribuída entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã, bagas de café, e outros produtos de origem vegetal; em órgãos de animais como intestino, cérebro, testículos, placenta e também é produzida por grande quantidade de microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; ALMEIDA & PASTORE, 2001).

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

Leveduras: *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cândida pseudotropicalis*, *Brettanomyces anomalis* e *Wingea roberstii*.

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

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

Em 1990, Castillo identificou a levedura *Kluyveromyces lactis* como a principal fonte de lactase para a hidrólise enzimática da lactose presente no soro de queijo (BECERRA *et al.*, 2001).

As preparações comerciais de lactases de origem microbiana são a fonte mais aceitável para produção e aplicação industrial. Produzidas por fermentação, tiveram expansão significativa, pois permitiram facilidade de obtenção, flexibilidade e controle das condições dos processos de produção (concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e de células), além de baixo custo, curto ciclo reprodutivo e manipulação genética, favorecendo obtenção de enzimas com maior especificidade (ALMEIDA & PASTORE, 2001; CASTRO BRAVO *et al.*, 2000).

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 *Escheria coli*, cujo peso molecular varia entre 520.000 a 850.000 Daltons, quando comparado aos 201.000 e 90.000 Daltons da *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

Na Tabela 2.4 são apresentadas algumas propriedades de lactases microbianas, como pH ótimo, pH de estabilidade, necessidade de cofatores e faixa ótima de temperatura para ação da enzima.

Tabela 2.4 - Propriedades lactases microbianas (SEGEL, 1993).

Fonte	pH ótimo	pH estabilid.	Cofatores necessários	Temp. ótima (°C)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	2,5-8,0	-	55-60	WIDMER (1979)
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	3,5-8,0	-	50-55	PARK (1979)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5-7,5	Mn ²⁺ , K ⁺	37	MAHONEY (1978)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	7,0-7,5	Mn ²⁺ , Na ⁺	35	DICKSON (1979)
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6,0-8,0	Na ⁺ , K ⁺	40	WALLENFELS (1960)
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	-	-	55	SINGH (1979)
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	-	-	60	SINGH (1979)

Em geral, preparações comerciais de lactases de origem fúngicas, especialmente *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, são de grande importância quando as condições de operação estão numa faixa de pH ácido (2,5 - 4,5), sendo apropriadas para a hidrólise de soro ácido.

As β -galactosidases provenientes de leveduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces 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).

As enzimas de leveduras podem ser obtidas em grandes quantidades através da fermentação do soro de queijo e são relativamente baratas e apresentam temperatura ótima de atividade na faixa de 30 a 40°C, sendo uma desvantagem, pois, facilita a contaminação microbiana, sendo aconselhável, assim, um período curto de hidrólise, de 2 a 3 horas (MAHONEY, 1997).

Enquanto as preparações enzimáticas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces sp.* são usadas em processos alimentícios e, portanto, consideradas como organismo GRAS (GENERALLY RECONIZED AS SAFE) pelo FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) dos EUA, a lactase bacteriana produzida de *Escherichia coli*, embora, bastante pesquisada, apresenta problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes, não sendo utilizada na indústria alimentícia (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; COENEN *et al.*, 2000).

Na Tabela 2.5 são apresentados as principais β -galactosidases (lactases) encontradas no mercado, seus nomes comerciais, a fonte de extração, o pH e temperatura ótima para sua utilização e a atividade enzimática de cada enzima.

Tabela 2.5 - Principais lactases comerciais e suas propriedades (PIVARNIK *et al.*, 1995).

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

2.4.3 – CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β -GALACTOSIDASE

Muitos microrganismos sintetizam a β -galactosidase, entre as leveduras as principais produtoras pertencem à família *Saccharomycetaceae*, mais especificamente aos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Estes microrganismos têm como característica a reprodução por gemulação, com tempo de geração ou duplicação entre 90 a 120 minutos, desde que em condições ótimas do meio, temperatura no intervalo de 20 a 30°C e pH na faixa ácida (PELCZAR, 1981).

As características da levedura *Kluyveromyces marxianus* são de grande interesse nos processos industriais por apresentar propriedades fisiológicas para a produção de enzimas. Entre estas propriedades está a característica Lac mutante que promove o gen que regula a levedura para produzir lactase na presença de lactose, outras propriedades da levedura em questão são: a alta velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,89 \text{ h}^{-1}$), permitindo sobrepujar microrganismos contaminantes e assim diminuindo os riscos de contaminação, e o efeito *cabtree* negativo, neste caso a levedura não sofre o processo de repressão catabólica do metabolismo oxidativo devido à concentração de açúcares quando esta cresce sob condições de aeração (RECH, 1998). A levedura *K. marxianus* é utilizada como microrganismo para a produção além da lactase e etanol, utilizando como meio de fermentação soro de queijo (MAHONEY *et al.*, 1974; BALES & CASTILLO, 1979; GRUBB & MAWSON, 1993; RECH, 1998; BELEM & LEE, 1999; FURLAN *et al.*, 2001; ABAD *et al.*, 2001), como também, para a produção de enzimas pécticas (poligalacturonase) utilizadas no processamento de suco de frutas e vinhos (extração, clarificação e filtração do suco), extração de óleo vegetal, fermentação do café, cacau e do fumo e tratamento de fibras têxteis, utilizando como meio de cultura caldo de cana de açúcar ou glicose (CASTRO BRAVO *et al.*, 2000; GARCIA-GARIBAY *et al.*, 1999).

2.4.4 – CONDIÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

Ao longo dos anos, com o objetivo de produzir β -galactosidases com alta atividade, pesquisas têm sido desenvolvidas, selecionando espécies altamente produtoras e meios de cultura favoráveis para o crescimento do microrganismo. Tendo em vista este princípio,

alguns microrganismos foram selecionados, entre eles estão: *Escherichia coli*, *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.* e *Aspergillus sp.*

Além da influência do microrganismo e do meio de cultura, as condições operacionais também fazem parte deste estudo sobre a produção de β -galactosidase, englobando, o tipo e a concentração da fonte de carbono, o pH, a temperatura e a taxa de aeração, utilizados durante o processo.

Desta forma, em 1985 BARBOSA *et al.* trabalharam com *Kluyveromyces fragilis* 145 permeabilizadas com etanol ou acetona obtendo atividade de 42,0 UGI/mL e argumentaram que a adição de sulfato de amônio (0,3%) e extrato de levedura (0,1%) em soro de queijo (100,0 g/L de lactose inicial) desproteinado por acidificação, aumentou a massa celular e a produção da enzima para a cepa. A desproteínização do soro fez-se necessária devido às dificuldades na obtenção de células de leveduras em soro de queijo, em razão da precipitação de proteínas com as células de leveduras. Outra observação dos pesquisadores neste estudo, refere-se a espécie *Kluyveromyces fragilis* 276, a alta concentração celular no final da fase exponencial ($3,2 \times 10^9$ cel/mL) inibiu a atividade enzimática.

NUNES *et al.* (1993), visando a síntese de β -galactosidase, realizaram fermentações em fermentador de bancada, utilizando como meio de cultura soro de queijo desproteinado por acidificação e a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-2415. 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 permeado de soro de queijo 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. No meio com concentração inicial de lactose igual a 150,0 g/L, suplementado com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , após 28 horas de fermentação, houve consumo de 94,5 % do substrato inicial, a concentração celular atingiu 5,65 g/L e a atividade enzimática foi de 34,2 UGI/mL.

De acordo com os estudos feitos por GRUBB & MAWSON (1993) nas fermentações contendo 50 e 100 g/L de lactose inicial era completo o consumo do açúcar, contudo nas fermentações acima de 120 g/L ocorria uma diminuição na concentração celular e a 200 g/L apenas 60% da lactose inicial foi consumida.

CASTRO-GOMEZ *et al.* (1995) pesquisaram a levedura *Kluyveromyces fragilis* 71-78 com o objetivo de produzir etanol, num estudo visando obter as melhores condições operacionais para obter tal produto. A partir de cepas da levedura, em meio à base de soro de queijo não desproteinado a 150,0 g/L, e suplementado com 5,0 g/L de KH_2PO_4 e 5,0 g/L de

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 17 horas a 34°C , pH inicial de 5,3 e agitação de 300 rpm, observaram que a alta concentração de substrato no meio e as condições operacionais eram propícias para a obtenção de álcool. Além disso, verificou-se que, ao longo do processo, o pH sofreu uma queda de 5,3 para 4,5, que a maior utilização da lactose ocorreu após 7 horas de fermentação e que com 3 horas o consumo de lactose foi em torno de 20% do total, a presença significativa de etanol ocorreu entre 3 e 7 horas de fermentação (24,5 mg/mL) e o número de células de leveduras no meio foi crescente, iniciaram as fermentações com 5×10^7 células/g, que atingiram $1,17 \times 10^9$ células/g após 17 horas.

RECH (1998), apresentou em seu estudo curvas referentes ao maior crescimento das cepas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 E CBS6556 que ocorreu em fermentação realizada em fermentador com meio à base de soro de queijo (50,0 g/L) suplementado com extrato de levedura (1%), atingindo uma concentração celular de 9,0 g/L e atividade enzimática de lactase de 40,0 UGI/mL. Na fermentação também conduzida em fermentador, com meio à base de soro de queijo, mas sem a suplementação com extrato de levedura a concentração celular foi de 7,0 g/L e a atividade enzimática 30,0 UGI/mL.

FURLAN *et al.* (2001) estudaram a influência do pH, temperatura e proporção de inóculo para da produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 utilizando como meio de cultura caldo de cana de açúcar em um meio com lactose. A temperatura ótima foi avaliada em uma faixa entre 28 a 37°C , após 45 horas de fermentação concluíram que, a melhor temperatura para crescimento celular e atividade e síntese enzimática (21,8 UGI/mL) foi a 30°C e o aumento da temperatura além de 30°C implicou em diminuição da atividade enzimática. Os resultados obtidos desta análise estavam coerentes com os de trabalhos cuja fonte de carbono era soro de queijo. Analisando a influência do pH, nos meios com pH fixado em 5,5 ou 6,5 a atividade enzimática encontrada era 31,3 UGI/mL e 23,3 UGI/mL, respectivamente. Não houve diferenças significantes entre a proporção do inóculo a 1 ou 10% (v/v), assim 1% é preferível por ser mais barato.

ABAD *et al.* (2001) avaliaram um meio para maior produção da enzima por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109, composto de 50,0 g/L de lactose, 7,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5,0 g/L de extrato de levedura; 4,5 g/L de KH_2PO_4 e 0,5 g/L de Mg_2SO_4 , definindo como condições ótimas, temperatura de 30°C , pH 5,5 e agitação de 150 rpm, obtendo atividade enzimática de 32,0 UGI/mL.

Na produção da enzima em incubador rotativo utilizando *Kluyveromyces marxianus* em meio à base de soro de queijo (50 g/L lactose inicial), sem controle de pH, com pH inicial de 5,5, e temperatura à 30°C .

RECH (1998) obteve uma concentração celular de 3,0 g/L, ao adicionar extrato de levedura (1%) no meio, esta concentração foi para 7,0 g/L, em 10 horas de fermentação.

LIMA (2002) obteve atividade enzimática de 13,0 UGI/mL e concentração celular de 3,0 g/L, em 12 horas de fermentação, em meio à base de soro de queijo puro e sem desproteinização.

2.4.5 - RECUPERAÇÃO DA ENZIMA DOS MEIOS FERMENTADOS

A enzima β -galactosidase obtida por leveduras, é produzida intracelularmente, por isso há a necessidade do rompimento celular ou a permeabilização da membrana da célula sem causar desnaturação da enzima, tratamento este conhecido como autólise celular.

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, polications, proteínas básicas, ou soluções com alto poder iônico (FLORES *et al.*, 1994).

O uso de solventes orgânicos como etanol, clorofórmio e tolueno, leva em consideração a eficácia e o custo do processo. Entretanto, até agora, poucas pesquisas foram feitas referentes aos fatores afetados por estes solventes na levedura (FLORES *et al.*, 1994).

FLORES *et al.* (1994), estudaram a permeabilização de células de *Kluyveromyces lactis* (CBS 683) em relação à atividade de β -galactosidase usando clorofórmio, tolueno e etanol. O desempenho destes solventes dependeu do tempo de incubação, da temperatura de incubação e a concentração de células e solventes. A máxima atividade enzimática encontrada foi com clorofórmio ou uma mistura de clorofórmio com 10% de etanol. Partindo de uma concentração celular de 10^9 células/g, numa temperatura de 37°C o processo foi mais rápido.

NUNES *et al.* (1993), estudaram a extração da β -galactosidase das células de levedura por autólise das mesmas, utilizando clorofórmio e tolueno. A extração por clorofórmio foi mais rápida do que por tolueno quando se utiliza tempo inferior a 20 horas de autólise. Com clorofórmio foram necessárias cerca de 12 a 14 horas para obter atividade de 2,14 $\mu\text{mol ONPG/mL}$ de autolisado.min, que corresponde a 82,6% da atividade obtida em 32 horas de autólise (2,59 $\mu\text{mol ONPG/mL}$ de autolisado.min), enquanto que utilizando tolueno, em 13 horas de autólise, obteve-se atividade de 1,69 $\mu\text{mol ONPG/mL}$ de autolisado.min, 66,5% da atividade obtida em 32 horas (2,54 $\mu\text{mol ONPG/mL}$ de autolisado.min).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 – MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para obtenção de β -galactosidase foi *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da “Fundação André Tosello” de Campinas (SP), na forma liofilizada, conservada em frasco lacrado, protegido por embalagem de isopor.

3.1.2 - MEIO DE CULTURA PARA A MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas foram mantidas a 4°C, em tubos de ensaio inclinado, contendo meio de cultura composto por ágar sabouraud 65,0 g/L, recomendação indicada pelo fornecedor das cepas - “Fundação André Tosello”.

3.1.3 – SORO DE QUEIJO

O soro de leite em pó desnatado foi fornecido pela Fábrica de Produtos Alimentícios Vigor S/A, localizada na cidade de São Gonçalo do Sapucaí (MG), contendo a seguinte composição química aproximadamente: mínimo 72% de lactose, mínimo de 11% de proteína total, mínimo de 8% de sais minerais.

Assim que chegou, o soro foi separado em pequenas quantidades e armazenado em sacos plásticos e mantidos fechados.

3.1.4 - SOLUÇÕES TAMPÃO

3.1.4.1 – Tampão fosfato

Para a lavagem das células, utilizou-se tampão fosfato (0,1 M) - pH 6,6, preparado a partir das soluções estoque de fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico.

3.1.4.2 – Tampão láctico

Para análise da atividade enzimática, utilizou-se tampão láctico 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 3.1

Tabela 3.1 – Concentrações dos sais no tampão láctico (NOVO NORDISK, 1993).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$	0,795
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	1,663
K_2SO_4	0,180
K_2HPO_4	0,520
KH_2PO_4	1,470
KOH	1,090
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,830
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,750
NaOH	0,800
$NaHCO_3$	0,280

Os componentes, depois de pesados e dissolvidos em água destilada, foram transferidos para um balão volumétrico de 1 L, 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 restante com água destilada.

3.1.5 – MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO

Os reagentes e sais usados para as análises e nos meios de cultura apresentaram grau de pureza analítica.

Para o cultivo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, dois meios líquidos foram utilizados nos ensaios, um à base de lactose (PA) e outro à base de soro de queijo em pó.

Os diferentes meios de cultura utilizados durante o procedimento experimental são apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2 – Composição do meio de cultivo à base de lactose (PA).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Lactose	50,0
Extrato de levedura	(0,0; 6,0; 12,0) – variável
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	5,0
Mg ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	0,6

Tabela 3.3 – Composição do meio de cultivo à base de soro de queijo.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Lactose	(30,0; 50,0; 70,0) - variável
Extrato de levedura	(0,0; 6,0; 12,0) - variável
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	5,0
Mg ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	0,6

3.1.6 - UNIDADE EXPERIMENTAL PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A unidade experimental utilizada na realização dos ensaios de laboratório está representada esquematicamente na Figura 3.1. Consistia de microrreatores de mistura colocados em paralelo e operados em batelada (4) com volume útil de 100 mL ligados a um

banho termostático (1) contendo um mecanismo de recirculação que mantinha a temperatura constante. O mecanismo de agitação era promovido por um agitador mecânico (2), de paleta, com diâmetro de 0,08 m, colocado a 0,02 m do fundo do microrreator. Para evitar a formação de vórtice foi adaptado um sistema de quatro chicanas de 0,01 m de largura, 0,09 m de altura e 0,01 m de espessura, construída em aço inox e fixada na tampa de acrílico, adaptada ao reator. A lactase foi inativada, após os tempos de reação desejados para a caracterização da enzima, através de aquecimento por cinco minutos em um banho com água em ebulição (3) (TOMÁS, 1998).

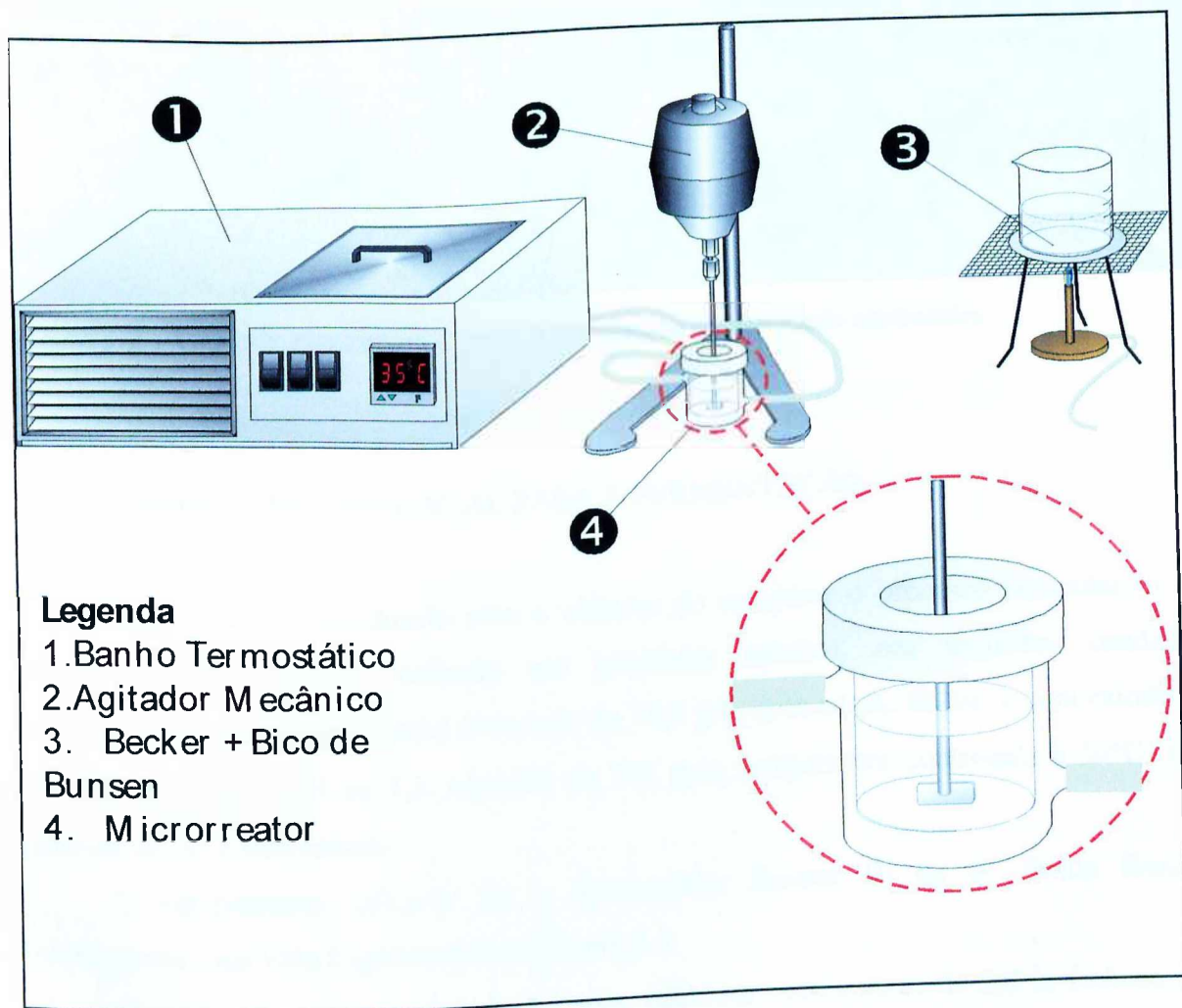


Figura 3.1 – Representação esquemática da unidade experimental para a determinação da atividade enzimática.

Os microrreatores foram colocados em paralelo e operados em batelada para conduzir os experimentos de determinação da atividade enzimática utilizando solução de lactose 50,0 g/L, conforme apresentado na Figura 3.2.

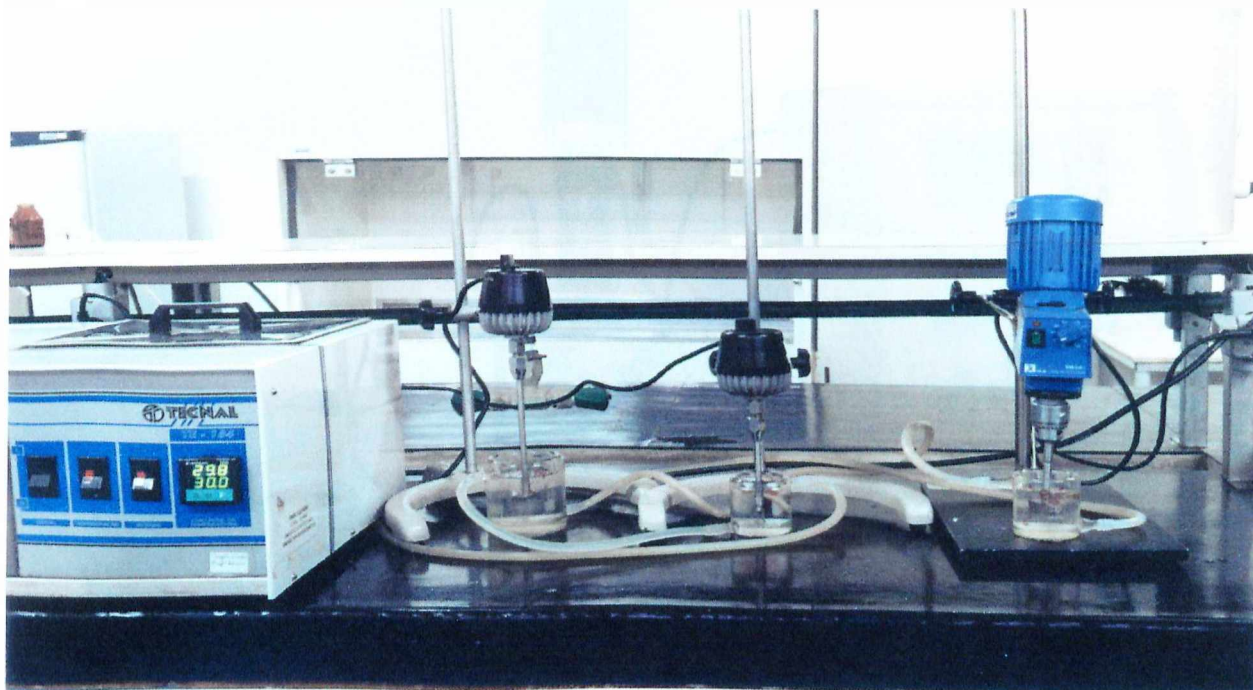


Figura 3.2 – Unidade experimental para determinação da atividade enzimática

3.1.7 - UNIDADE EXPERIMENTAL PARA A FERMENTAÇÃO

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de comparar o processo fermentativo em minifermentador, com o realizado em incubador rotativo, nas seguintes condições operacionais: concentração inicial de lactose de 50,0 g/L, com adição de sais e com extrato de levedura a 6,0 g/L, pH de 5,5, agitação de 150 rpm, temperatura controlada a 30°C, sem controle de pH e sem aeração.

O equipamento utilizado foi o fermentador Biostat B, da B. Braun Biotech International, cuja vista é apresentada na Figura 3.3.

O minifermentador 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.

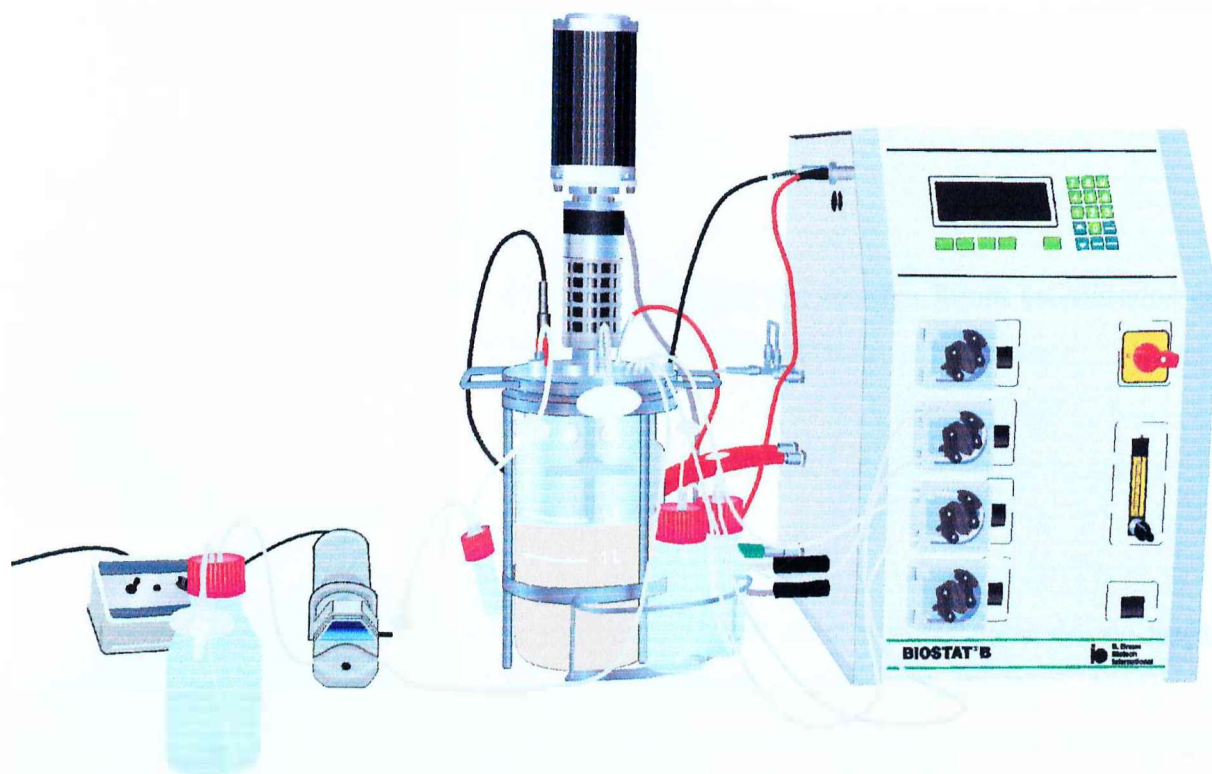


Figura 3.3 - Unidade experimental utilizada para conduzir as fermentações finais

3.2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 – PREPARAÇÃO DOS MEIOS

Para a preparação do meio de cultura à base de lactose (PA) determinou-se a massa dos reagentes, sais e extrato de levedura na concentração apresentada na Tabela 3.2. Em seguida, diluíram-se todos os compostos com água destilada até obter 2 L.

A preparação do meio de cultura à base de soro de queijo em pó consistiu de uma etapa adicional sobre o tratamento do soro de queijo, após a pesagem dos reagentes, sais e extrato de levedura na concentração apresentada na Tabela 3.3.

Realizada a precipitação de grande parte das proteínas, conforme descrito no Item 3.2.3, adicionou-se a solução os sais e o extrato de levedura, avolumando com água destilada até obter 2 L.

Após a preparação do meio líquido, este foi dividido em erlenmeyers para ser utilizado no preparo do inóculo e na fermentação. Em seguida, o pH foi corrigido com solução NaOH (4 N) até pH – 5,5, e os erlenmeyers tampados com algodão envoltos em gazes e esterilizados em autoclave.

3.2.2 – ESTERILIZAÇÃO

Todos os meios de cultura e vidrarias utilizados no trabalho foram esterilizados em autoclave vertical, marca Fanen, a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

3.2.3 – PRÉ-TRATAMENTO DO SORO DE QUEIJO

O pré-tratamento do soro de queijo foi necessário para remover parte de sua fração protéica presente, precipitando a proteína por aquecimento e acidificação (PORTO, 2001).

Neste procedimento a solução de soro de queijo foi aquecida até 90°C. Em seguida, adicionou-se ácido láctico (PA) sob agitação suave até o pH atingir 4,8. A agitação era então interrompida e a solução mantida em repouso por alguns minutos, para que fosse cuidadosamente sedimentada, visto que os flocos de proteína formados eram bastante instáveis podendo se misturar novamente à solução, e finalmente filtrada.

Após a etapa de pré-tratamento do soro, a solução obtida foi então transferida para outro becker, no qual os sais e extrato de levedura foram adicionados. O pH foi corrigido com solução NaOH (4 N) até pH 5,5 e os erlenmeyers tampados com algodão envoltos em gazes foram esterilizados.

3.2.4 – PREPARO DO PRÉ- INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado em frasco erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 350 mL do mesmo meio de cultura da fermentação previamente esterilizado em autoclave.

Após a esterilização, o frasco erlenmeyer era resfriado a 27°C e colônias isoladas de levedura, mantidas em ágar inclinado, foram transferidas para o frasco erlenmeyer de forma asséptica em câmara de fluxo laminar, da marca Veco.

Esta transferência foi feita suspendendo as colônias do tubo de ensaio, com a adição do próprio meio de cultura presente no erlenmeyer, e esfregando a superfície do meio com uma alça de platina flambada.

Após inoculação, o frasco foi incubado a 30°C por um tempo máximo de 17 horas em incubador rotativo com agitação de 150 rpm.

3.3 – PLANEJAMENTO FATORIAL

Para realização dos experimentos empregou-se o planejamento fatorial 3^K , onde K igual a 2, utilizando *software* Statistica, versão 5,0, para tratamento dos dados. A desvantagem deste fatorial é que valores altos de K implicam em um grande número de experimentos.

As concentrações de nutrientes analisadas foram: concentração inicial de lactose no meio e concentração de extrato de levedura.

Os nove experimentos definidos pelo planejamento fatorial 3^2 têm seus valores relacionados às variáveis decodificadas nos níveis representados por (+1), (0) e (-1) e estão apresentados na Tabela 3.4.

Os níveis selecionados para este planejamento basearam-se em estudos preliminares. As concentrações iniciais de lactose foram 30,0; 50,0 e 70,0 g/L e as concentrações de extrato de levedura foram 0,0; 6,0 e 12,0 g/L.

3.4 – FERMENTAÇÕES

Os ensaios foram iniciados com uma concentração padronizada do número de células de leveduras igual a 1×10^7 células/mL, empregando para a contagem a câmara de Neubauer.

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 125 mL do meio de cultura selecionado, previamente esterilizado e inoculado como indicado no Item 3.2.3.

Posteriormente, transferiu-se os frascos para um incubador rotatório, da marca Ética, com temperatura controlada a 30°C, agitação 150 rpm durante 12 horas.

Após analisar os resultados dos ensaios do planejamento fatorial, utilizou-se um minifermentador, Biostat (B. Braun), com o meio de cultura selecionado para a produção da enzima.

Tabela 3.4 – Experimentos definidos pelo planejamento 3^2

Experimento	Cód	Lactose inicial (g/L)	Cód	Extrato de levedura (g/L)
1	0	50,0	1	12,0
2	1	70,0	0	6,0
3	-1	30,0	-1	0,0
4	-1	30,0	0	6,0
5	1	70,0	1	12
6	0	50,0	-1	0,0
7	1	70,0	-1	0,0
8	-1	30,0	1	12,0
9	0	50,0	0	6,0

3.5 – ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES

Com o objetivo de acompanhar o processo, métodos analíticos foram aplicados às amostras retiradas dos frascos erlenmeyer a cada 2 horas. Todas as medidas efetuadas por método analítico foram em duplicata.

Destas amostras, determinou-se a concentração celular, açúcares totais – lactose e atividade enzimática da β -galactosidase.

A seguir apresentam-se as medidas efetuadas no decorrer de cada ensaio.

3.5.1 – DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

O acompanhamento do crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* ao longo das fermentações foi realizado pela determinação da massa seca, descrito a seguir.

Da quantidade retirada do erlenmeyer, suficiente para fazer todas as dosagens propostas no trabalho, uma amostra de 40 mL do meio em fermentação foi centrifugada em centrífuga (Beckmann Coulter – modelo Avanti J-25) com rotação de 15000 rpm no período de 5 minutos e seu sobrenadante descartado.

Em seguida, as células precipitadas foram lavadas e centrifugadas duas vezes em água destilada até o sobrenadante apresentar-se límpido. Após a centrifugação, a amostra foi novamente suspensa em água destilada e armazenada em beakers previamente preparados (105°C/24 horas) e levados à estufa a 105°C por 24 horas.

A determinação da massa seca celular foi feita pela diferença do peso inicial e o peso final dos beakers.

3.5.2 – DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS - LACTOSE

As dosagens para a determinação da concentração de açúcares totais, calculados como lactose, seguiram o método fenol – ácido sulfúrico, proposto por BARALLE (1985) e por RECH (1998).

Esta determinação consistia, inicialmente, de uma diluição de uma amostra de 1mL do meio em fermentação, a fim de atender à faixa de operação do método - concentração de açúcares na faixa entre 5,0 e 40,0 mg/L.

Em seguida, da amostra convenientemente diluída, pipetava-se 100 µL, colocava-se em um tubo de ensaio e adicionavam-se 700 µL de água destilada, 50 µL de solução de fenol 80% e 2 mL de ácido sulfúrico (PA). Agitava-se bem o tubo para completa homogeneização e incubava-se por 30 minutos à temperatura ambiente, realizando a leitura de absorbância em espectrofotômetro (Modelo B 380 da Micronal) a 490 nm.

O branco foi feito juntamente com as amostras, substituindo a amostra de açúcar redutor, por 100 µL de água destilada.

Para a construção da curva padrão, foi preparada solução de lactose (C=100 mg/L) denominada de solução-mãe, com concentração na faixa de 5,0 a 40,0 mg/L de açúcares redutores, com o auxílio desta curva padrão e da equação determinada, obteve-se a

concentração (g/L) de lactose consumida. Os procedimentos para construção da curva, bem como, a equação obtida, encontram-se descritos no Anexo B.

3.5.3 - EXTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DAS CÉLULAS DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* POR AUTÓLISE

Para a extração da enzima intracelular β -galactosidase das células de *Kluyveromyces marxianus* por autólise utilizou-se como solvente clorofórmio (PA), conforme procedimento descrito por NUNES *et al.* (1993).

O procedimento abaixo descreve o tratamento para efetuar o rompimento de células.

Retirava-se uma amostra de 80 mL do meio em fermentação contendo as células de *Kluyveromyces marxianus*. As amostras eram submetidas a uma centrifugação a 15000 rpm por 5 minutos e o material celular separado e lavado em tampão fosfato (preparado conforme descrito no Item 3.1.6.1) a fim de proceder a uma lavagem de células.

Esta nova suspensão era novamente centrifugada, o material celular separado ressuspenso em 10 mL de tampão fosfato em erlenmeyer, ao qual adicionava-se 2% (v/v) de clorofórmio (PA) e transferia-se para um incubador rotativo com temperatura a 37°C, agitação de 150 rpm por 17 horas.

Após as 17 horas, a solução era novamente centrifugada e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática.

3.5.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática, em todos os experimentos, foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose, utilizando a unidade experimental descrita no Item 3.1.6 e na Figura 3.2 (TOMÁS, 1998).

No microrreator de mistura com temperatura controlada a 30°C colocava-se 75 mL de uma solução 50,0 g/L de lactose (PA) em tampão láctico a pH 6,5, preparado conforme descrito no Item 3.1.4.2.

Em seguida, pipetava-se 5 mL do sobrenadante, obtido após o processo de extração da enzima relatado no Item 3.3.3, no microrreator.

Neste instante iniciava-se a quantificação do tempo de reação de 20 minutos, amostras de 3 mL eram retiradas em intervalos de 5 minutos e colocadas em tubos de ensaio com tampa

e em seguida, colocadas imediatamente em banho de água fervente por 10 minutos para inativação da enzima.

Posteriormente, dosava-se 20 μL da amostra do tubo pelo método da glicose-oxidase, conforme descrito no Item 3.2.4.

Os ensaios eram acompanhados por medidas de absorbância da glicose formada, lidas num comprimento de onda de 505 nm em um espectrofotômetro B 380, da Micronal.

Com os dados de absorbância, calculava-se a concentração através da curva de calibração de glicose em função do tempo, descrita no Anexo B.

Para o cálculo da atividade, determinava-se a velocidade inicial da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase, utilizando uma regressão linear no conjunto de pontos experimentais de concentração de glicose em função do tempo de reação, na faixa em que apresentou comportamento linear. Para todas as curvas de regressão encontradas foi adotado o critério de desvio padrão menor que 10^{-3} .

Desta forma, tem-se a equação:

$$V = \frac{dC}{dt} = \text{tg}\alpha$$

onde:

V = velocidade de reação

C = concentração de glicose

t = tempo de reação

A velocidade da reação expressa pela equação acima é definida como sendo a atividade enzimática. A unidade da taxa em g de produto formado (ou substrato consumido) por unidade de volume e de tempo é denominada de unidade de atividade.

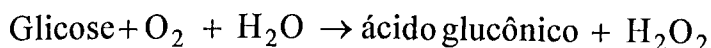
Para todas as dosagens foram feitas triplicatas, sendo a atividade enzimática calculada pela média aritmética dos valores obtidos.

A unidade de atividade usada no trabalho foi Unidade de Glicose produzida por minuto, por mililitro de suspensão enzimática (UGI/mL), definida como sendo 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 igual a 50,0 g/L.

3.5.5 - DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A glicose foi dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se Kits glicose enzimática, conforme procedimento descrito por TOMÁS (1998).

Esse método é específico para a determinação de glicose e se baseia na oxidação da mesma, de acordo com a seguinte reação, catalisada pela glicose-oxidase:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol presentes no meio, sob a ação da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, cuja intensidade de sua cor vermelha é proporcional à concentração de glicose no meio. Esse composto de tonalidade vermelha apresenta a sua máxima absorção de luz num comprimento de onda de 505 nm.

O Kit de glicose oxidase era composto de três frascos, sendo que nos dois de número 1 continham uma mistura de enzimas e no de número 2, que continha uma solução tampão, juntamente com os reagentes 4-aminoantipirina e o fenol. Diluía-se o conteúdo do frasco 2 com o volume de 100 mL de solução, em 500 mL com água destilada e posteriormente dividia-se a solução obtida em dois frascos escuros, cada um com 250 mL. Essa solução era estável por 12 meses a uma temperatura entre 2 e 8°C. Em um desses frascos era adicionado o conteúdo de um dos frascos de número 1, o qual continha a glicose oxidase e a peroxidase.

Essa mistura estava pronta para reação em amostras contendo glicose. Essa solução era estável por 2 meses.

Para a determinação do teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi à construção de uma curva padrão ou de calibração que era determinada através da leitura de absorbância em função de concentrações conhecidas de glicose. Para isso, preparou-se tubos de ensaio contendo 2 mL da solução de glicose-oxidase preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 3,0 g/L, deixando-se reagir por 30 minutos a 30°C, como descrito no Anexo B.

Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias para os vários tubos, em um espectrofotômetro B 380, da Micronal, usando cubetas de vidro de 1 cm de percurso ótico, a 505 nm, considerando como branco, a solução de glicose oxidase.

Com os valores de absorbância em função da concentração de glicose, foi construída a curva e determinada a equação da mesma.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - RESULTADOS PRELIMINARES

Numa etapa inicial deste trabalho, fermentações foram realizadas com a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, em meios de cultura à base de lactose (PA) e soro de queijo, com o objetivo de analisar a influência da suplementação do meio de cultivo com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura, na concentração celular e na atividade enzimática.

Analisando também a necessidade da desproteínização do soro utilizado como meio nas fermentações. Os primeiros ensaios conduzidos com soro sem remoção da fração protéica tiveram as análises de concentração celular por massa seca dificultadas, uma vez que as proteínas precipitavam junto com as células de leveduras após a centrifugação.

Após esta etapa inicial, realizaram-se as fermentações apenas em soro de queijo em pó, desproteínado por acidificação, com as concentrações definidas de sais e extrato de levedura.

Os experimentos nesse trabalho foram efetuados à temperatura de 30°C e pH 5,5. Segundo FURLAN *et al.* (2001), condições operacionais ótimas para a produção da enzima β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, pois nesse valor a enzima apresenta-se estável e isso implica em alta taxa de produção.

Todos os ensaios foram em incubador rotativo com agitação de 150 rpm, utilizando erlenmeyers de 500 mL, contendo 125 mL de meio, ao qual se adicionava o inóculo. Após o crescimento, as células foram separadas do meio de fermentação por centrifugação e realizada a autólise das mesmas pelo uso de clorofórmio.

4.1.1 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM SAIS E EXTRATO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PELO *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ATCC 46537 EM MEIO À BASE DE LACTOSE (PA).

Na primeira fermentação, o meio de cultura foi composto apenas de solução lactose (PA) numa concentração inicial de 50,0 g/L, com o pH corrigido para 5,5. Nesse meio não houve crescimento celular durante o tempo de fermentação de 12 horas.

Na segunda fermentação, o meio de cultura foi composto por solução de lactose (PA) também com concentração inicial de 50,0 g/L, agora suplementada com 6,0; 5,0 e 0,6 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente, mas a exemplo do experimento anterior, também não se verificou crescimento celular sensível, nem consumo do açúcar.

Dessa forma, concluiu-se que apenas a adição de sais no meio contendo lactose (PA) não era suficiente para o crescimento da levedura. Resolveu-se então suplementar o meio com extrato de levedura, além dos sais citados anteriormente.

Com base nessas conclusões, conduziu-se uma fermentação com solução lactose (PA) com concentração inicial de 50,0 g/L, suplementada com os sais nas mesmas concentrações anteriores e extrato de levedura a 6,0 g/L, cujos resultados são apresentados na Figura 4.1.

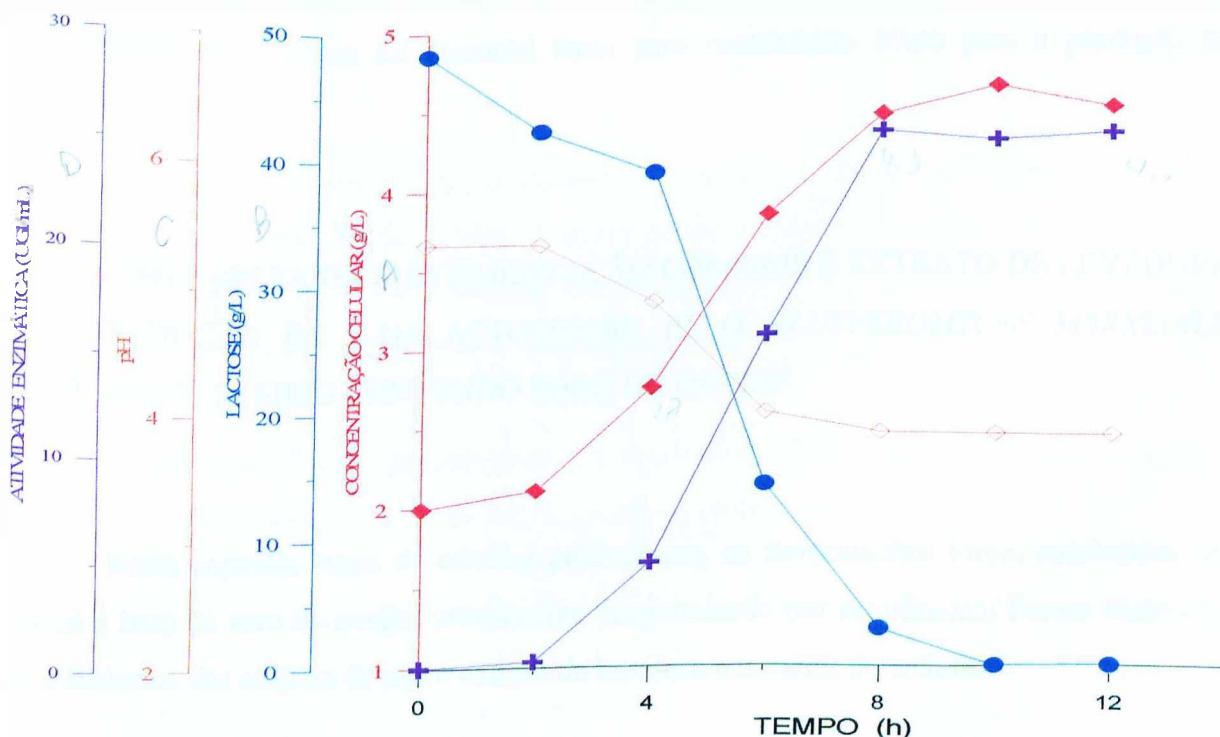


Figura 4.1: Fermentação em meio à base de solução lactose (PA), S = 50,0 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6,0 g/L.

Verifica-se na Figura 4.1 que o meio de cultura agora se mostrou adequado ao crescimento da levedura, bem como para a síntese da enzima. Pode ser verificado que bastaram 8 horas de fermentação para que a cultura entrasse na fase de crescimento estacionário, o mesmo ocorrendo com a produção de β -galactosidase. O consumo de lactose foi total em 10 horas de fermentação.

Analisando a curva referente ao crescimento celular, observa-se que esta apresentou uma pequena fase lag, atingindo rapidamente a fase exponencial, mostrando a adequação do meio para o desenvolvimento da levedura, a qual atingiu uma concentração celular da ordem de 4,6 g/L após 10 horas de fermentação, permanecendo praticamente constante a partir deste momento.

A síntese da enzima acompanhou o crescimento celular, num comportamento cinético típico de processo de produção associado ao crescimento celular, atingindo máxima atividade enzimática de 25,0 UGI/mL após 8 horas, mantendo esse valor até o final da fermentação.

Iniciou-se a fermentação com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir após 6 horas o valor 3,8, mantendo-se até o final do processo, coincidindo com o período da fase estacionária de crescimento celular.

Por estes resultados conclui-se que a suplementação do meio à base de lactose (PA) com extrato de levedura foi essencial tanto para crescimento como para a produção da enzima.

4.1.2 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM SAIS E EXTRATO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PELO *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ATCC 46537 EM MEIO CONTENDO SORO DE QUEIJO

Nesta segunda etapa de estudos preliminares, as fermentações foram conduzidas em meios à base de soro de queijo, previamente desproteinado por acidificação. Foram analisadas as influências das adições de sais e extrato de levedura nos meios de cultura.

Na Figura 4.2 são apresentados os resultados experimentais de concentração celular (g/L) em função do tempo fermentação, em dois meios de cultura formulados com soro de queijo, de forma tal que a concentração de lactose inicial em ambos fosse de 30,0 g/L.

Em um dos meios adicionou-se os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L e no outro experimento não foi acrescentado nenhum nutriente extra ao soro de queijo.

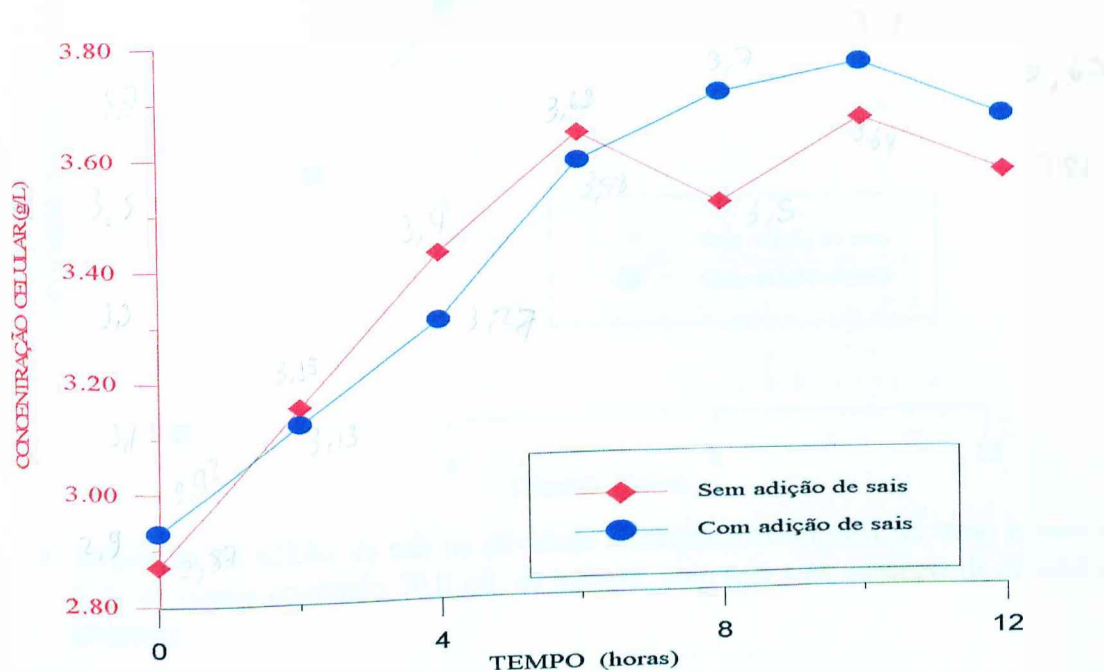


Figura 4.2: Influência da adição de sais na concentração celular (g/L) no meio a base de soro de queijo contendo 30,0 g/L de lactose, com sais e na ausência de extrato de levedura.

Como pode ser observado na Figura 4.2, a presença dos sais nos meios teve pouca influência sobre o crescimento celular. A concentração celular, após 8 horas de fermentação, atingiu 3,75 g/L no meio suplementado com os sais e 3,5 g/L no meio sem os mesmos, diferença esta que pode estar dentro do erro experimental.

Na Figura 4.3 são apresentados os resultados obtidos da fermentação anterior, analisando a influências da adição de sais na atividade enzimática.

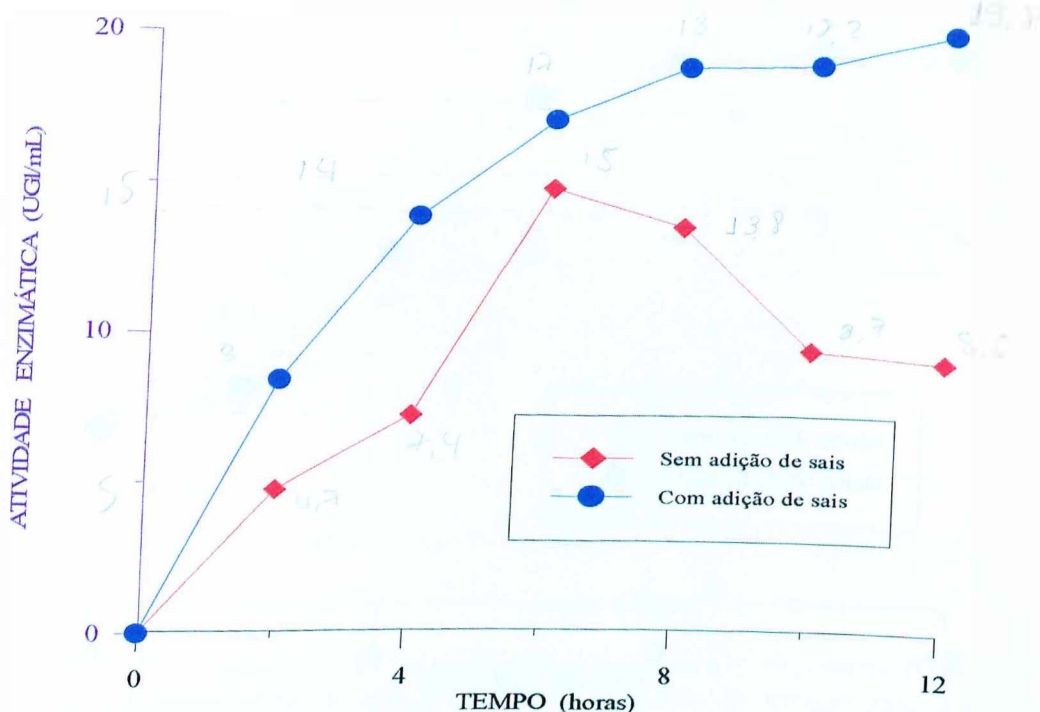


Figura 4.3: Influência da adição de sais na atividade enzimática (UGI/mL) no meio a base de soro de queijo contendo 30,0 g/L de lactose, com sais e na ausência de extrato de levedura.

Verifica-se que as curvas referentes às atividades enzimáticas nos dois experimentos foram próximas até 6 horas de fermentação, contudo a partir desse instante, a atividade enzimática diminuiu no meio na ausência de sais, enquanto que para o outro meio esta continuou aumentando até a fermentação ser interrompida em 12 horas.

A presença dos respectivos íons atuou como estabilizante da enzima produzida e também como tamponante do meio, uma vez que há a formação de ácidos, tais como o lático pelo metabolismo da levedura.

Na fermentação efetuada sem adição de sais, a atividade foi de aproximadamente 15,0 UGI/mL, enquanto que adicionando sais no meio esta atingiu 20,0 UGI/mL.

Na Figura 4.4 verifica-se o resultado experimental de duas fermentações analisadas em termos da concentração celular em função do tempo de fermentação no meio à base de soro de queijo desproteinado por acidificação com concentração inicial de lactose de 60,0 g/L. Um dos meios era composto de soro de queijo e extrato de levedura 6,0 g/L, enquanto que no outro havia apenas soro de queijo, em ambos não foi adicionado os sais citados anteriormente.

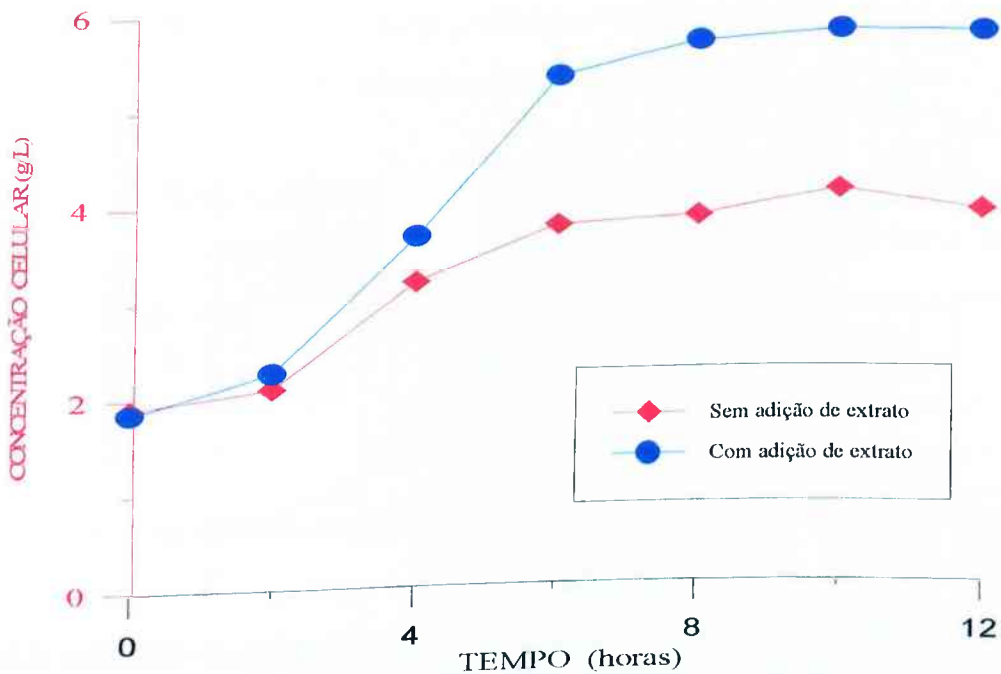


Figura 4.4: Influência da adição de extrato de levedura na concentração celular (g/L) no meio a base de soro de queijo contendo 60 g/L de lactose com extrato de levedura e na ausência de sais.

Através dos resultados acima apresentados, conclui-se que a presença do extrato de levedura foi favorável ao crescimento celular, pois em presença do mesmo a concentração celular atingiu 5,8 g/L e na ausência, 3,8 g/L, após 8 horas de fermentação.

Comparando os resultados da Figura 4.2 com os da Figura 4.4, observa-se que o nutriente extrato de levedura tem uma influência maior sobre o crescimento do que os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações usadas.

Na Figura 4.5 são apresentados os resultados experimentais para a atividade enzimática em função do tempo de fermentação para os meios à base de soro de queijo contendo 60g/L de lactose, em presença e ausência de extrato de levedura a 6,0 g/L e na ausência de sais.

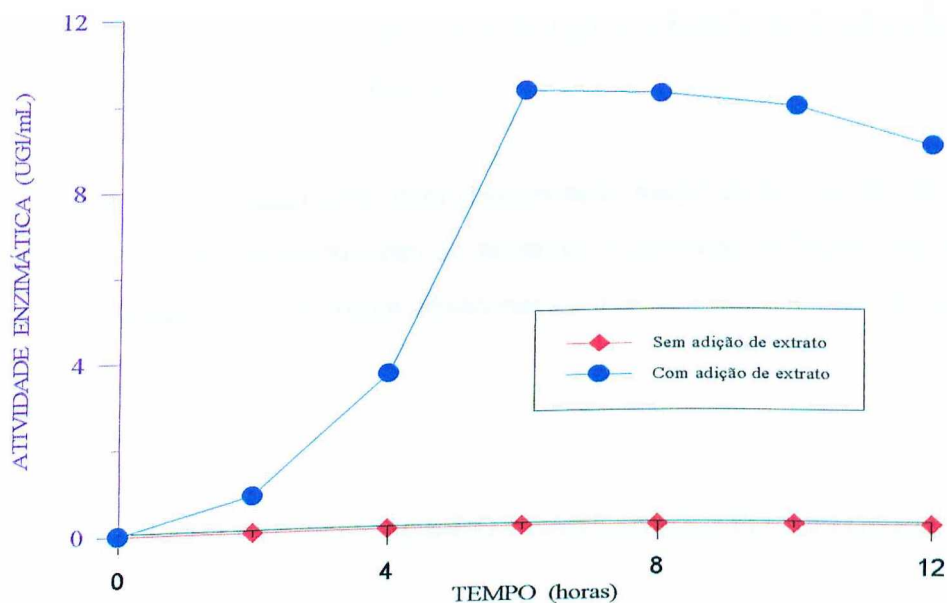


Figura 4.5: Influência da adição de extrato de levedura na atividade enzimática (UGI/mL) no meio a base de soro de queijo contendo 60,0 g/L de lactose com extrato de levedura e na ausência de sais.

Pode-se verificar através da Figura acima que o meio isento de extrato de levedura não apresentou atividade enzimática, enquanto que na presença do mesmo, esta atingiu um valor da ordem de 10,0 UGI/mL.

Comparando as Figuras 4.3 e 4.5, verifica-se que tanto os sais estudados neste trabalho, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações citadas anteriormente, quanto o extrato de levedura influenciaram na síntese da enzima, sendo que a influência do extrato foi mais acentuada.

O estudo da influência de sais e do extrato de levedura em meios à base de lactose (PA) e de soro de queijo em pó, apresentou como resultado conclusivo, a necessidade da adição dos mesmos nas fermentações com *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, visando crescimento celular e síntese da enzima β -galactosidase.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos preliminares, optou-se por realizar um estudo do crescimento e produção da enzima β -galactosidase, em meios de cultura formulados, usando como fonte de carbono a lactose proveniente de soro de queijo desproteinado por acidificação. Nesse estudo, foram fixadas as concentrações dos sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6

g/L, variando-se a concentração de lactose de 30,0 a 70,0 g/L e o extrato de levedura de 0,0 a 12,0 g/L, de acordo com um planejamento fatorial 3^2 .

Foram realizadas duas fermentações com concentração inicial de lactose de 90,0 g/L, porém observou-se que em altas concentrações de substrato, o consumo de lactose foi lento e não houve atividade enzimática, assim foram abandonadas, uma vez que seus resultados não foram conclusivos.

4.2 – RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

4.2.1- INTRODUÇÃO

Após avaliar a importância da suplementação dos meios de cultura com sais e extrato de levedura, realizou-se um conjunto de nove experimentos segundo um planejamento fatorial, avaliando as variáveis: concentração de lactose presente no soro de queijo e concentração de extrato de levedura. O procedimento experimental adotado está descrito no Item 3.2.5. O tempo de duração das fermentações foi de 12 horas, com amostragens de 2 em 2 horas, definido com base nos experimentos anteriores, uma vez que, para tempos maiores não houve aumento sensível na atividade enzimática alcançada. Esse fato também foi observado por outros pesquisadores, como por exemplo, o trabalho de NUNES *et al.* (1993).

Todos os ensaios desta etapa foram realizados em meios à base de soro, com concentrações variáveis de lactose e de extrato de levedura conforme o planejamento fatorial, descrito no Item 3.2.3, mantendo constantes as concentrações dos sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 6,0 g/L; KH_2PO_4 em 5,0 g/L e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 0,6 g/L em todos os ensaios.

4.2.2-FERMENTAÇÕES RELATIVAS AOS MEIOS COM LACTOSE A 30,0 g/L

A seguir são apresentados três ensaios referentes à fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, com

concentração de lactose 30,0 g/L, mantendo constantes as concentrações de sais, com concentrações de extrato de levedura de 0,0; 6,0 e 12,0 g/L.

Na Figura 4.6 são apresentados os resultados de crescimento celular, atividade enzimática, consumo de lactose e variação do pH, para a fermentação do meio sem extrato de levedura, nas demais condições do experimento.

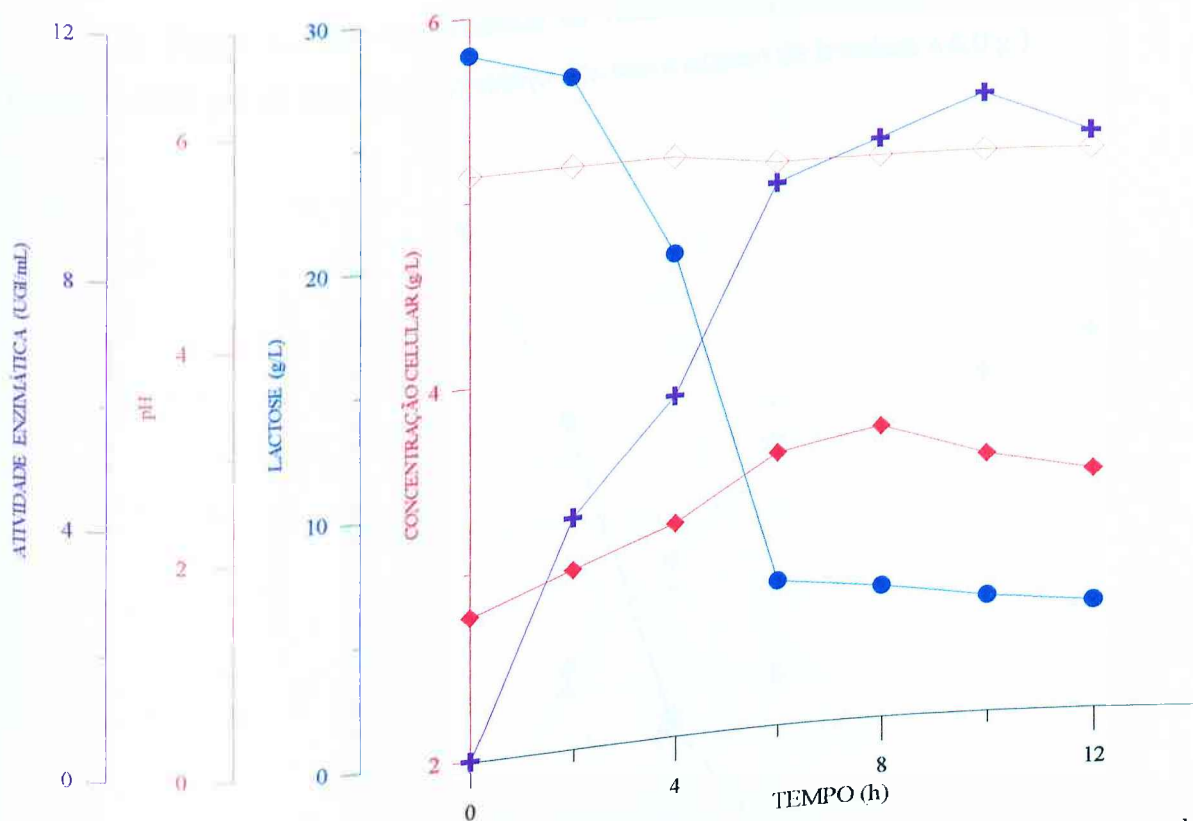


Figura 4.6 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.

Analisando a Figura 4.6, verifica-se que o crescimento celular atingiu a fase estacionária 8 horas após a inoculação e que a atividade da enzima atingiu seu maior valor após 10 horas de fermentação, decrescendo a seguir, mesmo com lactose ainda presente no meio.

A concentração celular foi de 3,6 gramas de células secas por litro de meio fermentado, após 8 horas de fermentação. Após este ponto, a concentração celular no meio sofreu um declínio, devido provavelmente à falta de algum nutriente. A atividade enzimática foi de 10,0 UGI/mL após 10 horas. A seguir, notou-se uma diminuição da atividade, que acompanhou o decréscimo da concentração celular.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir após 6 horas, o valor 5,3, mantendo-se constante até o final do processo.

Portanto, conclui-se que no meio a 30,0 g/L sem adição de extrato de levedura, tanto o crescimento celular como a atividade, foram baixos, sugerindo que o meio necessita de outro nutriente.

Na Figura 4.7 são apresentados os resultados da fermentação realizada no meio contendo 30,0 g/L de lactose, em presença dos sais e extrato de levedura a 6,0 g/L.

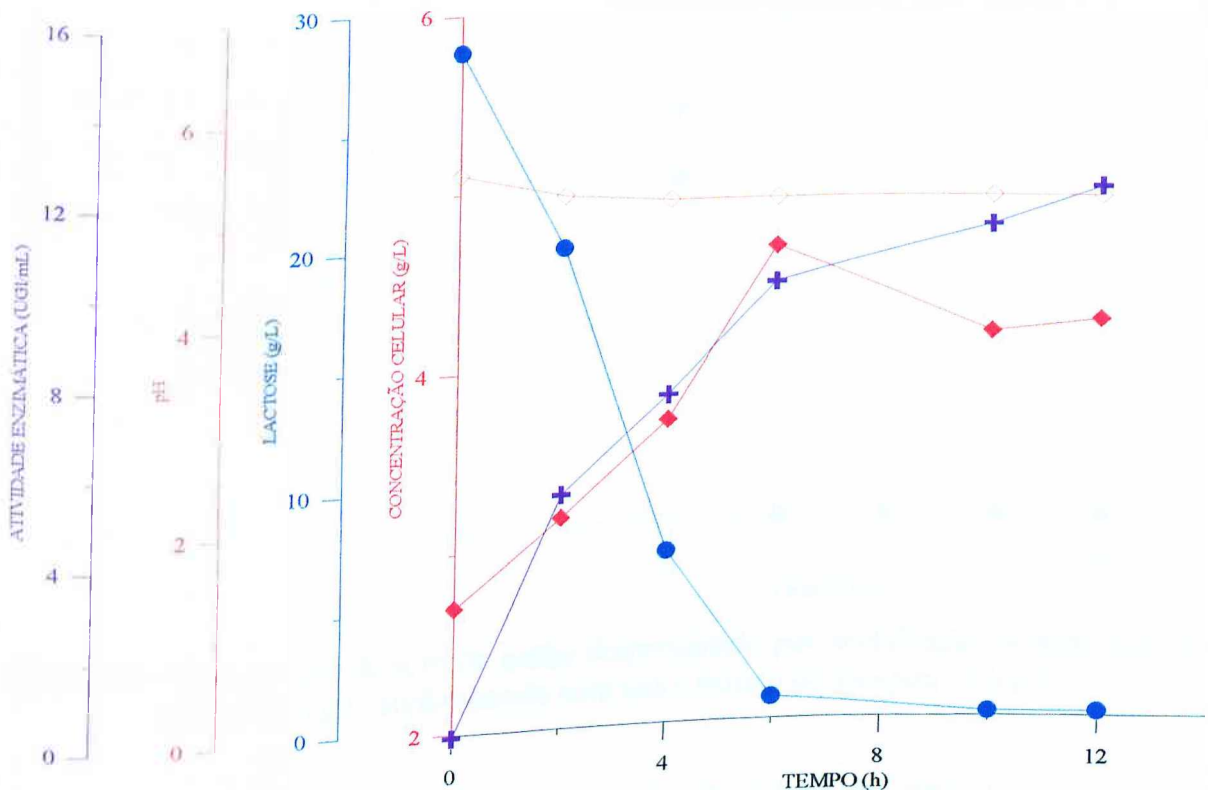


Figura 4.7 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.

Uma análise desta Figura revela que novamente a fase lag foi desprezível, havendo um crescimento exponencial até 6 horas de fermentação, atingindo 4,6 g/L, iniciando um declínio na concentração de biomassa a partir desse ponto.

A atividade enzimática continuou a aumentar, mesmo depois de esgotada a fonte de carbono, atingindo atividade enzimática de 12,0 UGI/mL em 12 horas, provavelmente utilizando uma fonte de carbono presente no extrato de levedura.

Não houve grande variação no valor do pH que iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo atingiu o valor 5,10, mantendo-se até o final do processo.

Na Figura 4.8 são apresentados os resultados obtidos durante a fermentação de meio a 30,0 g/L de lactose, com a adição de 12,0 g/L de extrato de levedura.

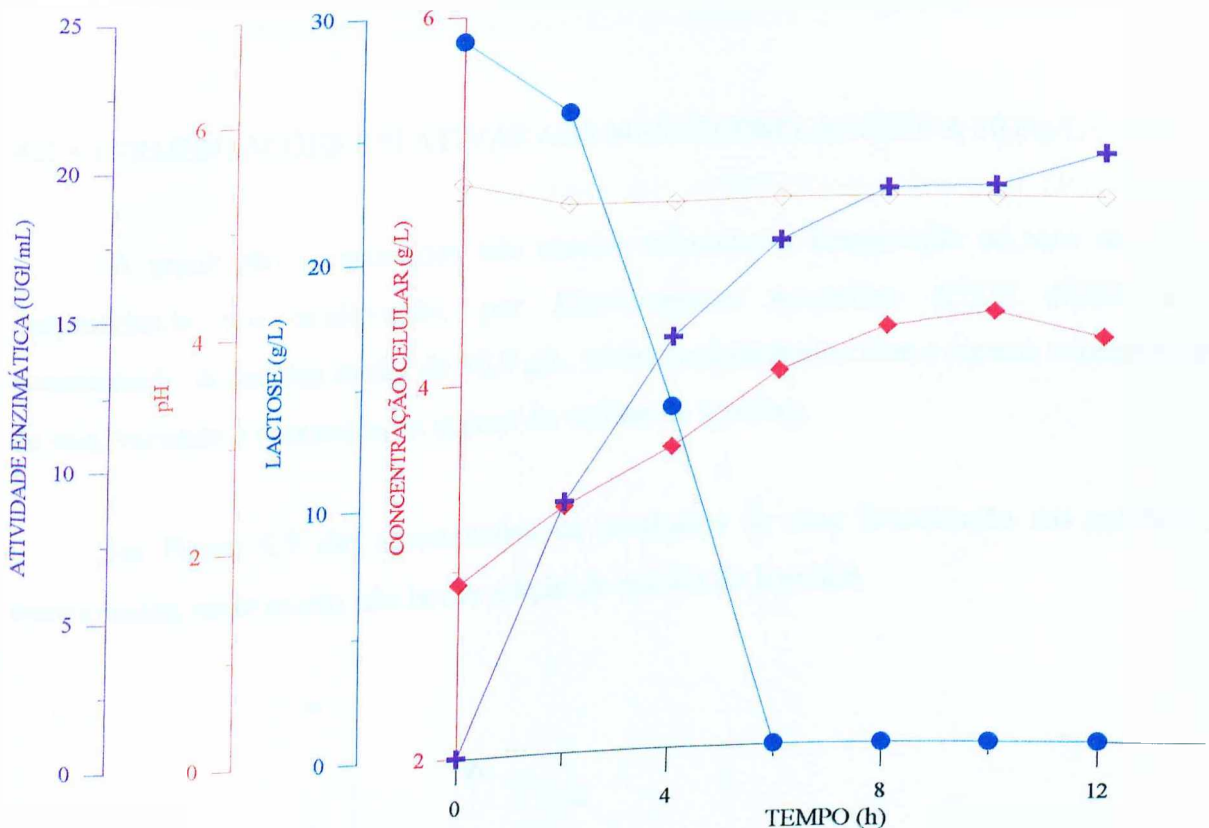


Figura 4.8 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 30,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.

Observa-se na Figura 4.8 um rápido crescimento celular, no qual os microrganismos iniciam seu crescimento na fase exponencial. Como nos experimentos anteriores, o meio é inoculado com células que vêm de um cultivo também à base de soro de queijo em incubador rotativo já estando, portanto em fase exponencial de crescimento. Mesmo assim, ao passarem de um erlenmeyer para outro, as células apresentaram variação nas condições de pH, de um erlenmeyer para outro, as células apresentaram variação nas condições de pH, de um erlenmeyer para outro, as células apresentaram variação nas condições de pH, só agitação e, em alguns casos, até de temperatura o que provoca nas mesmas uma fase lag, só que de pequena duração.

Após atingir o limite máximo de crescimento, com uma concentração celular de 4,3 g/L, a curva apresenta um decréscimo, pois o meio já estava com a lactose esgotada, o que aconteceu em 6 horas de fermentação.

A atividade enzimática continuou aumentando até atingir em 12 horas de processo, um valor de 20,0 UGI/mL. Embora o crescimento tenha entrado em fase estacionária, com consumo total da lactose, nota-se que a curva referente a atividade enzimática continuou crescendo, devido à utilização, por parte da levedura, do extrato presente no meio.

A comparação entre as três fermentações revela que a adição de extrato de levedura favoreceu o crescimento celular e a produção da enzima β -galactosidase.

4.2.3-FERMENTAÇÕES RELATIVAS AOS MEIOS COM LACTOSE A 50,0 g/L

A seguir são apresentados três ensaios referentes à fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, com concentração de lactose inicial de 50,0 g/L, todos suplementados com a mesma concentração de sais, variando a concentração apenas do extrato de levedura.

Na Figura 4.9 são apresentados os resultados de uma fermentação nas condições mencionadas, neste ensaio não houve adição de extrato de levedura.

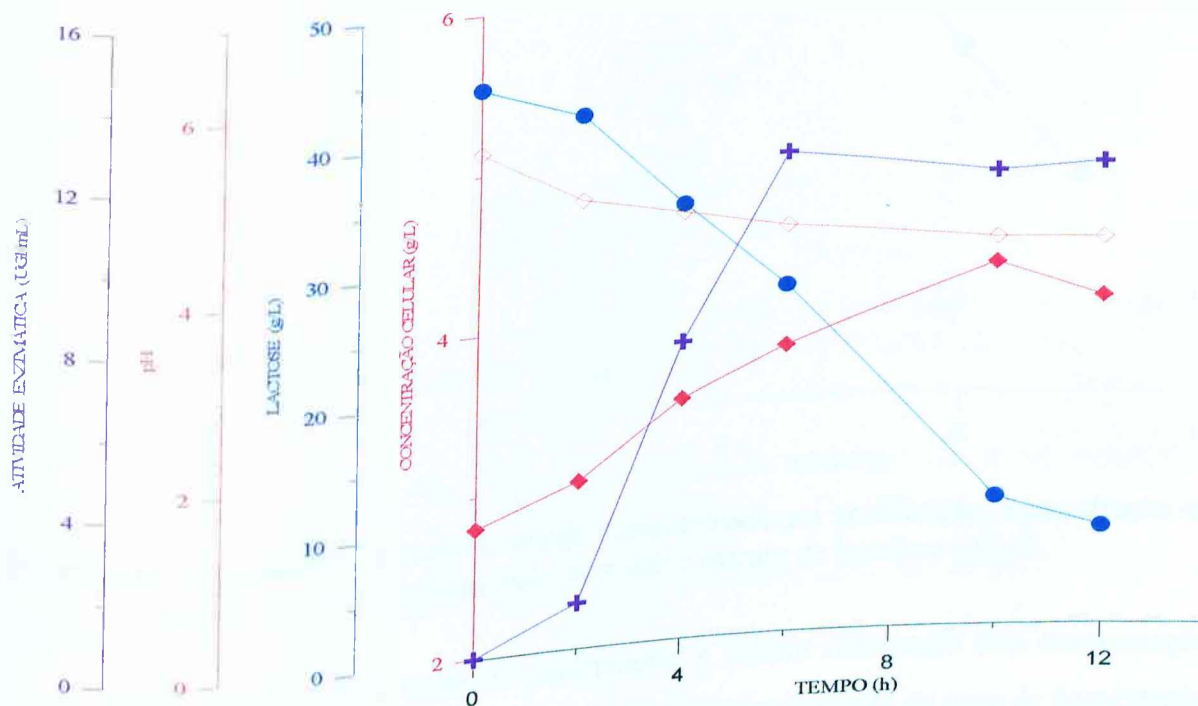


Figura 4.9 - Fermentação de soro de queijo desproteinado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.

Observa-se nesta Figura, que em 8 horas de fermentação a concentração celular obtida foi de 4,0 g/L e a atividade enzimática atingida foi de 12,0 UGI/mL após 6 horas, mantendo esse valor até o final da fermentação. A curva referente ao consumo de lactose mostra declínio até a décima segunda hora, quando a fermentação foi interrompida, restando cerca de 17% de lactose no meio.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir após 8 horas o valor 4,2, mantendo-se até o final do processo.

Na Figura 4.10 são apresentados os resultados obtidos da fermentação nas mesmas condições do experimento anterior, mas neste caso suplementado com 6,0 g/L de extrato de levedura.

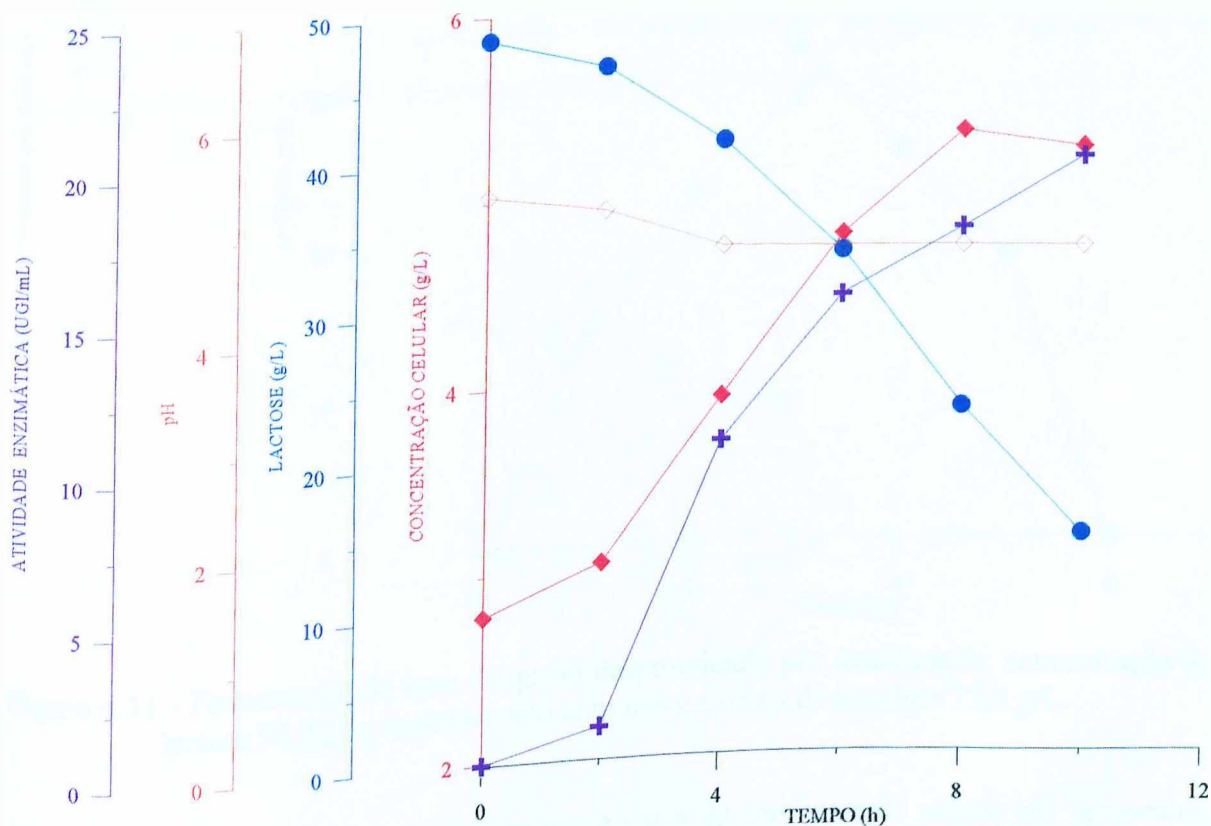


Figura 4.10 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.

Verifica-se que, em 8 horas de fermentação, a cultura alcançando uma concentração celular da ordem de 5,3 g/L e a concentração de lactose remanescente no meio de fermentação era cerca de 30% em declínio até o momento que a fermentação foi interrompida.

A síntese da enzima acompanhou o crescimento celular, atingindo máxima atividade enzimática de 20,0 UGI/mL após 10 horas.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir após 4 horas o valor 4,8, mantendo-se até o final do processo.

Na Figura 4.11 são apresentados os resultados experimentais relativos à fermentação do meio com concentração de lactose inicial de 50,0 g/L, suplementado com os sais e 12,0 g/L de extrato de levedura.

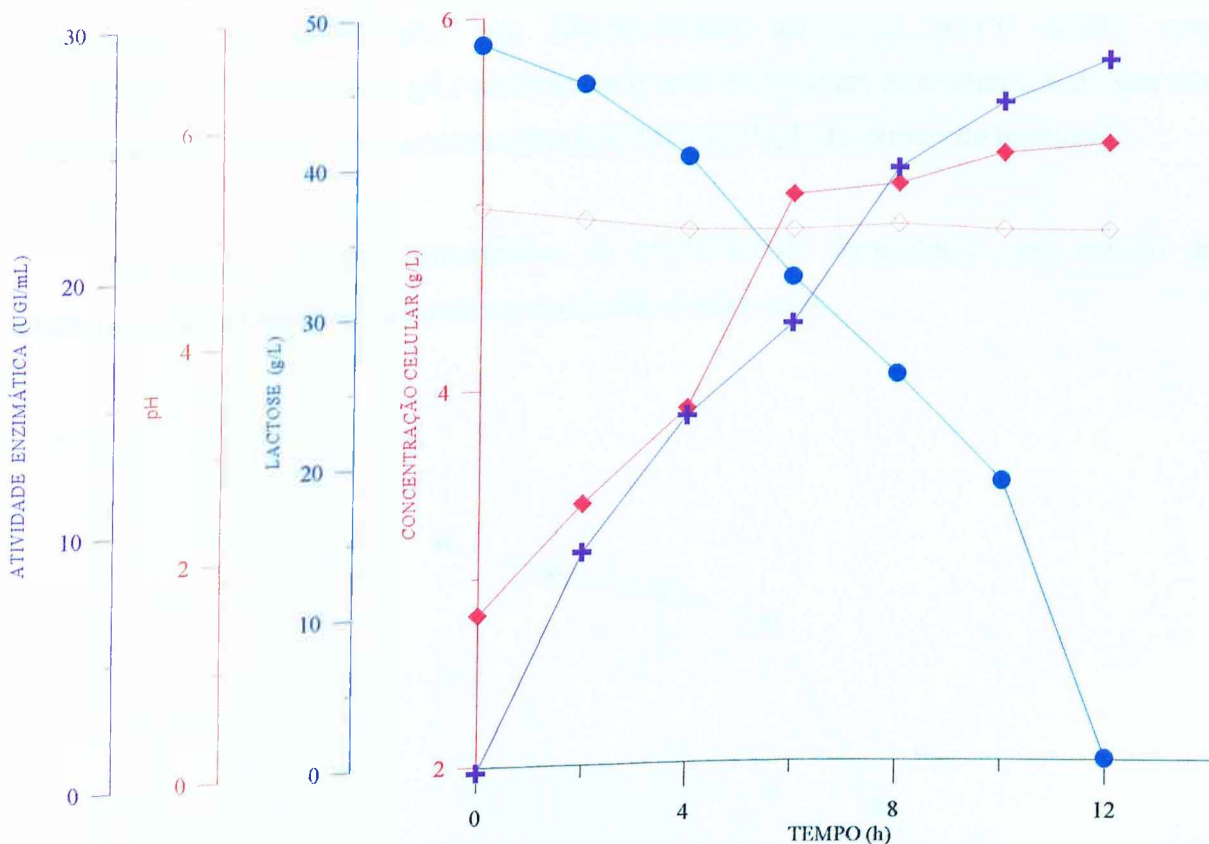


Figura 4.11 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.

Através da Figura 4.1, verifica-se que a curva de concentração celular não apresentou fase lag e após passar pela fase de crescimento exponencial, continuou a crescer com aceleração menor. Para 12 horas de fermentação, a concentração de massa seca celular foi de 5,3 g/L e a atividade enzimática de 28,0 UGI/mL. O consumo de lactose foi total em 12 horas de fermentação.

Não houve grande variação no valor do pH, que iniciou a fermentação com 5,5 e após a adição do inóculo esse valor decresceu até atingir após 8 horas o valor 5,0, mantendo-se até o final do processo.

Através de uma análise dos resultados das fermentações realizadas com concentração inicial de lactose de 50,0 g/L, verifica-se que a adição de extrato de levedura no meio à base de soro de queijo favoreceu o maior crescimento celular, como consequência do maior consumo de substrato, resultando em maior produção de β -galactosidase.

4.2.4 -FERMENTAÇÕES RELATIVAS AOS MEIOS COM LACTOSE A 70,0 g/L

A seguir são apresentados três ensaios referentes à fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, com concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com as mesmas concentrações de sais dos experimentos anteriores, nas concentrações 0,0; 6,0 e 12,0 g/L de extrato de levedura.

Na Figura 4.12 são apresentados os resultados da fermentação sem extrato de levedura, realizada mantendo as mesmas condições citadas acima.

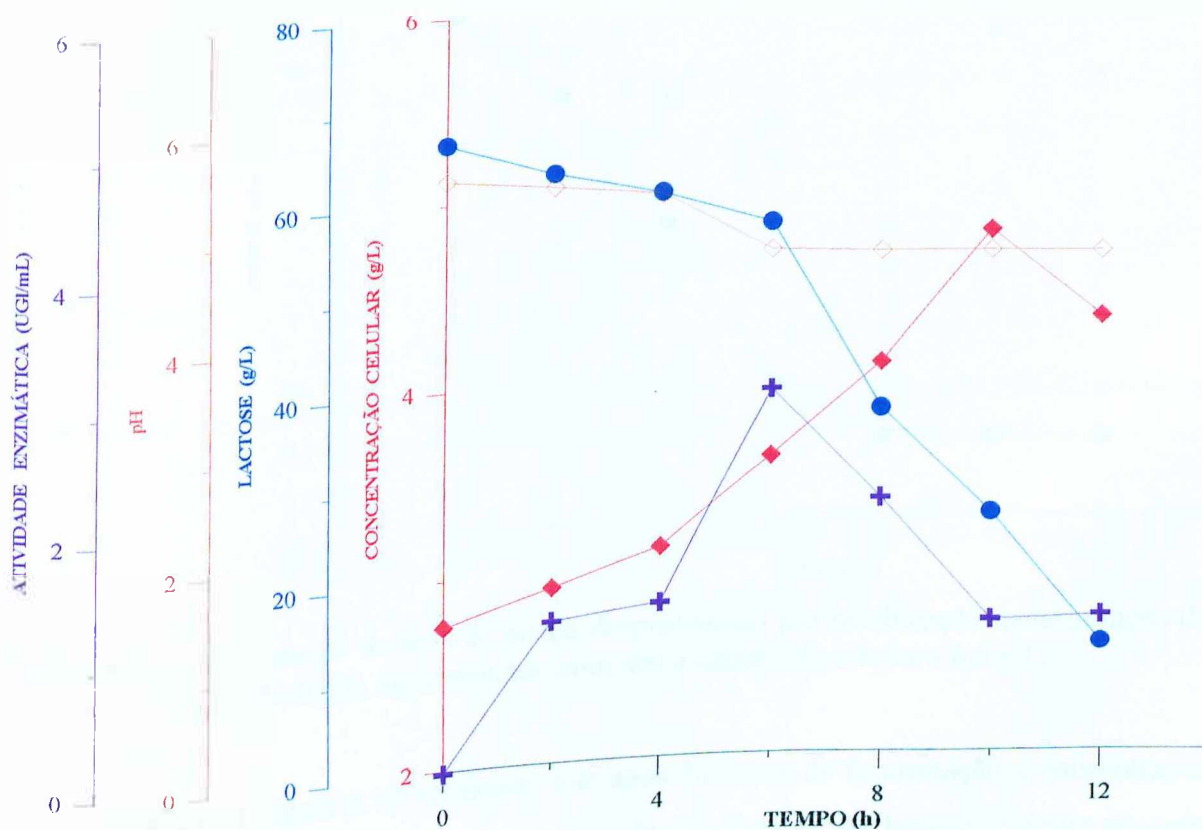


Figura 4.12 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 0,0 g/L.

Através desta Figura, verifica-se que a curva referente ao crescimento celular apresentou fase exponencial, alcançando uma concentração celular da ordem de 4,8 g/L em 10 horas de fermentação. O consumo de lactose mostra declínio até a décima segunda hora, quando a fermentação foi interrompida, restando ainda lactose no meio e a atividade enzimática foi baixa durante toda fermentação, atingindo 3,0 UGI/mL após 6 horas, em seguida, observa-se um declínio desta atividade.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir em 10 horas o valor 4,7, mantendo-se até o final do processo.

Na Figura 4.13 são apresentados os resultados da influência do extrato de levedura, na concentração de 6,0 g/L na fermentação, com concentração inicial de lactose de 70,0 g/L, na presença dos sais já mencionados.

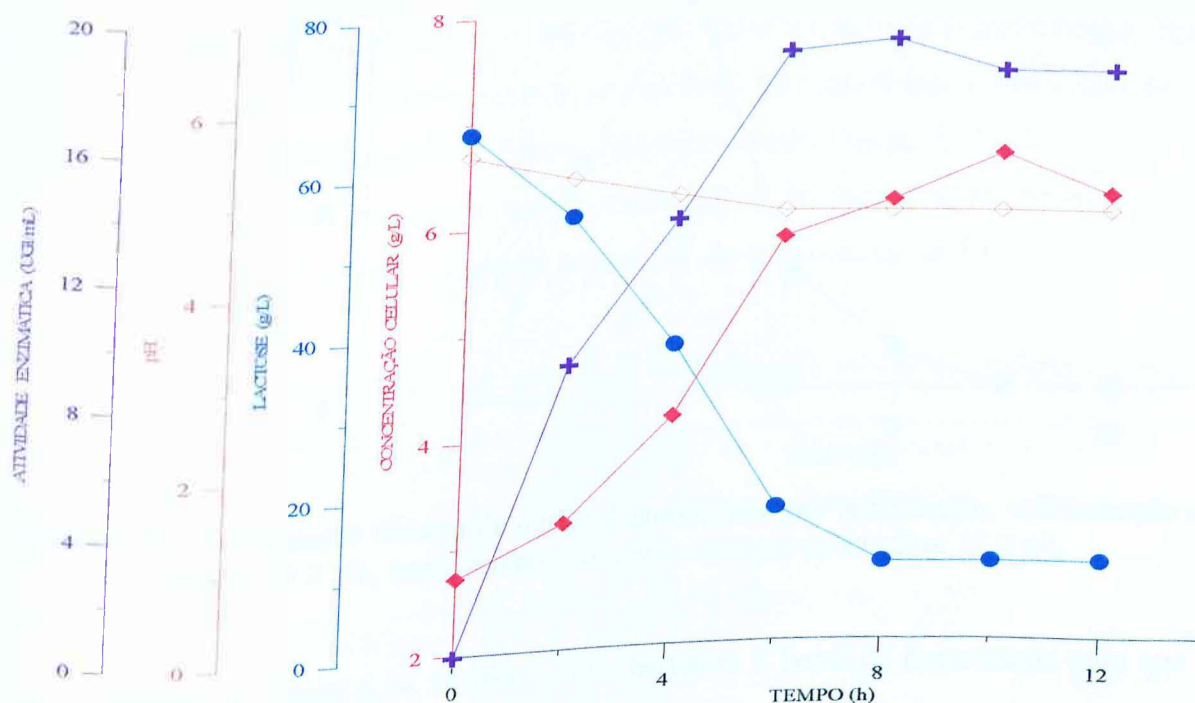


Figura 4.13 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.

Através da Figura 4.13 verifica-se que após 10 horas de fermentação a concentração celular foi de 6,6 g/L em 10 horas de fermentação. O consumo de lactose presente no meio não foi total em 12 horas de fermentação.

A atividade enzimática atingindo o valor de 18,0 UGI/mL em 6 horas, ocorrendo declínio neste valor após 10 horas de fermentação.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir em 6 horas o valor 6,6, mantendo-se até o final do processo.

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados relativos à fermentação com o mesmo meio, com adição de 12,0 g/L de extrato de levedura.

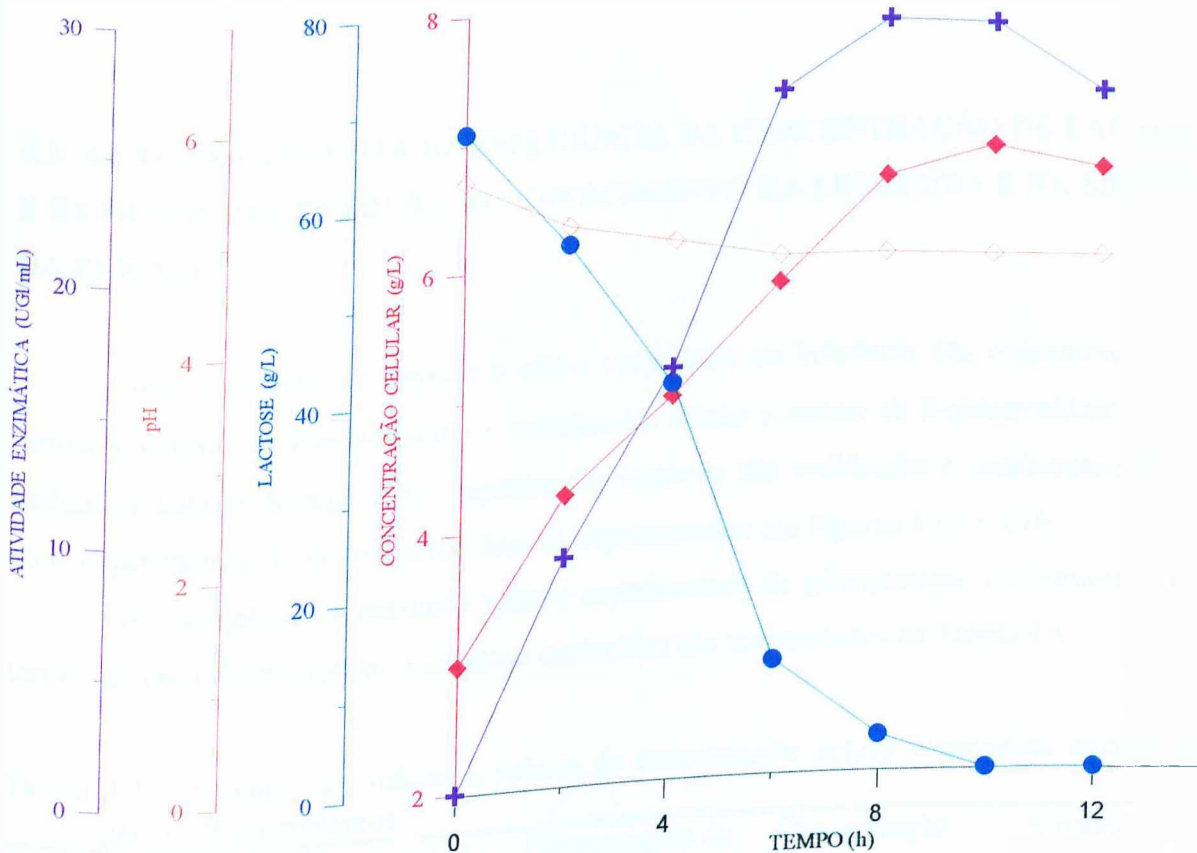


Figura 4.14 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 70,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 12,0 g/L.

Através da Figura 4.14, verifica-se que bastaram 8 horas de fermentação para que a cultura entrasse na fase de crescimento estacionário, o mesmo ocorrendo com a produção de β -galactosidase. A lactose presente no meio foi consumida totalmente em 12 horas de fermentação.

Analisando a curva referente ao crescimento celular, esta não apresentou fase lag, atingindo rapidamente a fase exponencial, mostrando a adequação do meio para o desenvolvimento da levedura, alcançando uma concentração celular da ordem de 6,8 g/L após 10 horas de fermentação, permanecendo praticamente constante.

A síntese da enzima acompanhou o crescimento celular, atingindo máxima atividade enzimática de 29,0 UGI/mL após 8 horas, mantendo esse valor até o final da fermentação.

A fermentação iniciou com pH 5,5 e logo após a adição do inóculo esse valor foi decrescendo até atingir após 6 horas o valor 6,8, mantendo-se até o final do processo.

Observa-se mais uma vez, através das Figuras 4.12, 4.13 e 4.14, a influência da adição de extrato de levedura no meio com o aumento da atividade enzimática.

4.3- ANÁLISE CONJUNTA DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE E EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA E NA SÍNTESE DA ENZIMA

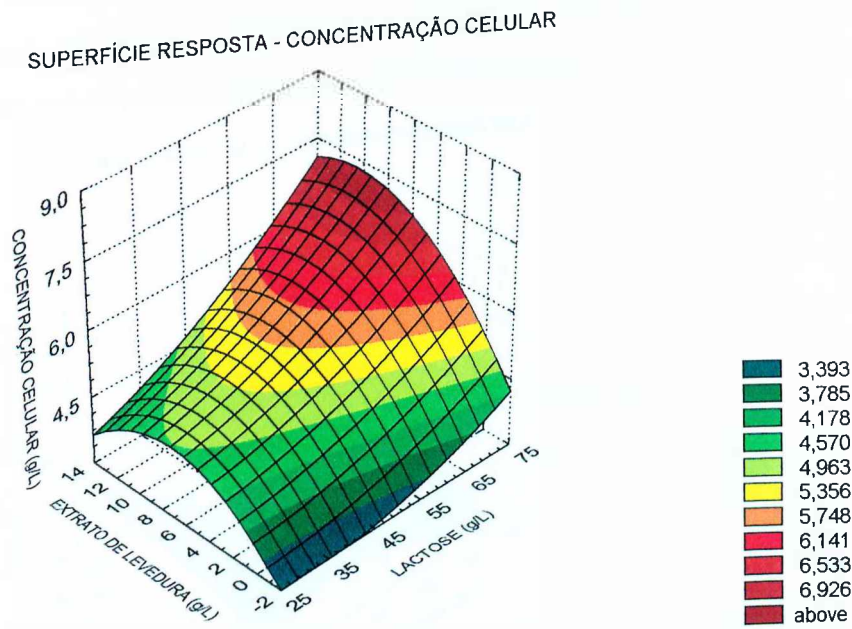
Com o objetivo de estudar o efeito combinado da influência das concentrações de lactose e extrato de levedura sobre o crescimento celular e síntese de β -galactosidase, foram realizadas análises de superfícies respostas das variáveis não codificadas e codificadas para os nove experimentos do planejamento fatorial, representados nas Figuras 4.15 e 4.16.

Os resultados dos máximos valores experimentais do planejamento experimental, em termos de crescimento celular e atividade enzimática são apresentados na Tabela 4.1.

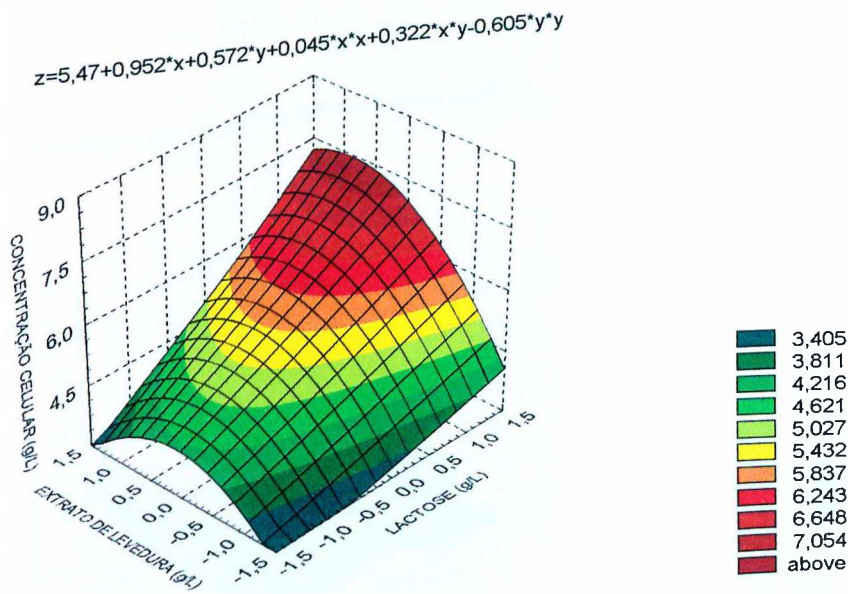
Tabela 4.1 – Resumo dos máximos valores de concentração celular e atividade enzimática para os 9 experimentos

Experimento	Concentração inicial de lactose (g/L)	Concentração de extrato de levedura (g/L)	Concentração celular (g/L)	Atividade enzimática (UGI/mL)
		0,0	3,6	10,1
1	30,0	6,0	4,6	12,0
2	30,0	12,0	4,3	20,1
3	30,0	0,0	4,0	12,0
4	50,0	6,0	5,3	20,0
5	50,0	12,0	5,3	28,0
6	50,0	0,0	4,8	2,9
7	70,0	6,0	6,6	19,2
8	70,0	12,0	6,8	29,0
9	70,0			

Na Figura 4.15 estão representados os resultados da análise em superfície resposta das variáveis: concentração inicial de lactose na faixa de 30,0 – 70,0 g/L, a concentração de extrato de levedura na faixa de 0,0 – 12,0 g/L e a concentração celular.



(a)



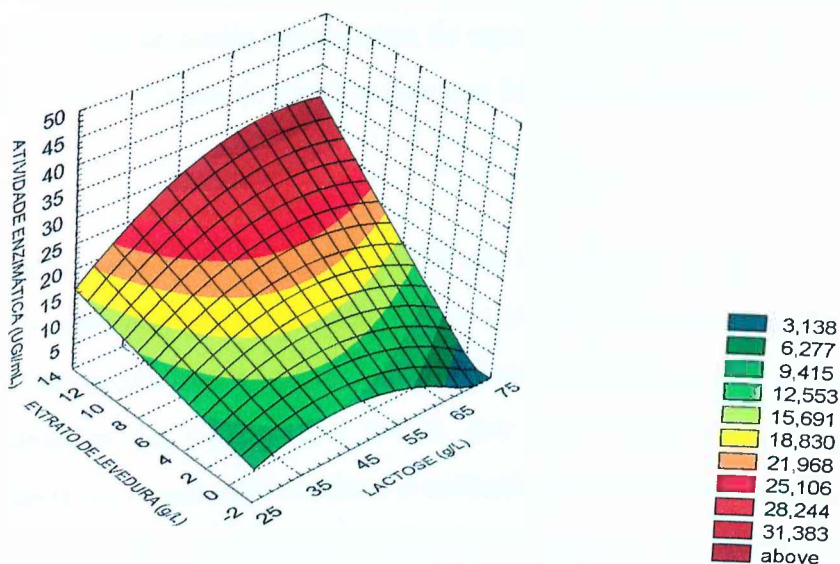
(b)

Figura 4.15 – Concentração celular em função da concentração inicial de lactose (x) e extrato de levedura (y), para variáveis não codificadas (a) e para variáveis codificadas (b).

Analisando a Figura 4.15, pode-se concluir que altas concentrações, tanto de lactose como de extrato de levedura, contribuíram para o aumento da concentração celular no meio fermentativo.

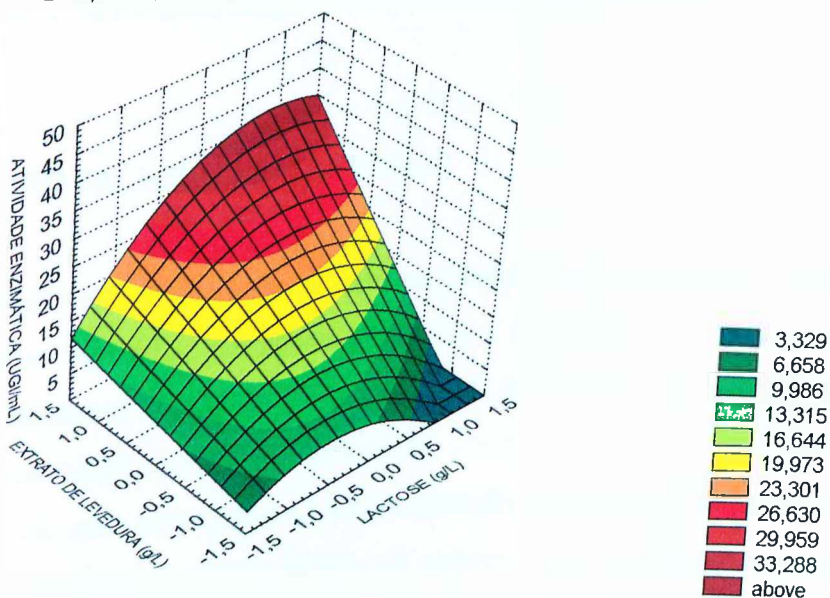
Na Figura 4.16 estão representados os resultados da análise em superfície resposta das variáveis: concentração inicial de lactose na faixa de 30,0 – 70,0 g/L, a concentração de extrato de levedura na faixa de 0,0 – 12,0 g/L e a atividade enzimática.

SUPERFÍCIE RESPOSTA - ATIVIDADE ENZIMÁTICA



(a)

$$z = 19,967 + 1,538 \cdot x + 8,743 \cdot y - 4,395 \cdot x^2 + 4,13 \cdot x \cdot y + 0,06 \cdot y^2$$



(b)

Figura 4.16 – Atividade enzimática em função da concentração inicial de lactose (x) e extrato de levedura (y), para variáveis não codificadas (a) e para variáveis codificadas (b).

Analisando a Figura 4.16, observa-se que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas utilizando concentrações iniciais de lactose (50,0 a 70,0 g/L) e extrato de levedura (6,0 a 12,0 g/L).

Com base nos experimentos realizados, pode-se concluir que a lactose constitui uma fonte de carbono adequada para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, com vistas à produção da enzima β -galactosidase. Meios de cultivo formulados tanto à base de lactose (PA) como soro de queijo necessitaram de suplementação com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura para que houvesse crescimento e produção da enzima.

As concentrações de lactose entre 50,0 e 70,0 g/L e de extrato de levedura de 6,0 a 12,0 g/L favoreceram tanto o crescimento celular como a síntese da enzima. Verifica-se pela combinação das variáveis codificadas x (concentração de lactose) e y (concentração de extrato de levedura), nas equações das Figuras 4.15 e 4.16, que a concentração de lactose tem influência mais acentuada no crescimento celular e a concentração de extrato de levedura na atividade enzimática. Comparando as atividades enzimáticas alcançadas nos meios à base de soro de queijo nas concentrações 50,0 e 70,0 g/L, ambos suplementados com extrato de levedura 12,0 g/L, observa-se que foram praticamente iguais, o que sugere a utilização de soro a 50,0 g/L de lactose, pois é a concentração mais próxima do soro *in natura*.

4.4- FERMENTAÇÃO EM MINIFERMENTADOR

Uma fermentação em meio à base de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e de extrato de levedura a 6,0 g/L, por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, foi realizada no fermentador descrito no Item 3.1.7, com o objetivo de otimizar a produção da enzima.

Para a seleção do meio considerou-se a concentração de 50,0 g/L de lactose inicial, pois é a concentração aproximada existente no soro *in natura*, já a concentração de extrato de levedura 6,0 g/L foi selecionada, pois é um valor intermediário da faixa estudada.

O volume de meio total foi 1400 mL, sendo 250 mL de inóculo, preparado conforme o Item 3.2.3 e 1150 mL de meio de cultura, preparado nas concentrações indicadas na Tabela

3.3. Esta fermentação foi realizada sem controle de pH e sem aeração e os resultados são apresentados na Figura 4.17.

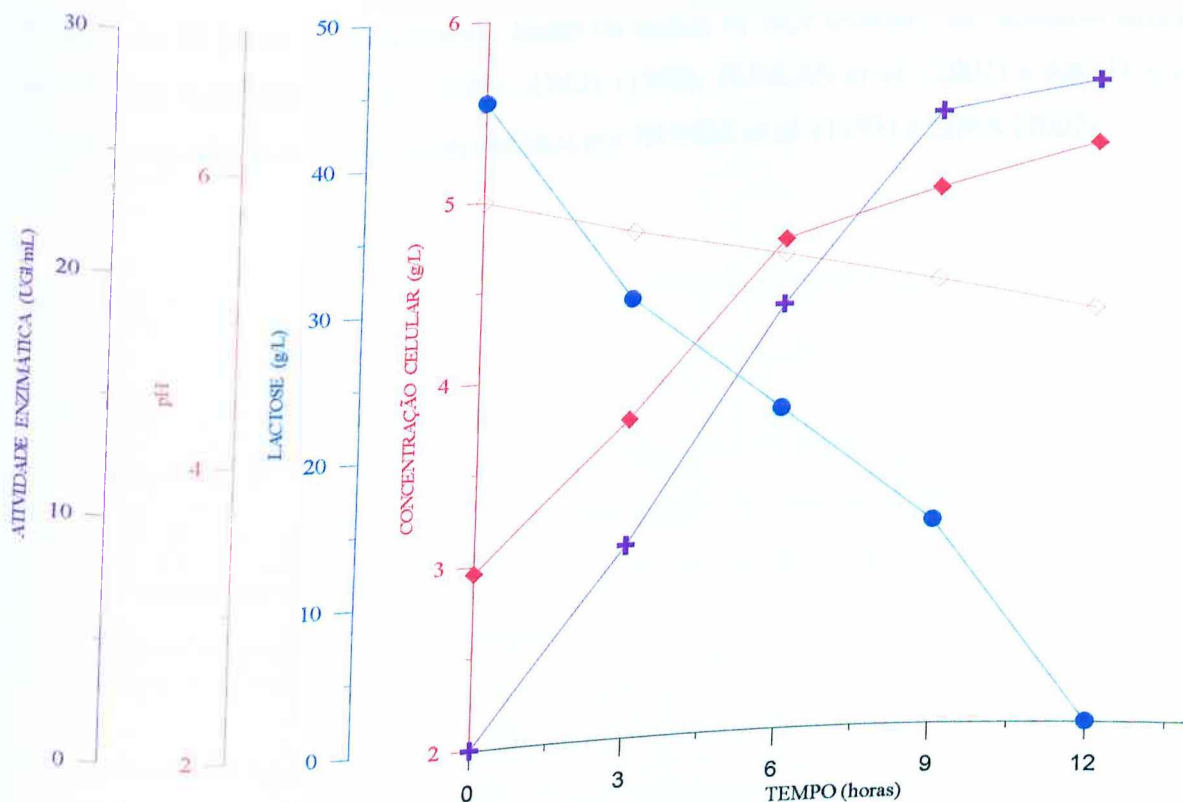


Figura 4.17 - Fermentação de soro de queijo desproteínado por acidificação, concentração de lactose 50,0 g/L, suplementado com sais e extrato de levedura 6,0 g/L.

Observa-se na Figura 4.17 que o comportamento da fermentação foi análogo aos das fermentações realizadas em incubador rotativo, e a síntese da enzima seguiu um comportamento associado ao crescimento. Os valores obtidos para a concentração celular e atividade enzimática foram 5,3 g/L e 27,0 UGI/mL, respectivamente.

Comparando as Figuras 4.10 e 4.17, ambas conduzidas com o mesmo meio de cultura, valor inicial de pH e concentração celular verificaram que, o comportamento de ambas foi análogo. Porém, o processo realizado em fermentador apresentou melhor resultado para a atividade enzimática (27,0 UGI/mL), em relação a atividade obtida na fermentação conduzida em incubador rotativo (20,0 UGI/mL). A concentração celular final foi praticamente a mesma em ambos os ensaios, sendo o açúcar totalmente consumido no segundo caso.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os citados na literatura para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, pode-se concluir que os mesmos foram bastante coerentes. As atividades enzimáticas obtidas neste trabalho, no período de 12 horas de fermentação, foram da ordem de 28,0 UGI/mL, são similares àquelas obtidas por BARBOSA *et al.* (1985), RECH (1998), FURLAN *et al.* (2001) e ABAD *et al.* (2001) e superiores aos valores encontrados por NUNES *et al.* (1993) e LIMA (2002).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

Quanto aos meios de cultura

Os meios de cultura contendo lactose como fonte de carbono, tanto a base de lactose PA como de soro de queijo, se mostraram adequados para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 e para a síntese da enzima β -galactosidase, desde que suplementados com nutrientes adequados.

Quanto à adição de extrato de levedura

Com base nos resultados obtidos durante os ensaios verifica-se que, a complementação dos meios de cultura a base de soro de queijo com extrato de levedura permitiu atingir um maior crescimento celular e uma maior produção de β -galactosidase. Os melhores resultados de concentração celular e de atividade enzimática foram conseguidos com extrato de levedura na faixa de 6,0 a 12,0 g/L, em toda a faixa de concentração de lactose estudada. O extrato de levedura também contribuiu para uma menor queda no pH durante as fermentações, como pode ser observado nas figuras correspondentes a ensaios com extrato de levedura na concentração de 12,0 g/L.

Quanto à suplementação com sais minerais

A suplementação dos meios com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, foi fundamental, especialmente para a síntese da enzima β -galactosidase, uma vez que em presença dos mesmos os valores finais de atividades foram maiores e se mantiveram mais estáveis nos finais das operações de fermentação.

Quanto à atividade enzimática

As maiores atividades enzimáticas obtidas no presente trabalho, da ordem de 29,0 UGI/mL, foram alcançadas em meios com concentração de lactose na faixa de 50,0 a 70,0 g/L e na maior concentração de extrato de levedura estudada, que foi 12,0 g/L.

Quanto o desempenho do minifermentador:

Na fermentação efetuada em minifermentador, a concentração celular foi praticamente a mesma daquela encontrada na fermentação realizada em incubador rotativo, com um valor de 5,3 g/L. Com relação a atividade enzimática, a fermentação realizada em fermentador foi superior, atingindo 27,0 UGI/mL, contra 20,0 UGI/mL no incubador rotativo, além de que o consumo de lactose foi total no fermentador, e incompleta na fermentação em incubador rotativo. Isto comprova a superioridade do processo realizado em minifermentador em relação àquele realizado em incubador rotativo.

Quanto à utilização de soro de queijo

O soro de queijo constitui-se em um subproduto da indústria queijeira com grande potencial para ser utilizado como meio de cultura da levedura em questão, mostrando-se uma opção atrativa de custo muito menor que os meios sintéticos e uma alternativa para redução do poder poluente do soro.

5.2 – SUGESTÕES

Diante dos resultados obtidos, apresenta-se como sugestão para trabalhos futuros a continuação do trabalho em fermentador, estudando a aeração do meio e o controle de pH, visando obter uma alta densidade celular.

Além disso, seria interessante purificar a enzima produzida, testando os processos tradicionais de purificação e estudar a estabilidade desta enzima produzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F.; WOOLCOOT, J.C. y GAMARRA, G. Optimizacion de condiciones fermentativas para la produccion de β -galactosidasa por *Kluyveromyces marxianus*. Facultad de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <http://200.10.69.30/biologia/investigacion/c6dir202.htm>. 2001.
- ABLLV - Associação Brasileira de Leite Longa Vida. São Paulo. Leite: alimento indispensável. São Paulo, p. 66. 1997. [Publicação técnica sobre leite dirigida para médicos, nutricionistas e outros profissionais da saúde].
- ALMEIDA, M.M. de; PASTORE, G.M. Galactooligossacarídeos – Produção e efeitos benéficos, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SBCTA, v. 35, n. 1/2, p. 12 - 19. 2001.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª ed. New York, Editora McGraw-Hill. 1986.
- BALES, S.A.; CASTILLO, F.J. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 37, p. 1201-1205. 1979.
- BARALLE, S.B. Contribuição ao Estudo da fermentação de Soro de Leite por *Lactobacillus bulgaricus* em Processo Descontínuo. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, p. 15-16. 1985.
- BARBOSA, M.F.S.; SILVA, D.O.; PINHEIRO, A.J.R.; GUIMARÃES, W.V. & BORGES, A.C. Production of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey. Journal of Dairy Science, v. 68, p. 1618-1623. 1985.
- BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; BLANCO MÉNDEZ, J. & GONZÁLEZ SISO, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 506-512. 2001.
- BELEM, M.A.F & LEE, B.H. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. Process Chemistry, v. 34, p. 501-509. 1999.
- BLANCH, H.W & CLARK, D.S Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker. 1997.
- BOBBIO, P.A. & ORSATTI, F. Química do Processamento de Alimentos. São Paulo, Livraria Varela. 1992.

- CASTRO BRAVO, C.E.; CARVALHO, A.P.de; SCHW, R.F., CASTRO GÓMEZ, R.J.H; PILON, R. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Revista Ciência Agrotécnica, v. 24 (Edição Especial), p. 137-152, dez. 2000.
- CARVALHAL, M.;L; WUTHSTRACK, H. MONTORO, L.P. TAKAHASHI, D.F. & ALTERTHUM, F. Ethanol production from lactose and whey by *Escherichia coli* expressing genes from *Zymomonas mobilis*. Revista Microbiologia, v. 27, p. 263-267. 1996.
- COENEN, T.M..M; BERTENS, A.M.C; DE HOOG, S.C.M and VERSPEEK-RIP, C.M. Safety evaluation of a lactase enzyme preparation derived from *Kluyveromyces lactis*. Food and Chemical Toxicology, v. 38, p. 671-677. 2000.
- COONEY, C.L Bioreactors: Design and operation. Science, Zancaster, v.219, p. 728-733. 1983.
- COUGHLIN, J.R. & NICKERSON, T.A. Acid-catalysed hidrolisis of lactose in whey and aqueous solutions. Journal Dairy Science, v. 58 (2), p. 169 - 174. 1975.
- FLORES, M.V.; VOGET, C.E and ERTOLA, R.J.J. Permeabilization of yeasts cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. Enzyme and Microbiology Technology. v. 16, april. 1994.
- FODA, M.I.; LOPEZ-LEIVA, M. Continuous production of oligosaccharides from whey usingo membrane reactor. Process Biochemistry, v.35, p.581-587. 2000.
- FURLAN, S.A.; SCNEIDER, A.L.S; MERKLE, R.; CARVALHO - JONAS, M.F.; JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of beta-D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free médium. Acta-Biotechnologica, v.21 (1), p. 57- 64. 2001.
- GARCIA-GARIBAY, M.; CRUZ-GUERRERO, A.; BÁRZANA, E. & GÓMEZ-RUIZ, L. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry, v.34 (6-7), p. 621-624. 1999.
- GÉKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolisis of lactose: A Literature Review. Process Biochemistry, v. 20, p. 2-12. 1985.
- GRUBB, C.F. & MAWSON, A.J. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. Biotechnonology Letters, v. 15, n. 6, p. 621-626. 1993.
- 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.
- 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. pg. 279-342. 1988.

- KARDEL, G.; FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. Lactase na Indústria de Laticínios (Parte 1). Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes". Juiz de Fora, v.50, n.294, p.15-17. 1995.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA - OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 27, p. 583 – 592. 2000.
- LEHNINGER, A.L. Bioquímica, 2 ed., Editora Edgard Blücher Ltda, v.1. 1995.
- LIMA, de J. A. Produção de β -galactosidase por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*. Monografia conclusão de curso, Departamento de Ciências Biológicas – UFU. 2002.
- MAHONEY, R.R.; NICKERSON, T.A.; WHITAKER, J.R. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Dairy Science, vol.58, p.1620-1629. 1974.
- MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, water, salts and vitamins. London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.77-125. 1997.
- MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. Food Chemistry, v. 63, n. 2, p. 147-154. 1998.
- MARIOTTI, M.P.; TREVISAN, H.C.; HYAMANAKA, H.. Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada. Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. 2000.
- NOVO NORDISK. Publicação. Enzymes Process Division. Bioindustrial Group. 1993.
- 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.
- OLIVEIRA, J.S de. Queijo Fundamentos Tecnológicos. In: Série: Tecnologia Agroindustrial. São Paulo. 1982.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CAHN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, Editora McGraw-Hill. v. 1, cap. 16. 1981.
- 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.
- PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; CASTRO - GOMEZ, R.J.H. Soro de leite - obtenção, características e aproveitamento: Revisão. Semina: Ciências Agrônomicas, v. 13, n. 1, p. 92-96. 1992.

- PONSANO, E.H.G.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua capacidade poluente. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SBCTA, v. 15, n. 1, p. 170-173. 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.
- PRENOSIL, J.E; STUKER, E. & BOURNE, J.R Formation of Oligosaccharides during Enzymatic Lactose: Part I: State of Art. Biotechnology and Bioengineering, v.30, p. 1019-1025. 1987.
- RECH, R. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFRGS. 1998.
- REED, G; NAGODAWITHANA, T. Enzymes in Food Processing. New York, Academic Press. 3ª ed. 1993.
- REUTER, S.; NYGAARD, A.,R.; ZIMMERMANN, W.. β -galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus sulfactarius*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. Enzyme Microbial Technology, v. 25, p. 509-516. 1999.
- RIBEIRO, E.J. Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada. Tese de Doutorado, FEA – UNICAMP. 1989.
- RIBEIRO, E.P. Queijos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. Biotechnologia Industrial. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 225-253. 2001.
- SCRIBAN, R. Biotechnologia. Editora Manole Ltda. 1985.
- SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics. New York, John Wiley. 1993.
- SILVA, C.A.da & CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. Semina: Ci. Agr., Londrina, v.16, n.1, p. 17-21. 1995.
- SPREER, E. Lactologia Industrial. Zaragoza, Espanha. Editora Acribia. 1975.
- TEIXEIRA, A.M.D Estudo do Comportamento da enzima β -galactosidase no processo de ultrafiltração. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2000.
- TOMÁS, C.M. Estudo da Hidrólise da Lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada. Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia Química – UFU. 1998.
- TREVISAN, H.C; BERGAMO, C.P; CONTIERO, J. HOJO, O. e MONTI, R. Estudo da imobilização de β -galactosidase em sílica de porosidade controlada. In: SINAIFERM. Anais da SINAIFERM. Universidade Federal de São Carlos. 1996.

- UNIFESP. Pesquisa por internet: www.unifesp.br/biblioteca/lactose. 2002.
- VASILJEVIC, T. & JELEN, P. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v.2, p. 75-85. 2001.
- VEISSEYRE, R. Lactologia Técnica, Zaragoza, Espanha, Editora Acribia. 1972.
- VILANI, C. Tratamento seqüencial do Soro de Queijo desnatado empregando a Ultrafiltração acoplada ao Tratamento Anaeróbio do Permeado. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2001.
- VITOLO, M. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. Biotechnology Industrial. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 387-418. 2001.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. Química y Física Lactologia, Editora Acribia, S.A., Zaragoza, 1984.
- WHITE, A.; HANDLER, P. & SMITH, E. Princípios de Bioquímica. Guanabara Koogan. 5 ed. 1976.
- WONG, P.N.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. Fundamentals of Dairy Chemistry. New York, Van Nostrand Reinhold. p. 279-342. 1988.
- ZADOW, J.G. Lactose: properties and uses. Journal of Dairy Science. Champaign, v.67, p. 2654-2679. 1984.
- ZHOU, Q.Z.K; CHEN, X.D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. Journal of Food Engineering, v.48, p. 69-74. 2001.

ANEXOS

ANEXO A

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na Tabela A.1 é apresentada a composição média do leite de mamíferos

Tabela A.1: Composição do leite de mamíferos domésticos e experimentais (WONG *et al.*, 1988).

Mamífero	Lipídeos (%)	proteínas (%)	lactose (%)	sólidos totais (%)
Boi	3,7	3,4	4,8	12,7
Homem	3,8	1,0	7,0	12,4
Carneiro	7,4	5,5	4,8	19,3
Dromedário	4,5	3,6	5,0	13,6
Cavalo	1,9	2,5	6,2	11,2
Lhama	2,4	7,3	6,0	16,2
Elefante indiano	2,4	7,3	4,7	21,9
Elefante indiano	11,6	4,9	4,7	23,5
Cachorro	12,9	7,9	3,1	23,5
Gato	12,9	7,9	4,8	17,6
Gato	4,8	7,0	4,8	18,8
Porco	6,8	4,8	5,5	22,6
Porco	6,8	4,8	4,9	22,6
Hamster dourado	4,9	9,4	4,9	15,4
Hamster dourado	4,9	9,4	7,0	15,4
Macaco Rhesus	4,0	1,6	7,0	32,8
Macaco Rhesus	4,0	1,6	2,1	32,8
Coelho	18,3	13,9	2,1	21,2
Coelho	18,3	13,9	2,0	21,2
Mink	3,4	7,5	2,0	21,2

ANEXO B

MÉTODOS ANALÍTICOS

B1 – DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na Tabela B.1 são apresentados os dados de absorbância para a construção da curva padrão utilizada em todos os ensaios para determinação da atividade enzimática para o pH 6,5 e a temperatura de 30°C.

1- Preparo da solução mãe de glicose:

Pesar exatamente 3,0 g de glicose isenta de umidade e avolumar para 100 mL. Esta solução contém 0,03 g/mL ou 3 g/L.

2- Preparar 6 balões de 10 ml e pipetar:

Balão 1: 1ml da solução mãe e avolumar para 10 mL – solução final 0,0001g/ml ou 0,3 g/L

Balão 2 : 2ml da solução mãe e avolumar para 10 mL - solução final 0,0002g/ml ou 0,6 g/L

..

Balão 6: 6 mL de solução mãe e avolumar para 10 mL – solução final 0,001g/ml ou 3 g/L

3- Pipetar 20 μ L de cada solução em tubos de ensaio, com 2 mL de solução de glicose – oxidase preparada anteriormente através do Kit;

4- Ajustar o espectro para o comprimento de onda de 505 nm;

B1) Construir a curva de calibração, pelo gráfico de concentração (eixo y) versus absorbância (eixo x);

B2) Montar a equação pela regressão linear, na forma:

$$\text{Conc}(y) = a + b \cdot \text{absorbância} (x)$$

Verificar que o valor do R deve ser o mais próximo de 1. Caso fique longe deste valor, repetir a curva padrão.

Tabela B.1 – Valores obtidos para a curva padrão para determinação da atividade enzimática

Concentração de glicose (g/L)	Absorbância (nm)
0,3	0,153
0,6	0,278
0,6	0,272
1,2	0,460
1,5	0,755
3,0	0,916

$$\text{Curva Padrão} - C = 2,912 x - 0,1434$$

B2 - DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS - LACTOSE

Neste método analítico analítico os açúcares totais, calculados como lactose, são determinados através do método fenol-ácido sulfúrico, proposto por BARALLE (1985) e por RECH (1998).

Preparação dos reagentes utilizados na curva padrão

➤ Preparo da Solução- Mãe

Pesar analiticamente 0,1 g de lactose isenta de umidade e avolumar para 1 litro de água destilada. Esta solução contém 100 mg/L. Guardar esta solução em balão volumétrico na geladeira.

➤ Preparo da Solução Fenol 80 %

Pesar analiticamente 80 g de fenol e dissolver em 100 ml de água destilada. Guardar esta solução em balão volumétrico na geladeira.

Determinação da curva padrão

1. Preparar a solução mãe de lactose;
2. Preparar 5 tubos de ensaio com rosca e pipetar:
 - **Concentração 20g/L** - Tubo 1: 160 µl da solução mãe, 640 µl de água destilada, 48 µl de solução fenol 80% e 2mL de ácido sulfúrico.
 - **Concentração 40g/L** - Tubo 2: 320 µl da solução mãe, 480 µl de água destilada, 48 µl de solução fenol 80% e 2mL de ácido sulfúrico.
 - **Concentração 60g/L** - Tubo 3: 480 µl da solução mãe, 320 µl água destilada, 48 µl de solução fenol 80% e 2mL de ácido sulfúrico.
 - **Concentração 80g/L** - Tubo 4: 640 µl da solução mãe, 160 µl água destilada, 48 µl de solução fenol 80% e 2mL de ácido sulfúrico.
 - **Concentração 100g/L** - Tubo 5: 800 µl da solução mãe, 48 µl de solução fenol 80% e 2mL de ácido sulfúrico.

Para preparar o branco, pipetar 800 µl de água destilada, 48 µl de solução fenol 80% e 2 mL de ácido sulfúrico.

3. Preparar todos os tubos em duplicata e o branco;
4. Agitar bem para completa homogeneização e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente;
5. Calibrar o espectrofotômetro (Modelo B 380 da Micronal) em zero, a 490 nm;
6. Realizar a leitura de absorvância em, anotando os valores.
7. Construir a curva de calibração, pelo gráfico de concentração (eixo y) versus absorvância (eixo x);
8. Montar a equação pela regressão linear, na forma:

$$\text{Conc}(y) = a + b \cdot \text{absorvância}(x)$$

OBS: O coeficiente de correlação R deve ser o mais próximo de 1. Caso fique longe deste valor, repetir a curva padrão.

Exemplo para obtenção da curva padrão utilizada nos experimentos.

Pipetou-se 800 μL de água destilada e colocou em um tubo de ensaio adicionando 50 μL de solução de fenol 80% e 2 mL de ácido sulfúrico (PA).

Agitou bem o tubo para completa homogeneização e incubou por 30 minutos à temperatura ambiente, realizando a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 490 nm.

Tabela B.2: Valores obtidos para a curva padrão do método fenol – ácido sulfúrico

Lactose (abs)	Lactose (g/L)
0,753	44,211
0,709	41,581
0,582	33,992
0,467	27,119
0,180	9,968
0,180	7,578

Curva fenol – ácido sulfúrico (padrão) $C = 74,7 \text{ abs} - 0,985$

ANEXO C

No Anexo C são apresentadas as tabelas com os resultados obtidos dos experimentos preliminares e do planejamento fatorial.

Anexo C1 - Valores Experimentais Preliminares para a massa celular seca, concentração de lactose no meio, pH, e atividade enzimática para as fermentações realizadas.

Na Tabela C.1 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução lactose (PA) com concentração inicial de 50 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 6 g/L.

Tabela C.1 – Valores experimentais para fermentação em meio à base de solução lactose (PA), S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.

Concentração de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment. (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferment.	Atividade enzimát. (g/L.min)	Atividade enzimática (UGI/mL)
50 (PA)	6	0	1,992	0,820	48,215	5,33	0,0	0,0
50	6	2	2,11	0,719	42,179	5,33	0,00288	0,2560
50	6	4	2,75	0,663	38,832	4,87	0,05464	4,8568
50	6	6	3,83	0,249	14,092	3,98	0,17469	15,528
50	6	8	4,45	0,061	2,857	3,81	0,2818	25,048
50	6	10	4,63	0,0	0,0	3,81	0,2773	24,6488
50	6	12	4,502	0,0	0,0	3,81	0,2816	25,0311

Na Tabela C.2 são apresentados os valores experimentais encontrados para as fermentações preliminares à base de soro de queijo, desproteinado por acidificação, sem adição dos sais com variação nas concentrações do soro de leite em pó e extrato de levedura.

Tabela C.2 - Valores experimentais para as fermentações à base de soro de queijo, desproteinado por acidificação, sem adição dos sais.

Concentração de lactose (g/L)	Concentração de extrato de levedura (g/L)	Tempo de fermentação (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	pH - fermentação	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimática (UGI/mL)
30	12	0	2,87	0,628	5,38	0	0
30	12	2	3,15	0,520	5,19	0,05324	4,7288
30	12	4	3,42	0,350	5,12	0,0814	7,2355
30	12	6	3,63	0,275	5,12	0,1668	14,8266
30	12	8	3,5075	0,178	5,12	0,1523	13,537
30	12	10	3,6525	0,071	5,12	0,10582	9,41
30	12	12	3,55	0,0	5,12	0,1023	9,093
50	0	0	1,85	0,465	5,10	0,0	0,0
50	0	2	2,05	0,226	4,87	0,0	0,0
50	0	4	2,652	0,144	4,76	0,0	0,0
50	0	6	3,025	0,051	4,58	0,0	0,0
50	0	8	2,95	0	4,58	0,0	0,0
50	0	10	2,95	0	4,58	0,0	0,0
50	0	12	2,8	0	4,55	0,0	0,0
60	0	0	1,9	0,900	5,35	0,0	0,0
60	0	2	2,092	0,770	5,05	0,0	0,0
60	0	4	3,205	0,530	4,85	0,0	0,0
60	0	6	3,782	0,302	4,76	0,0	0,0
60	0	8	3,855	0,128	4,50	0,0	0,0

Continuação da Tabela C.3.

60	0	10	4,115	0,054	4,53	0,0	0,0
60	0	12	3,9	0,0	4,53	0,0	0,0
60	6	0	1,8	1,080	--	0,0	0,0
60	6	2	2,26	0,922	--	0,00905	0,854722
60	6	4	3,69	0,530	--	0,03846	3,63233
60	6	6	5,357	0,127	--	0,10823	10,2217
60	6	8	5,71	0,060	--	0,10719	10,1235
60	6	10	5,82	0,0	--	0,10387	9,8099
60	6	12	5,8	0,0		0,100	8,888
90	0	0	2,02	1,450	5,10	0,0	0,0
90	0	2	2,737	1,413	5,10	0,0	0,0
90	0	4	2,835	1,370	4,98	0,0	0,0
90	0	6	3,702	1,218	4,80	0,0	0,0
90	0	8	4,682	1,125	4,67	0,0	0,0
90	0	10	5,012	0,830	4,53	0,0	0,0
90	0	12	4,695	0,587	4,6	0,0	0,0

Anexo C2 - Resultados experimentais para a massa celular seca, concentração de lactose no meio, pH, e atividade enzimática para as fermentações realizadas a base de soro de queijo.

Este anexo apresenta as tabelas dos resultados apresentados no Capítulo 4 e pertencem ao planejamento fatorial.

Na Tabela C.3 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 30 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, sem adição de extrato de levedura.

Tabela C.3 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, $S = 30$ g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment. (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH - fermentação	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimática (UG/ml)
30	0	0	2,77	0,490	28,494	5,5	0,0	0,0
30	0	2	2,96	0,469	27,239	5,5	0,0419372	3,72775
30	0	4	3,15	0,341	19,590	5,5	0,06208	5,5182
30	0	6	3,48	0,111	5,845	5,37	0,09963	8,8562
30	0	8	3,58	0,102	5,3075	5,37	0,1066	9,4755
30	0	10	3,4	0,092	4,709	5,37	0,11412	10,14417
30	0	12	3,3	0,086	4,351	5,37	0,1066	9,4755

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.4 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 30 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 6 g/L.

Tabela C.4 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 30 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.

Concent. lactose (g/L)	Concentração de extrato de levedura (g/L)	Tempo de fermentação (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferment.	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimática (UGI/ml)
30	6	0	2,7	0,487	28,315	5,44	0,0	0,0
30	6	2	3,17	0,346	19,888	5,19	0,05939	5,2791
30	6	4	3,69	0,130	6,980	5,11	0,0832	7,3955
30	6	6	4,642	0,025	0,706	5,11	0,1107	9,84
30	6	10	4,15	0	0,0	5,11	0,12483	11,096
30	6	12	4,22	0	0,0	5,11	0,1346	11,964

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.5 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 30 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 12 g/L.

Tabela C.5 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 30 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de fermentação (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferment	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimática (UGI/ml)
30	12	0	2,93	0,498	28,972	5,4	0,0	0,0
30	12	2	3,317	0,448	25,984	5,18	0,094435	8,3942
30	12	4	3,63	0,245	13,853	5,18	0,15621	13,8853
30	12	6	4,03	0,0	0,0	5,21	0,19272	17,1306
30	12	8	4,265	0,0	0,0	5,21	0,2127	18,9066
30	12	10	4,342	0,0	0,0	5,21	0,2138	19,0044
30	12	12	4,207	0,0	0,0	5,21	0,223416	20,1258

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.6 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 50 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, sem adição de extrato de levedura.

Tabela C.6 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, $S = 50$ g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment. (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH - ferment	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimát (UGI/ml)
50	0	0	2,8025	0,753	44,211	5,5	0,0	0,0
50	0	2	3,04	0,709	41,581	4,9	0,012	1,133
50	0	4	3,495	0,582	33,992	4,67	0,07835	7,3997
50	0	6	3,787	0,467	27,119	4,46	0,12335	12,0260
50	0	10	4,2775	0,180	9,968	4,27	0,12093	11,4211
50	0	12	4,067	0,180	7,578	4,27	0,12325	11,6412

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.7 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 50 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 6 g/L.

Tabela C.7 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment. (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferment	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimát. (UGl/ml)
50	6	0	2,783	0,823	48,394	5,31	0	0,0
50	6	2	3,05	0,790	46,4224	5,15	0,008065	1,0719
50	6	4	3,92	0,703	41,223	4,78	0,08908	10,5135
50	6	6	4,783	0,576	33,633	4,76	0,14789	15,3292
50	6	8	5,337	0,400	23,116	4,76	0,22396	17,60338
50	6	10	5,255	0,256	14,510	4,76	0,15384	20,0071

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.8 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 50 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 12 g/L.

Tabela C.8 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferm.	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimát. (UGI/ml)
50	12	0	2,807	0,819	48,155	5,23	0,0	0,0
50	12	2	3,3837	0,773	45,406	5,10	0,09786	8,6986
50	12	4	3,886	0,690	40,446	4,93	0,15852	14,09066
50	12	6	5,032	0,554	32,319	4,7	0,20019	17,7946
50	12	8	5,09	0,345	19,829	5,0	0,271	24,0888
50	12	10	5,2604	0,125	6,682	5,0	0,3013	26,7822
50	12	12	5,3139	0,030	0,0	5,0	0,3205	28,4888

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.9 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 70 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, sem adição de extrato de levedura.

Tabela C.9 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e sem adição de extrato de levedura.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferm.	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimát. (UGI/ml)
70	0	0	2,757	1,129	66,681	5,50	0	0
70	0	2	2,95	1,069	63,095	5,40	0,0129	1,14666
70	0	4	3,12	1,029	60,705	5,30	0,0141	1,2533
70	0	6	3,59	0,970	57,179	4,75	0,03313	2,9448
70	0	8	4,082	0,632	36,980	4,72	0,02301	2,04533
70	0	10	4,79	0,443	25,6856	4,72	0,01208	1,0737
70	0	12	4,327	0,200	11,873	4,72	0,01250	1,1111

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.10 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 70 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 6 g/L.

Tabela C.10 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferm.	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimát. (UGI/ml)
		0	2,725	1,111	65,6053	5,5	0	0,0
70	6	2	3,1925	0,930	54,75	5,22	0,10161	9,032
70	6	4	4,1625	0,651	38,115	5,00	0,1519	13,5022
70	6	6	5,84	0,300	17,140	4,80	0,2141	18,792
70	6	8	6,1925	0,182	10,088	4,80	0,2159	19,1555
70	6	10	6,6425	0,182	10,088	4,80	0,2044	18,1688
70	6	12	6,252	0,182	10,088	4,80	0,2117	18,8177

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

Na Tabela C.11 são apresentados os valores experimentais encontrado na fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação com concentração inicial de 70 g/L, suplementada com os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 6,0; 5,0 e 0,6 g/L, respectivamente, e extrato de levedura a 12 g/L.

Tabela C.11 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 70 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 12 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferm.	Atividade enzimát. (UGI/ml)
70	12	0	2,9775	1,149	67,876	5,5	0
70	12	2	4,2525	0,950	55,984	5,07	8,84053
70	12	4	4,98	0,700	41,044	4,90	16,01048
70	12	6	5,84	0,210	11,761	4,73	26,7822
70	12	8	6,657	0,074	3,634	4,73	29,4755
70	12	10	6,88	0,0	0,0	4,70	29,2622
70	12	12	6,717	0,0	0,0	4,70	26,622

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$

ANEXO D

O Anexo D refere-se à fermentação efetuada no minifermentador. Na Tabela D.1 são apresentados os resultados desta fermentação.

Tabela D.1 – Valores experimentais para fermentação em meio contendo solução de soro de queijo, desproteinado por acidificação, S= 50 g/L, em presença de sais e extrato de levedura a 6 g/L.

Concent. de lactose (g/L)	Concent. de extrato de levedura (g/L)	Tempo de ferment. (horas)	Massa seca (g/L)	Lactose (abs)	Lactose (g/L)	pH – ferment	Atividade enzimática (g/L.min)	Atividade enzimática (UGI/ml)	Concent. de Etanol (g/L)
50	6	0	2,96	0,755	44,330	5,75	0,0	0,0	0,0
50	6	3	3,7547	0,520	30,287	5,5	0,08926	7,935	0,0
50	6	6	4,7214	0,385	22,219	5,30	0,19885	17,676	0,0
50	6	9	4,9928	0,249	14,092	5,10	0,2887	25,6622	1,548
50	6	12	5,2452	0,0	0	4,90	0,3036	26,9862	1,64

Curva padrão para atividade enzimática - $C = -0,14340 + 2,914 x$