

[Digite texto]



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**VIABILIZAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE CO-PRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA NA
PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE**

Eng^a. Anna Rafaela Cavalcante Braga

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2009

[Digite texto]

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**VIABILIZAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE CO-PRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA NA
PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE**

Eng^a. Anna Rafaela Cavalcante Braga

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título
de Mestre em Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2009

*Às três pessoas que dedicam suas vidas a mim e eu daria a minha por elas, meu marido,
minha filha e minha mãe.*

“A felicidade às vezes é uma bênção, mas geralmente é uma conquista...”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro ao meu marido, que sempre me estimulou e que foi meu maior ídolo no meio acadêmico, que sempre me fez ter vontade de ser melhor e que em todos os momentos foi meu maior guia.

A minha querida mãe, que em todos os momentos acreditou que eu poderia ser quem eu quisesse, e que mesmo não entendendo minhas escolhas me apoiou em todos os sentidos.

A minha filha, que é o melhor de mim, e pra quem eu me doo ao máximo e mesmo quando esse máximo não é suficiente ela olha nos meus olhos e diz que eu sou a melhor mãe do mundo.

A minha maravilhosa orientadora Susana, por ser tudo que eu preciso na hora que eu preciso, por ser muitas vezes minha mãe, minha irmã, minha amiga e acima de tudo meu exemplo, obrigada por acreditar em mim mesmo sem me conhecer e por me dar a chance de mostrar do que eu posso ser capaz, não só pra todo mundo a minha volta, mas, sobretudo para mim mesma.

À minha amiga Dani, por tudo, se eu pudesse te carregava ao meu lado pro resto da vida, mas pelo menos no coração hei de te carregar, obrigada mesmo, pelo privilégio de conviver e aprender contigo.

Ao meu pai preto Ricardo, por ter me aceitado como filha e por cuidar da minha mãe e do Juninho com carinho.

Ao meu irmão Ramon, porque o simples fato de ele existir já me torna uma pessoa melhor, te amo demais meu irmão, queria ter metade da tua inteligência!

Ao meu pai João e às minhas irmãs, Gabriella e Débora, que apesar do pouco convívio estão e sempre estarão presentes na minha vida.

Aos meus amigos que cultivei durante esse período, minha turma de todas as horas, Ana Paula, Kessiane, Elisane, Jeferson, Sidney, Cíntia, Silvana em especial ao André pelo apoio logístico e pelas sempre ricas e engrandecedoras discussões.

À Ana Sanzo, parceira e amiga que segurou meu choro e deu gargalhada comigo várias vezes.

À Ana Paula Manera, que me ajudou muito e sempre que eu precisei, por ser sempre humilde e gentil comigo e com todos.

Às minhas queridas Patrícia e Nathália, quase minhas filhas, amo muito vocês, sem vocês meus experimentos não teriam sido os mesmos. Às pessoas desse laboratório que me fazem sentir muito bem: Lidi, Susan, Renata, Luisa, Guido, Carol, Ana Paula Rosa,

Paty, Marcela, Nat, Ju, Joana, Débora, Silvana, Fernanda, Fabi, Camila, Ana Raisia e Ailton.

À minha eterna orientadora, que me ajudou a dar os primeiros passos na microbiologia e que me ensinou a amar essa ciência tão intrigante, professora Evânia.

Às minhas tias, Cleuda e Milka que estão sempre comigo mesmo de longe, amo muito vocês, obrigada por serem minhas amigas e por tudo que vocês sabem que representam na minha vida. Às minhas outras tias, não menos importantes, que amo tanto, Euzélia, Téta, Olga, Lidu, Bel, que me amam e que eu posso contar sempre. Meus tios, Jackson, Fifi e Dedé, muito obrigado por serem meus pais.

Aos meus avôs, Deusarina e Fransquim, por terem proporcionado a melhor infância que eu poderia ter tido e por serem tão maravilhosos e presentes sempre, amo muito vocês.

À Fernandinha, Tony, Renato, Celina, Bel, Nágela, Nilde, Alice, Belle, Marina, Ramon, Luisa, Juninho, Raquel e todos os meus amigos que ficaram em Fortaleza e que de uma forma ou de outra estão presentes sempre na minha vida mesmo com a distância.

À minha sogra Carmelita, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos, que me ouviram, comemoraram minhas vitórias e choraram com minhas perdas, Tici, Bianca, Julian, Samile, Fernando, Filipe, Micheli, Gilberto, Paty e Maurício, Grazi e Duane vocês são minha família em Rio Grande e é um prazer ter vocês por perto.

Agradeço a FURG, não só como instituição que me acolheu e me fez amá-la, mas como uma família repleta de profissionais que me ensinaram e ensinarão muito mais. Aos meus professores que de tijolo por tijolo ampliou a casa dos meus conhecimentos, em especial àqueles que tiveram mais contato, Janaína, André, Pinto, e Eliana, serei eternamente grata pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs). Agradeço à Islanda, Gicelda e Dani, pessoas queridas que estiveram sempre disponíveis e que ajudaram sempre que necessárias.

Enfim, agradeço cada abraço, cada puxão de orelha, cada conversa e cada sorriso a vocês que convivem comigo e que me fazem sentir especial.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Enzima β -galactosidase.....	18
3.2 Cultivo Submerso	20
3.3 Microrganismos produtores de β -galactosidase.....	22
3.4 Leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i>	23
3.5 Fatores que influenciam a produção de β -galactosidase	24
3.6 Co-produtos agroindustriais.....	26
3.6.1 Soro de leite.....	26
3.6.2 Água de parboilização de arroz.....	28
3.7 Considerações gerais	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Seleção de microrganismos fermentadores de lactose.....	32
4.1.1 Isolamento dos microrganismos.....	32
4.1.2 Fermentação de lactose.....	32
4.2 Seleção dos microrganismos produtores de β -galactosidase	33
4.2.1 Tratamento do substrato.....	33
4.2.2 Preparo do inóculo.....	34
4.2.3 Cultivo submerso.....	34
4.3 Maximização da produção de β -galactosidase	35

4.4	Validação do estudo da produção de β -galactosidase	36
4.5	Métodos analíticos	36
4.5.1	Extração da enzima	36
4.5.2	Determinação da atividade enzimática.....	36
4.5.3	Determinação da biomassa	37
4.5.4	Determinação dos açúcares totais medidos como lactose	37
4.5.5	Determinação do pH.....	37
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Seleção de microrganismos fermentadores de lactose	39
5.2	Tratamento do substrato.....	40
5.3	Seleção do microrganismo	41
5.4	Planejamento fracionário	46
5.5	Planejamento experimental completo	53
5.6	Estudo da validação do planejamento experimental completo.....	66
	CONCLUSÕES.....	68
6.	CONCLUSÕES	69
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase	22
Tabela 2: Parâmetros de caracterização do soro de leite	27
Tabela 3: Parâmetros de caracterização da água de parboilização do arroz	30
Tabela 4: Descrição dos tratamentos realizados para desproteinização do soro de leite.	34
Tabela 5: Valores reais e codificados utilizados no planejamento fracionário e completo	35
Tabela 6: Média da atividade enzimática para os diferentes métodos de desproteinização do soro de leite	40
Tabela 7: Matriz do planejamento experimental fracionário 2^{6-2} (16 ensaios e 4 pontos centrais), valores codificados e reais	47
Tabela 8: Efeitos dos componentes do meio de cultura sobre a atividade enzimática volumétrica	51
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental completo 2^4 (16 ensaios, 4 pontos centrais e 8 pontos axiais), valores codificados e reais e atividade enzimática máxima como resposta	54
Tabela 10: Coeficiente de regressão para a resposta atividade volumétrica máxima.....	60
Tabela 11: Análise de variância do planejamento experimental completo 2^4	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da lactose.....	19
Figura 2: Viragem ácida a partir da fermentação da lactose pelas linhagens avaliadas...	39
Figura 3: Acompanhamento da atividade enzimática específica, atividade enzimática, da produção da biomassa e variação no pH para as cepas (a) isoladas do soro de leite, (b) isoladas de leite de búfala, (c) para as cepas de bancos de cultura.....	44
Figura 4: Acompanhamento da variação no pH (a), da produção da biomassa (b), da atividade enzimática específica (c), atividade enzimática volumétrica (d), Concentração de lactose de soro de leite (e) ao longo da fermentação para o planejamento experimental fracionário 2 ⁶⁻² _{IV}	50
Figura 5: Estimativa dos efeitos na atividade enzimática volumétrica para concentração extrato de levedura, peptona, lactose, e de (NH ₄) ₂ SO ₄ no planejamento fatorial fracionário.....	52
Figura 6: Estimativa dos efeitos na atividade enzimática específica para concentração extrato de levedura, peptona, lactose, e de (NH ₄) ₂ SO ₄ no planejamento fatorial fracionário.....	53
Figura 7: Acompanhamento da atividade enzimática da β-galactosidase, da produção da biomassa e da variação do pH ao longo da fermentação para o planejamento experimental completo: (a) ensaios de 1 a 7; (b) ensaios de 8 a 14; (c) ensaios de 15 a 21; (d) ensaios de 22 a 28.	56
Figura 8: Acompanhamento da variação da concentração de lactose de soro de leite ao longo da fermentação para: (a) os ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17; (b) os ensaios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18; (c) do ensaio 19 ao 28, do planejamento experimental completo	59
Figura 9: Superfícies de contorno para a atividade de β-galactosidase como uma função da concentração: (a) da lactose e do extrato de levedura; (b) da lactose e da peptona; (c) da lactose e do (NH ₄) ₂ SO ₄ ; (d) do extrato de levedura e da peptona; (e) do extrato de levedura e do (NH ₄) ₂ SO ₄ ; (f) da peptona e do (NH ₄) ₂ SO ₄	61
Figura 10: Acompanhamento da produção da enzima β-galactosidase nas condições ótimas do planejamento completo.....	66

RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose pela enzima β-galactosidase, formando glicose e galactose, tem se mostrado um dos métodos mais promissores para remover a lactose

do leite, facilitando sua utilização em produtos lácteos. Portanto, a seleção de microrganismos produtores dessa enzima, bem como a utilização de co-produtos industriais como fonte alternativa de nutrientes, tem grande importância na maximização da produção da mesma, ocasionando uma contribuição ambiental e econômica em bioprocessos. Nesta dissertação, foi realizada a seleção de microrganismos produtores de β -galactosidase e a enzima foi produzida em meio contendo soro de leite e água de parboilização de arroz, sendo a maximização da produção realizada utilizando técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. Selecionou-se dentre cepas isoladas de produtos lácteos e de cepas de *Kluyveromyces* de bancos de cultura a linhagem com maiores atividades da enzima utilizando meio de cultura contendo: 100 g.L⁻¹ de lactose; 17 g.L⁻¹ de extrato levedura e 8,8 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 se destacou como melhor produtor dentre os microrganismos avaliados, apresentando atividade enzimática de 9 U.mL⁻¹ em 24 h. Este microrganismo foi selecionado para otimização do meio de cultura. Um planejamento experimental fracionário 2⁶⁻²_{IV} foi utilizado para determinar as variáveis que mais influenciavam na produção da enzima. Os parâmetros estudados foram: concentrações de lactose; de extrato de levedura; de peptona; de água de parboilização de arroz; de sulfato de amônio e o pH inicial do meio. De acordo com os resultados, as concentrações de lactose, de extrato de levedura, de peptona e de sulfato de amônio foram selecionadas para serem utilizadas num planejamento experimental completo 2⁴. As ótimas condições para uma maior atividade enzimática foram: concentração de lactose de 120 g.L⁻¹; concentração de extrato de levedura de 5 g.L⁻¹; concentração de peptona de 15 g.L⁻¹ e concentração de sulfato de amônio de 15 g.L⁻¹, a 30 °C e 180 rpm, após 24 h de cultivo em agitador rotatório . A atividade enzimática alcançada foi 10,4 U.mL⁻¹.

Palavras-chave: água de parboilização de arroz, *Kluyveromyces*, planejamento experimental, soro de leite.

VIABILITY IN PRODUCTION OF β -GALACTOSIDASE USING AGROINDUSTRIAL BYPRODUCTS

ABSTRACT

Lactose is a disaccharide that, due to its low solubility and its weak sweetening capacity, has its utility limited in food industry, besides existing cases of its intolerance or its bad absorption. The enzymatic hydrolysis of lactose by the enzyme β -galactosidase, forming glucose and galactose, has proved to be one of the most promising methods to remove lactose from milk. In this study the β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 by submerged cultivation was optimized using techniques of experimental design and analysis of response surfaces. A selection amongst strains isolated and from cultures collection of genus *Kluyveromyces*, the greatest enzyme producer, through cultivation in agitated flasks, using lactose from whey as carbon source. The microorganism *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 was a very good enzyme producer, showing 9 U.mL⁻¹ of enzymatic activity in 24 h. This microorganism was selected for the optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase. A fractional experimental design 2⁶⁻² was used to determine the variables that influenced more in the production of the enzyme. The studied parameters were lactose concentrations, extract yeast, peptone, parboiled rice effluents, ammonium sulphate and initial pH, being that all showed significant effect in the production of the enzyme. In accordance with these results, the concentrations of lactose, extract yeast, peptone and ammonium sulphate were selected to be used in a complete experimental design 2⁴. The optimum conditions for a high enzymatic activities were: 120 g.L⁻¹ of lactose, 5 g.L⁻¹ of yeast extract, 15 g.L⁻¹ of peptone and 15 g.L⁻¹ of ammonium sulphate. The enzymatic activity in these conditions was 10.4 U.mL⁻¹.

Keywords: enzyme, experimental design, parboiled rice effluents, whey.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) ou lactase é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose e soro de leite (GÉKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985). Sua importância vem sendo realçada por sua atividade de galactosiltransferase responsável pela síntese de galactooligossacarídeos que atuam como alimentos funcionais, trazendo diversos efeitos benéficos para seus consumidores (HSU *et al.*, 2007).

A lactose é um dissacarídeo que tem como características principais, baixa solubilidade em água e baixo poder adoçante. A cristalização deste açúcar em produtos lácteos, como leite condensado, e a restrição ao consumo de tais alimentos por pessoas intolerantes a este carboidrato, devido a baixos níveis de lactase intestinal, podem ser evitadas através de dois processos de hidrólise, sendo estes, hidrólise ácida ou enzimática (MAHONEY *et al.*, 1974; HOLSINGER & KLIGERMAN, 1991; WHITAKER, 1994).

O processo ácido é realizado em condições extremas de pH e temperatura, na faixa de 1-2 e 100 a 150 °C respectivamente, e o enzimático utiliza a enzima β -galactosidase e emprega pH e temperaturas amenas, na faixa de 3,5-8 e 5-60°C, respectivamente (GÉKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985). O uso de enzimas permite que se evitem algumas alterações indesejáveis nos produtos, tais como a desnaturação de proteínas e reações de escurecimento que ocorrem no processo ácido (MAHONEY, 1998; SANTOS *et al.*, 1998).

A β -galactosidase é largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais, vegetais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com a sua origem. Suas melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte. As mais importantes lactases, em termos de interesse tecnológico, são produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, são intracelulares e suas sínteses são induzidas por lactose e galactose, reprimidas pela glicose e na sua maioria são obtidas por cultivo submerso (LADERO *et al.*, 2000; SZCZODRAK, 2000).

O aumento da demanda industrial de β -galactosidase resulta na necessidade de métodos de produção que assegurem a hidrólise de lactose em escala comercial (NOR *et al.*, 2001), tornando-se de fundamental importância a seleção de microrganismos que produzam essa enzima, bem como o estudo dos componentes do meio de cultura e das condições do processo. Para esse propósito, a técnica de planejamento experimental é uma estratégia muito útil para melhor compreensão do sistema, permitindo a análise

individual do efeito de cada variável (sinérgico ou antagônico) como a composição de meio de cultura, pH, temperatura e agitação, visando a maximização do rendimento e produtividade do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Em vista da preocupação com o meio ambiente, e reconhecendo que recursos naturais são finitos e deles depende não só a existência humana como a diversidade biológica tem-se buscado cada vez mais o desenvolvimento sustentável. Deste modo, atividades econômicas não podem ser encorajadas em detrimento da base de recursos naturais dos países. O desenvolvimento sustentável sugere, de fato, qualidade em vez de quantidade, com a redução do uso de matérias-primas e produtos e o aumento da reutilização e reciclagem (BECERRA, 2001). Dentre os co-produtos agroindustriais, o soro de leite e a água de parboilização destacam-se por suas demandas geradas pelo setor industrial e por seu conteúdo de nutrientes que podem ser utilizados em processos fermentativos.

Espera-se, portanto, estabelecer as condições de produção da β -galactosidase, utilizando co-produtos agroindustriais da região sul do País, como é o caso do soro de leite e da água de parboilização do arroz, de modo a trabalhar para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de alimentos e minimizar os custos de obtenção da enzima.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivos selecionar microrganismos dentre diversas cepas isoladas de produtos lácteos e de bancos de cultura, as linhagens produtoras da enzima β -galactosidase. Estudar a etapa de produção da enzima, elaborando um meio de cultura com a utilização de co-produtos agroindustriais, maximizando a produção da enzima através da técnica de planejamento experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar cepas de leveduras produtoras de β -galactosidase de produtos lácteos.
- Selecionar dentre as cepas isoladas e as de bancos de cultura (*Kluyveromyces lactis* (NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564) e *Kluyveromyces marxianus* (CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e var *bulgaricus* ATCC 16045) a linhagem que apresente produção superior de β -galactosidase, quando comparada as demais, tendo como substrato soro de leite concentrado.
- Maximizar a produção de β -galactosidase elaborando um meio de cultura contendo soro de leite e água de parboilização do arroz através da técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23), também conhecida como lactase, é classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4Glc) para formar glicose e galactose (MAHONEY, 1998).

A β -galactosidase pode ser obtida por uma ampla variedade de fontes, como microrganismos, plantas e animais, e de acordo com sua fonte, suas propriedades diferem notadamente (PANESAR *et al.*, 2007).

Esta enzima hidrolisa os resíduos D-galactosil a partir de polímeros, oligossacarídeos ou metabólitos secundários sendo a mesma, abundante em muitos microrganismos, animais e plantas (ALCANTARA *et al.*, 2006).

O substrato natural para estas enzimas mais comumente encontrado é a lactose (Figura 1), principal açúcar do leite e de vários produtos lácteos (LADERO *et al.*, 2000). A lactose é um dissacarídeo com um poder adoçante e solubilidade relativamente baixa. Um grande número de pessoas não digere apropriadamente esse carboidrato, devido à falta ou não funcionamento da β -galactosidase intestinal, as mesmas sofrem com disfunções intestinais – gases, dores abdominais e diarreia – se suas dietas contiverem lactose (LADERO *et al.*, 2000).

A biodegradabilidade desse açúcar é bem menor quando o mesmo é comparado aos seus produtos de hidrólise, glicose e galactose. Quando a lactose é indesejada, a hidrólise da mesma é um processo promissor na indústria de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos sem lactose na sua composição, além da reutilização do soro de leite com fonte alimentar (HOLSINGER & KLIGERMAN, 1991).

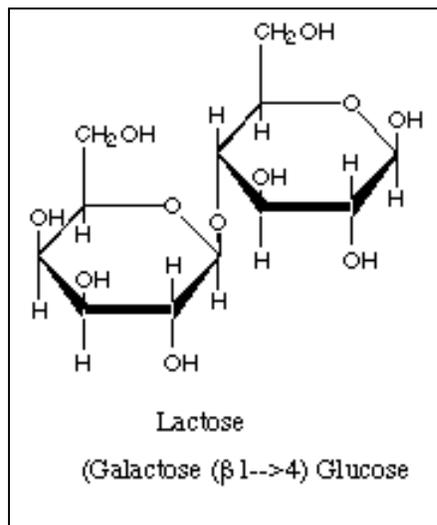


Figura 1: Estrutura química da lactose

Se comparado a outros açúcares, a lactose tem baixa solubilidade e doçura, sendo higroscópico e com uma forte tendência de absorver sabores e odores. Sem um controle apropriado, essas características podem ocasionar defeitos em alimentos refrigerados, como sorvetes. A hidrólise do mesmo poderia evitar a textura arenosa devido aos cristais de lactose sendo uma estratégia interessante para redução de custos em alimentos edulcorantes para a indústria de laticínios (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Existem dois métodos para a hidrólise da lactose: o ácido e o enzimático. A reação é muito rápida quando se utiliza ácido para a catálise, mas a temperatura de reação é bem mais alta no tratamento ácido que no enzimático (150 °C e 30 - 40 °C, respectivamente), e o produto pode mudar a cor e odor que impede a introdução do mesmo no mercado alimentício. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no soro ou no leite sem tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades sensoriais e nutricionais além de aumentar sua doçura. Portanto, a hidrólise enzimática parece ser mais conveniente para a indústria de alimentos (LADERO *et al.*, 2006).

A enzima β -galactosidase pode, adicionalmente, catalisar reações de transgalactosilação com formação de galactoligossacarídeos (GOS) (HSU *et al.*, 2007). GOS são considerados um ingrediente probiótico em alimentos e têm demonstrado a promoção do crescimento e estabelecimento da bifidobactéria no intestino e manifestação dos efeitos benéficos no organismo humano (HSU *et al.*, 2005).

Outras aplicações da enzima β -galactosidase envolvem processos biológicos, incluindo o crescimento de plantas e o amadurecimento de frutas. Além disso, ela tem importantes aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (FURLAN *et al.*, 2000).

Na indústria de alimentos destaca-se seus efeitos benéficos na assimilação de alimentos contendo lactose, bem como as possíveis vantagens tecnológicas e ambientais de aplicação industrial. Aumento da doçura, não necessitando adicionar outro carboidrato; ausência de cristalização nos produtos congelados. Nos sorvetes pode ser substituído 20% da sacarose por xaropes de lactose hidrolisada. A β -galactosidase também pode ser utilizada para eliminar a lactose de concentrados lácteos, em que este dissacarídeo pode causar a agregação da caseína durante o processo de congelamento. O processo de maturação de queijos é acelerado por meio da β -galactosidase, e ao adicionar xarope de soro hidrolisado em iogurtes, a etapa de pré-*evaporação* necessária para concentrar o leite é dispensada. Maior biodegradabilidade do soro quando a lactose é hidrolisada, devido a alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose (MAHONEY, 1974; SANTOS *et al.*, 1998; MAHONEY, 1998; SANTIAGO *et al.*, 2004).

O interesse econômico na β -galactosidase produzida por leveduras é oriundo das possibilidades do seu emprego, destacando-se seu uso em produtos direcionados para intolerantes a lactose causada pela deficiência de β -galactosidase, em grande parte da população mundial, como é o caso, por exemplo, de populações negras da África Central, EUA e Brasil. O tratamento do leite e seus derivados, com esta enzima, reduzem o conteúdo de lactose. Deste modo, produtos com baixos teores de lactose ou mesmo sem esse açúcar, podem ser utilizados por essa população (MARTINS *et al.*, 2002).

Além disso, o leite hidrolisado pode ser utilizado na fabricação de doce de leite e leite condensado evitando a cristalização durante a estocagem causada pela baixa solubilidade da lactose. A β -galactosidase é também aplicada na conversão do soro de leite, um subproduto da indústria de laticínios, em diferentes produtos com valor agregado (FURLAN *et al.*, 2000). Como há um contínuo interesse na utilização da lactose proveniente do soro de leite, diversas pesquisas vêm sendo realizadas utilizando essa enzima para a hidrólise da lactose contida no mesmo (SZCZODRAK, 2000).

3.2 Cultivo Submerso

A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, embora também haja a utilização da fermentação no estado

sólido para esse fim em menor escala. Existem várias desvantagens para a fermentação em estado sólido com a finalidade de se produzir enzimas dentre elas: maiores riscos de contaminação; necessidade de espaço e menores rendimentos dentre outros (LIMA *et al.*, 2001). No caso do uso de produtos de descarte que apresentam grande quantidade de água, como efluentes, para a produção dessa enzima obviamente a fermentação submersa é a mais adequada (LIMA *et al.*, 2001).

A escolha do sistema mais apropriado também depende da quantidade de água presente no meio a ser utilizado. Quando se utiliza um resíduo agroindustrial com baixos teores de água a fermentação em estado sólido pode ser mais adequada. Já quando se utiliza subprodutos com grande quantidade de água, o processo mais adequado é a fermentação submersa (REGULY, 2000).

Os nutrientes presentes no substrato, que podem ser produtos residuais, mas geralmente são açúcares como a glicose, sacarose ou lactose, são requisitos básicos de uma fermentação. Esse substrato deve ter o menor custo possível; atender às necessidades do microrganismo além de auxiliar no controle do processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

As técnicas de cultivo submerso industrialmente predominantes, têm se beneficiado dos avanços na instrumentação e controle de processos. Sendo esta técnica cada vez mais utilizada para produção de diferentes enzimas, pelos mais variados microrganismos, incluindo os geneticamente modificados (LIMA *et al.*, 2001).

Diversos autores citam produtos subutilizados como fornecedores potenciais de nutrientes, dentre eles: o soro de leite, o melaço de cana e a água de maceração do milho. O uso dessas matérias pode reduzir substancialmente o custo na produção de bioprodutos (FURLAN *et al.*, 2000; SANTIAGO *et al.*, 2004; AKTAS *et al.*, 2006).

Uma grande proporção de produtos microbianos potencialmente úteis é retida dentro das células dos seus produtores. O isolamento do material intracelular requer que a célula seja geneticamente modificada (de forma que o conteúdo intracelular possa ser excretado no meio de cultivo) ou as células devem ser desintegradas liberando o conteúdo citoplasmático (GECIOVA *et al.*, 2002).

A enzima β -galactosidase é um bioproduto intracelular, sendo de extrema importância utilizar um método adequado para a recuperação e quantificação da mesma. Dentre os métodos de ruptura, a sonificação que promove a ruptura da célula por cavitação, vem sendo uma boa alternativa, em nível de laboratório, pois apresenta baixo custo de operação, não requer equipamento sofisticado, nem treinamento técnico extensivo (OZBEK & ULGEN, 2000).

3.3 Microrganismos produtores de β -galactosidase

A maioria das enzimas comercialmente importantes é produzida a partir de um número limitado de microrganismos, pois as mesmas para serem utilizadas na indústria de alimentos precisam ser GRAS (“Generally recognized as safe”), ou seja, própria para consumo humano. O critério de viabilidade econômica de um processo está estreitamente relacionado com as normas legislativas que regem tanto as operações quanto a inocuidade do produto final, devendo-se observar efeitos nocivos como toxicidade química, toxicidade relacionada com a atividade enzimática e reações alérgicas (RECH *et al.*, 1999). Muitos microrganismos são citados como produtores de β -galactosidase por diversos autores, podendo ser bactérias, fungos filamentosos ou leveduras.

A Tabela 1 apresenta algumas dessas referências com os respectivos microrganismos produtores de β -galactosidase.

Tabela 1: Microrganismos produtores de β -galactosidase

Microrganismo	Referência
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BECERRA E SISO (1996); KIM <i>et al.</i> (1997); PINHEIRO <i>et al.</i> (2003); JURADO <i>et al.</i> (2004); KIM <i>et al.</i> (2004); SPLECHTNA <i>et al.</i> (2006); PANESAR <i>et al.</i> (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	BRADY <i>et al.</i> (1995); RECH <i>et al.</i> (1999); FURLAN <i>et al.</i> (2000); RAJOKA <i>et al.</i> (2003); SANTIAGO <i>et al.</i> (2004)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	SANTOS <i>et al.</i> (1998); SILVA <i>et al.</i> (1999); LADERO <i>et al.</i> (2000); SZCZODRAK <i>et al.</i> (2000); JURADO <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus niger</i>	HATZINIKOLAOU <i>et al.</i> (2005); RODRIGUEZ <i>et al.</i> (2006); PANESAR <i>et al.</i> (2007)
<i>Bifidobacterium longum</i>	KIM <i>et al.</i> (2004); HSU <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	BURY <i>et al.</i> (2001);
<i>Lactobacillus reuteri</i>	SPLENCHTNA <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	VASILJEVIC & JELEN (2001); VASILJEVIC & JELEN (2002)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	CRUZ <i>et al.</i> (1999)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	VASILJEVIC & JELEN (2001)
<i>Candida pseudotropicalis</i>	INCHAURRONDO <i>et al.</i> (1994)

Nos trabalhos citados na Tabela 1, as condições de crescimento dos diferentes microrganismos para a produção dessa enzima variam. Demonstrando assim, que estudos do pH, da agitação, da aeração, dos componentes do meio de cultura, dentre outros, são fatores que necessitam de mais estudos para que se possa otimizar o processo de produção da enzima.

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. São amplamente distribuídas na natureza e se multiplicam por fissão binária ou por brotamento. Estes microrganismos são capazes de crescimento anaeróbico facultativo (PINCUS *et al.*, 2007), pois podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Se for dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar os carboidratos formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os carboidratos através de uma determinada via metabólica produzindo outros metabólitos (PINCUS *et al.*, 2007).

As leveduras têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais. São muito versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais. São microrganismos essenciais na produção de vários alimentos e bebidas como pães, cerveja, vinho e sidra (SENSES-ERGUL *et al.*, 2006).

A produção de β -galactosidase por leveduras tem sido bastante reportada em trabalhos científicos, pois as mesmas apresentam uma grande produção dessa enzima (BRADY *et al.*, 1995; RECH *et al.*, 1999; FURLAN *et al.*, 2000; RAJOKA *et al.*, 2003; SANTIAGO *et al.*, 2004).

As β -galactosidases produzidas por leveduras são geralmente intracelulares, sua síntese é induzida por lactose e galactose sendo reprimida pela glicose (RECH, 1998).

Apesar de várias pesquisas atuais analisarem condições mais viáveis de produção dessa enzima ainda busca-se selecionar leveduras com potencial de produção superior as já estudadas (NAHVI & MOIENI, 2004).

3.4 Leveduras do gênero *Kluyveromyces*

A utilização do gênero *Kluyveromyces* tem sido reportada, nos últimos anos, nos produtos das indústrias de laticínios, nas bebidas fermentadas e nos queijos, nos quais ela parece apresentar um importante papel no desenvolvimento das características

funcionais e sensoriais dos produtos finais. *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* são organismos muito utilizados industrialmente devido a sua habilidade em degradar a lactose (YANG & SILVA, 1995).

Entre os substratos que permitem o crescimento deste microrganismo estão os açúcares galactose, celobiose, xilose, glicose entre outros. Sendo a lactose um substrato passível de utilização, mas, neste caso, sua utilização é intracelular (RAJOKA *et al.*, 2003).

O emprego de *Kluyveromyces* para produção de lactase oferece algumas vantagens, como: bom rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; aceitabilidade como um microrganismo seguro, aspecto técnico importante ao considerar que os produtos fermentados têm aplicações farmacêuticas e alimentícias; podem crescer a uma ampla faixa de temperatura; atividade de β -galactosidase mais alta em algumas cepas de *K. marxianus*, que outras leveduras como a *Candida* quando lactose é usada como substrato; alta velocidade de crescimento, permitindo-lhe sobrepujar microrganismos contaminantes; predomínio de um metabolismo oxidativo fornecendo para esta levedura uma vantagem quando comparada a outros microrganismos desde que permite a geração de altos rendimentos em biomassa podendo ser usada como fonte de nutrientes para dietas humanas e animais (BELEM & LEE, 1998a; INCHAURRONGO *et al.*, 1994; RECH, 1998, RUBIO-TEXEIRA, 2006).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui características de grande interesse para processos industriais, tais como crescimento a elevadas temperaturas (40°C), diminuindo os custos de resfriamento e os riscos de contaminação e altas velocidades de crescimento (FURLAN *et al.*, 1995).

A versatilidade da utilização da levedura *K. marxianus* como microrganismo de interesse industrial, tem sido amplamente ilustrada pela diversidade de processos industriais propostos pela literatura. Entre eles estão a produção de lactase, algumas vezes, simultaneamente, com inulinase e com pectinases. Em todos estes processos, destaca-se a utilização do soro de leite como meio de cultura (RECH, 1998).

3.5 Fatores que influenciam a produção de β -galactosidase

Diversos autores vêm desenvolvendo pesquisas para que se possam determinar as melhores condições, tanto do ponto de vista econômico como ambiental, para produção de bioprodutos. Para tanto, observa-se um maior interesse nas variáveis:

pH, fonte energética, concentração iônica, temperatura, e condições culturais (NOR *et al.*, 2001; JURADO *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2005; AKTAS *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2007).

Rech *et al.*, em 1999, determinaram as condições ideais de crescimento para as leveduras *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e *K. marxianus* CBS 6556, empregando soro de leite como substrato para a produção de lactase. O pH e temperaturas ideais de crescimento foram 5,5 e 35-37 °C, para ambos os microrganismos. O meio de cultura ideal foi o soro de leite in natura (7% p/v) para a cepa CBS 6556 e soro de leite suplementado com extrato de levedura (1% p/v) para a cepa 712. As duas cepas apresentaram um pico de atividade nas 10 h de fermentação, a atividade obtida foi 4 e 5 U.mL⁻¹, respectivamente. Por utilizar um meio de cultura mais simples e de baixo custo, a levedura *K. marxianus* CBS 6556 foi submetida para testes de otimização do processo com soro de leite concentrado (21% p/v), resultando em 10 U.mL⁻¹ em 15 h de fermentação.

Rajoka *et al.* (2003) verificaram a produção β-galactosidase na presença de lactose, galactose, celobiose, xilose, arabinose, sacarose e glicose em frascos agitados utilizando a levedura *K. marxianus* NIBGE Y-1. O tipo de substrato e a temperatura foram às variáveis que influenciaram diretamente no crescimento específico e na produção da enzima. Lactose (2% p/v) apresentou maior rendimento na produtividade específica, seguida por galactose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e glicose. As temperaturas testadas estavam na faixa entre 22-45 °C, os valores máximos para a produtividade foram 35 °C para temperatura e 5,5 para pH.

Em 2005, Hsu *et al.* estudaram a produção de β-galactosidase em fermentador, por microrganismos do gênero *Bifidobacterium longum* CCRC 15708, organismo probiótico, além das condições de cultura que afetam a produção dessa enzima. Os resultados do estudo mostraram que a produção de β-galactosidase por *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 tem alta atividade específica. Após a otimização da composição do meio de cultura e condições de crescimento foi verificada uma atividade máxima de 18,6 U.mL⁻¹.

Hsu *et al.* (2007) verificaram as condições de crescimento e produção de β-galactosidase por *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 em fermentador de 5 L verificando a influência da temperatura de cultivo (27-42 °C), pH do meio (4,5-7,5) e velocidade de agitação (5-200 rpm). A atividade máxima de β-galactosidase foi em torno de 10 U.mL⁻¹ obtida sob a temperatura de 37 °C, pH de 6,5 e sob 100 rpm de velocidade de agitação.

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O planejamento experimental tem sido utilizado como ferramenta importante para uma avaliação desses parâmetros e como fonte de informações para otimização da produção de bioprodutos (AKTAS et al., 2006).

3.6 Co-produtos agroindustriais

O estudo dos processos de obtenção de bioprodutos deve visar obtenção do produto com máximo de rendimento, minimização das matérias-primas e a utilização de resíduos industriais. Com esse objetivo, para produção da β -galactosidase pode-se empregar como substrato para fermentação o soro de leite (BECERRA et al., 2001), água de maceração de milho, melão de cana-de-açúcar (FURLAN et al., 2000) bem como a água de parboilização de arroz como fontes de nutrientes alternativos aos comerciais.

3.6.1 Soro de leite

O soro de leite é um dos mais estudados co-produtos, sendo o mesmo a fração aquosa gerada como um subproduto da produção de queijo na qual é produzido em larga escala (MOEINI et al., 2004). Este contém aproximadamente 93% de água, 5% lactose, 0,9% compostos de nitrogênio, 0,6% de sais minerais e vitaminas, 0,3% de gordura e 0,2% de ácido láctico (BECERRA et al., 2001).

O alto conteúdo orgânico com elevadas demandas de oxigênio biológico (BOD), causam sérios danos se descarregados diretamente no ambiente (MOEINI et al., 2004). A carga poluente de um litro de soro representa 30–50 g BOD, 60–70 g demanda de oxigênio químico (COD) e 1,2 g de matéria em suspensão (KESKINLER et al., 2004).

Há um contínuo interesse na utilização da lactose proveniente do soro de leite para a fabricação de produtos com alto valor agregado. Muitas pesquisas vêm utilizando

microrganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos para a fermentação de lactose, no intuito de produzir proteína unicelular (SPC), etanol, ácido láctico e acetato (TANGO & GHALY 1999). O soro líquido também pode ser utilizado para produção de proteína em pó para o uso como um aditivo alimentar ou na alimentação animal (KESKINLER *et al.*, 2004).

Além dessas aplicações também podemos verificar algumas pesquisas que utilizam o mesmo como meio de culturas para produção de β -galactosidase (SZCZODRAK, 2000). BALES & CASTILLO (1979) estudaram a produção de lactase por *Candida* cultivada em soro de leite, enquanto BELÉM & LEE (1998), produziram bioingredientes a partir do soro de leite. AKTAS *et al.*, (2005), otimizaram a utilização da lactose de soro de leite desproteínizado usando a metodologia de superfície de resposta. CAPITANI *et al.*, (2005), promoveram a recuperação de proteínas a partir do soro de leite. Em 2006, BEKATOROU *et al.*, selecionaram leveduras pela hidrólise da lactose de soro de leite.

Na Tabela 2 estão demonstrados os parâmetros do soro de leite, fornecido pela Elegê Laticínios SA. (RS, Brasil), e utilizado nos experimentos do presente estudo.

Tabela 2: Parâmetros de caracterização do soro de leite

Parâmetro	Resultado Obtido	Padrão
Teor de Gordura	< 0,6%	0,5 - 3%
Peso Específico	0,56 g/cm ³	Max. 0,61
Acidez	0,06%	0,02 - 0,10
pH	6,3	6,0 - 6,6
Cloretos	3,7%	Max. 6,0%
Umidade	1,7%	Max. 3,0%
Insolubilidade	< 0,5 ml/24°C	Max. 1%
Lactose	77,6%	69 - 79%
Proteínas	11,7%	11 - 14%
Sais Minerais	8,4%	Max. 9%

As proteínas do soro de leite devem ser hidrolisadas, quando o mesmo é utilizado como componente do meio de cultura, para evitar a precipitação durante o processo de esterilização, (RECH *et al.*, 1999). Diferentes métodos de desproteínização têm sido reportados na literatura para evitar a precipitação de proteínas do soro de leite

durante sua esterilização. (RECH *et al.*, 1999; AKTAS *et al.*, 2003; MATHEUS & RIVAS, 2003; LONGHI *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2004; RECH & AYUB, 2007).

Os métodos mais utilizados são a desproteinização termoácida e a utilização de alcalase. O método termoácido para soro de leite consiste em ajustar o pH para 4,6 com ácido acético PA e posterior aquecimento em banho Maria (90 °C por 15 min), as proteínas precipitadas serão removidas por filtração a vácuo (MATHEUS & RIVAS, 2003). Já a técnica utilizando Alcalase precipita as proteínas do soro através de hidrólise com uma protease comercial (Alcalase 2,4 L, 1 mL.L⁻¹, Novo Nordisk A/S, Copenhagen, Dinamarca), com pH 8,5 e a 55 °C por 3 h (RECH *et al.*, 1999; RECH & AYUB, 2007), com esse procedimento as proteínas restantes do soro são solúveis.

3.6.2 Água de parboilização de arroz

Um dos co-produtos com grandes volumes de produção é a água de parboilização de arroz. Este processo utiliza 1,12 L de água e gera 0,83 L de efluente por quilograma de arroz, que contém altas cargas de substâncias orgânicas e nutrientes (BRASIL, 2009). O arroz é um dos cereais de maior importância na atualidade, tanto a nível mundial como nacional, sendo constituinte básico da dieta brasileira. O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores de arroz, ocupando o nono lugar no mercado mundial. O Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de arroz, sendo responsável por cerca de 50% da produção no país (BRASIL, 2009).

A parboilização tem se tornado um dos mais importantes processos de beneficiamento do arroz. Segundo AMATO e SILVEIRA (1991), em nível de exportações, o arroz parboilizado participa em cerca de 50% deste comércio.

A legislação brasileira define a parboilização como sendo o processo hidrotérmico, no qual o arroz em casca é imerso em água potável com temperatura acima de 58°C, seguido de uma gelatinização parcial ou total do amido e secagem (BRASIL, 2009). Este procedimento da imersão do arroz em água é também chamado maceração e encharcamento (GARIBALDI, 1974; SILVA, 1980; AMATO e SILVEIRA, 1991).

AMATO, *et al.*, (1989), citam que em relação aos descartes de água do processo de parboilização, o ponto crítico está na água de encharcamento onde a demanda bioquímica de oxigênio é bastante alta, e que 54% das indústrias descarregam águas diretamente em rios e riachos. A falta de homogeneidade na distribuição da temperatura na fase de encharcamento resulta em uma maior lixiviação do material orgânico do grão, em especial do amido do endosperma, isso se traduz em um aumento

direto da demanda sobre o meio ambiente. GUTKOSKI (1991), avaliando o efeito das condições de maceração e autoclavagem na parboilização do arroz, conclui que os teores de sólidos totais e cinzas, da água de maceração aumentam com o tempo de encharcamento, o que é explicado pela perda dos componentes do grão para a água.

O processo de parboilização envolve significativo volume de efluente, cujos nutrientes em especial o nitrogênio por ele carregado, poderiam ser aproveitados como proteína unicelular, se incorporados em microrganismos, contribuindo assim tanto para solução de problemas da poluição como na produção de proteína, objetivando a suplementação alimentar (QUEIROZ & KOETZ, 1997).

A água de parboilização de arroz tem sido recentemente aplicada em alguns processos biotecnológicos para conversão desse co-produto abundante em bioprodutos com maior valor agregado. Em 2007, JACOB-LOPES *et al.*, estudaram a utilização de água de parboilização de arroz como substrato para o cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli*.

Outro estudo foi realizado para avaliar a cinética de remoção de nitrogênio e matéria orgânica da água de parboilização de arroz pela cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* (QUEIROZ *et al.*, 2007).

A água de parboilização de arroz, também foi recentemente utilizada como substrato na formulação de um meio de cultura para a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrohous)* (SILVA, 2009).

Portanto, é importante investir cada vez mais na utilização desse co-produto em processos biotecnológicos. Com esse intuito, o presente trabalho é o primeiro a produzir a enzima β -galactosidase utilizando a água de parboilização de arroz como um dos componentes do meio de cultura. Além de combinar dois co-produtos de grande abundância na Região Sul do país para a biobrodução, contribuindo assim, com a diminuição de gastos com tratamento de efluentes bem como o desenvolvimento sustentável e preservação do meio ambiente.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros observados na água de parboilização do arroz, determinados experimentalmente e utilizadas no presente trabalho.

Tabela 3: Parâmetros de caracterização da água de parboilização do arroz

Parâmetro	Resultado Obtido
Carbono Total	230 mg.L ⁻¹
Nitrogênio Total	180 mg.L ⁻¹
Fósforo Total	35,5 mg.L ⁻¹
pH	4,3
Sólidos Totais	4,9 g.L ⁻¹
Açúcares Totais	110 mg.L ⁻¹

3.7 Considerações gerais

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada, foram observados poucos trabalhos utilizando soro de leite concentrado para a produção de β -galactosidase, bem como não foram encontradas pesquisas que realizem o aproveitamento da água de parboilização do arroz, como fonte de nutrientes para o meio de cultivo na produção dessa enzima.

Além deste aspecto, poucos estudos enfocam a otimização de meio de cultura para produção de β -galactosidase, fazendo-se necessário um estudo tendo em vista sua importância na indústria de laticínios.

Utilizando fontes alternativas de nutrientes, como o efluente de parboilização, soro de leite e a estratégia de planejamento experimental, que realiza um menor número de experimentos quando comparado as técnicas convencionais de otimização, é possível alcançar a minimização de custos e maximização de rendimento do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de microrganismos fermentadores de lactose

4.1.1 Isolamento dos microrganismos

Para enriquecimento das leveduras presentes no soro de leite (Elegê Laticínios SA., RS, Brasil) e no leite de búfala (Estância da Búfala Praia do Cassino), 5 mL de cada substrato foi inoculado em 50 mL de caldo extrato de malte contendo $0,1\text{g.L}^{-1}$ de cloranfenicol (para evitar crescimento bacteriano) e incubado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h com agitação constante de 180 rpm (NAHVI & MOEINI, 2004).

As leveduras foram isoladas por espalhamento no ágar extrato de levedura glicose (YGCA) depois de realizar diluições em séries. As placas foram incubadas em estufa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Colônias com diferenças morfológicas foram selecionadas e transferidas por estriamento em ágar batata dextrose (PDA). Os isolados purificados foram armazenados em PDA a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (NAHVI & MOEINI, 2004).

4.1.2 Fermentação de lactose

Experimentos foram realizados para verificar a capacidade das cepas isoladas (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14) e as de bancos de cultura (*Kluyveromyces lactis* (NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564)) e *Kluyveromyces marxianus* (CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e var *bulgaricus* ATCC 16045)) de hidrolisar lactose, onde as mesmas foram utilizadas em experimentos posteriores.

A hidrólise da lactose foi testada com uma solução 2% (p/v) desse carboidrato. O meio de cultivo consistia de 4,5 g de extrato de levedura, 7,5 g de peptona, e 20 g de lactose em um litro de água destilada. Ao final adicionou-se 4 mL da solução estoque de Azul de Bromotimol (50 mg.75 mL^{-1} em água destilada) a qual foi adicionada em 100mL do meio de fermentação de açúcares. O pH final do meio foi ajustado para 7,0.

O meio foi distribuído nos tubos contendo Durham (4 mL por tubo) e esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Os tubos foram inoculados com a levedura com 48 h de crescimento em ágar batata dextrose (PDA) e incubadas em estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 28 dias.

Os tubos foram observados regularmente. Resultados positivos eram indicados pela acumulação de gás nos tubos de Durham e mudança de cor do indicador de verde para amarelo (NAHVI & MOEINI, 2004).

4.2 Seleção dos microrganismos produtores de β -galactosidase

4.2.1 Tratamento do substrato

O soro de leite foi desproteínizado para ser utilizado como substrato (fonte de lactose) na seleção do microrganismo com maior atividade enzimática de β -galactosidase. Para a escolha do melhor tratamento de desproteínização do soro de leite foram testados diferentes métodos conforme Tabela 4.

A desproteínização foi realizada de duas maneiras: a primeira via enzimática com a utilização de alcalase e a segunda através de tratamento termoácido, sendo a esterilização realizada em autoclave. A escolha do tratamento foi realizada selecionando a condição na qual o meio conduziu a maior atividade da enzima após o cultivo.

Na técnica enzimática, o soro de leite em pó concentrado foi reconstituído e para cada litro do mesmo adicionou-se 1 mL de alcalase (Alcalase 2,4, Novo Nordisk S.A.) essa solução foi incubada em banho maria a 55 °C por 3 h. O soro de leite foi posteriormente filtrado a vácuo (RECH *et al.*, 1999, RECH & AYUB, 2007).

Para o método termoácido o soro de leite em pó foi reconstituído, seu pH foi ajustado para 4,6 com ácido acético P.A. e incubado a 90 °C em banho maria por 15 min. O soro de leite foi posteriormente filtrado a vácuo (MATHEUS & RIVAS, 2003).

Ambos os métodos de desproteínização do soro foram combinados com esterilização a 121 °C.15 min⁻¹ utilizando autoclave, sendo o soro desproteínizado adicionado aos outros componentes do meio de cultura.

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi inoculado nas diferentes condições e incubado por 72 h em agitador rotatório a 30 °C e 180 rpm. Foram conduzidos 3 cultivos de cada tratamento e realizou-se a determinação do pH, da biomassa, da atividade enzimática específica (U.mg⁻¹) e da atividade volumétrica (U.mL⁻¹) para avaliar cada método.

Tabela 4: Descrição dos tratamentos realizados para desproteíntização do soro de leite

Tratamento	Descrição
AA	Desproteíntizado com alcalase e esterilizado em autoclave
TA	Desproteíntização termoácida e esterilizado em autoclave

4.2.2 Preparo do inóculo

As culturas a serem testadas foram assepticamente transferidas para frascos contendo 150 mL do meio de cultura e incubadas em agitador rotatório a 180 rpm e 30 °C por 24 h. O meio de cultura utilizado foi composto de soro de leite concentrado reconstituído, o equivalente a 10 g.L⁻¹ de lactose, desproteíntizado com Alcalase a 55 °C por 3 h horas em banho maria, (RECH *et al.*, 1999; RECH *et al.*, 2007) contendo 5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 8,8 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,4 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 17 g.L⁻¹ de extrato de levedura (MANERA *et al.*, 2008). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min.

4.2.3 Cultivo submerso

O inóculo foi padronizado, utilizando câmara de Newbauer para a contagem de células, de modo a obter-se no início do cultivo sempre a mesma concentração celular 1,0 x 10⁷ células.mL⁻¹ (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Para selecionar o microrganismo com maior produção de β-galactosidase foram realizados cultivos submersos em frascos de erlenmeyer com o mesmo meio de cultura descrito no item 4.2.2, acrescidos com 10% do inóculo. As condições operacionais foram 30 °C e 180 rpm por 72 h.

Os cultivos submersos foram realizadas em duplicata para cada microrganismo estudado, sendo coletadas alíquotas do caldo com 10 h, 22 h, 48 h e 72 h de cultivo e analisadas quanto ao pH, biomassa (mg.mL⁻¹), atividade específica (U.mg⁻¹) e atividade volumétrica (U.mL⁻¹).

4.3 Maximização da produção de β -galactosidase

Nessa etapa do trabalho foram avaliados os efeitos da concentração de soro de leite (utilizado como fonte de lactose), do extrato de levedura, da peptona, da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, da água de parboilização de arroz e do pH inicial do meio na produção de β -galactosidase do microrganismo selecionado. Foi utilizado um planejamento experimental fracionário 2^{6-2} (16 ensaios mais 4 pontos centrais), as faixas estudadas foram selecionadas de acordo com a literatura e estão apresentadas na Tabela 6, tendo como resposta a atividade máxima de β -galactosidase.

Um planejamento experimental completo 2^4 (16 ensaios mais 4 pontos centrais e 8 pontos axiais) foi realizado para as quatro variáveis selecionadas do planejamento fatorial fracionário, tendo como resposta a atividade máxima de β -galactosidase. Os níveis das variáveis estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores reais e codificados utilizados no planejamento fracionário e completo

Planejamento	Níveis codificados	Soro de leite / Lactose	Extrato de levedura	Peptona	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Água de parboilização de arroz	pH inicial
		(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	
Fracionário	-1	10	1	0	0	0	4
	0	55	10,5	10	6	15	5
	+1	100	20	20	12	30	6
Completo	-2	10	5	0	0	-	-
	-1	37,5	11,25	3,75	3,75	-	-
	0	62,5	17,5	7,5	7,5	-	-
	+1	92,5	23,73	11,25	11,25	-	-
	+2	120	30	15	15	-	-

As quantidades de KH_2PO_4 , e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram fixadas em 5 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹, respectivamente, para todos os ensaios, o pH inicial do meio de cultura variando conforme planejamento.

O meio de cultura utilizado para o inóculo foi composto de soro de leite concentrado reconstituído, o equivalente a 10 g.L⁻¹ de lactose, desproteínizado com alcalase a 55 °C por 3 h horas em banho maria (RECH *et al.*, 1999; RECH *et al.*, 2007) contendo 5 g.L⁻¹ de KH_2PO_4 , 8,8 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g.L⁻¹ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 17 g.L⁻¹ de extrato de levedura e ajustado a pH 6,0 (MANERA *et al.*, 2008). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para os cultivos de ambos os

planejamentos experimentais, o inóculo foi padronizado de modo a obter-se no início do cultivo sempre $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

O cultivo submerso foi realizado com meio de cultura variando de acordo com os componentes de cada ensaio previsto no planejamento experimental. As condições operacionais foram 30 °C e 180 rpm, sendo coletadas e analisadas alíquotas do caldo com 10 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h de fermentação para análise de pH, biomassa, atividade enzimática e lactose residual.

4.4 Validação do estudo da produção de β -galactosidase

Foram realizados cultivos a 30 °C, 180 rpm por 144 h, com as melhores condições obtidas no planejamento experimental completo. A composição do meio de cultura foi: concentração de lactose de 120 g.L⁻¹, concentração de extrato de levedura de 5 g.L⁻¹, concentração de peptona de 15 g.L⁻¹ e concentração de sulfato de amônio de 15 g.L⁻¹, com pH inicial do meio de 4,0 e a concentração de água de parboilização de arroz fixada em 30 g.L⁻¹. Realizou-se o acompanhamento da atividade enzimática, da produção da biomassa, do consumo de lactose e da variação no pH ao longo do cultivo.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Extração da enzima

Para romper as células, adicionou-se 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm, para cada mL de célula em suspensão (MEDEIROS *et al.*, 2008). A suspensão foi submetida à agitação em vortex por 10 minutos e em seguida centrifugada a 4700 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática (MANERA, 2006).

4.5.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando como substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) segundo Inchaurredo *et al.* (1994).

Uma amostra de 0,05 mL foi adicionada a 2 mL de ONPG, em tampão fosfato pH 6,6 e incubado por 5 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10%. O composto *o*-nitrofenol (ONP) foi medido

espectrofotometricamente há 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto.

4.5.3 Determinação da biomassa

A concentração de célula durante a bioprodução de β -galactosidase foi estimada por leitura da absorvância a 620 nm, onde a conversão da absorvância em biomassa (gramas de célula seca por litro) conforme curva padrão para cada microrganismo (RECH *et al.*, 1999).

4.5.4 Determinação dos açúcares totais medidos como lactose

Durante o acompanhamento da maximização da produção de β -galactosidase foi realizada a análise dos açúcares totais medidos como lactose. Após a retirada da alíquota nos tempos determinados, o caldo com células foi centrifugado (4700 \square g) em centrífuga refrigerada, sendo então determinada a concentração de lactose, no sobrenadante livre de células, utilizando o método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

4.5.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um pHmetro segundo AOAC (1995). Após a retirada da alíquota nos tempos determinados, o caldo com células foi centrifugado (4700 \square g) em centrífuga refrigerada, sendo então determinado o pH no sobrenadante livre de células.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de microrganismos fermentadores de lactose

A enzima β -galactosidase é produzida para hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose (RECH & AYUB, 2007). Como resultados preliminares foram verificados a capacidade de utilização do açúcar lactose dos microrganismos, tanto os isolados do soro de leite e do leite de búfala como os do banco de cultura.

Entre os 14 microrganismos isolados (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14) apenas 7 tiveram habilidade de hidrolisar esse açúcar, destes 3 foram isolados de leite de búfala (M2, M12 e M14) e 4 isolados de soro de leite (M1, M3, M4 e M11).



Figura 2: Viragem ácida a partir da fermentação da lactose pelas linhagens avaliadas

Dentre os microrganismos do banco de cultura avaliados (*Kluyveromyces lactis* (NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564) e *Kluyveromyces marxianus* (CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e var *bulgaricus* ATCC 16045)), todos foram capazes de hidrolisar a lactose. Através desses resultados foram escolhidas as culturas para verificação da capacidade de produção de β -galactosidase.

5.2 Tratamento do substrato

Vários métodos de desproteínização têm sido reportados na literatura para evitar a precipitação de proteínas do soro de leite durante sua esterilização. (RECH *et al.*, 1999; AKTAS *et al.*, 2003; MATHEUS & RIVAS, 2003; LONGHI *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2004; RECH *et al.*, 2007).

A fim de escolher o tratamento mais adequado para as condições do presente estudo foram avaliadas 2 diferentes combinações para desproteínização do soro de leite visando uma resposta eficiente e operacionalmente viável.

A Tabela 5 mostra os resultados da análise de diferença entre as médias dos tratamentos realizada utilizando do teste t. Através do mesmo pode-se observar que os tratamentos diferem entre si ($p < 0,05$) para ambas as respostas, tanto atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) quanto para atividade volumétrica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Tabela 6: Média da atividade enzimática para os diferentes métodos de desproteínização do soro de leite

Tratamento	Atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Atividade volumétrica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
AA	$1,11 \pm 0,06^a$	$6,94 \pm 0,16^a$
TA	$0,46 \pm 0,06^b$	$5,29 \pm 0,66^b$

Letras diferentes na mesma coluna representam valores diferentes entre si ($p < 0,05$)

A atividade específica máxima obtida utilizando o tratamento AA foi de $1,11 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, enquanto que ao utilizar o tratamento TA a atividade máxima obtida não ultrapassa $0,46 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

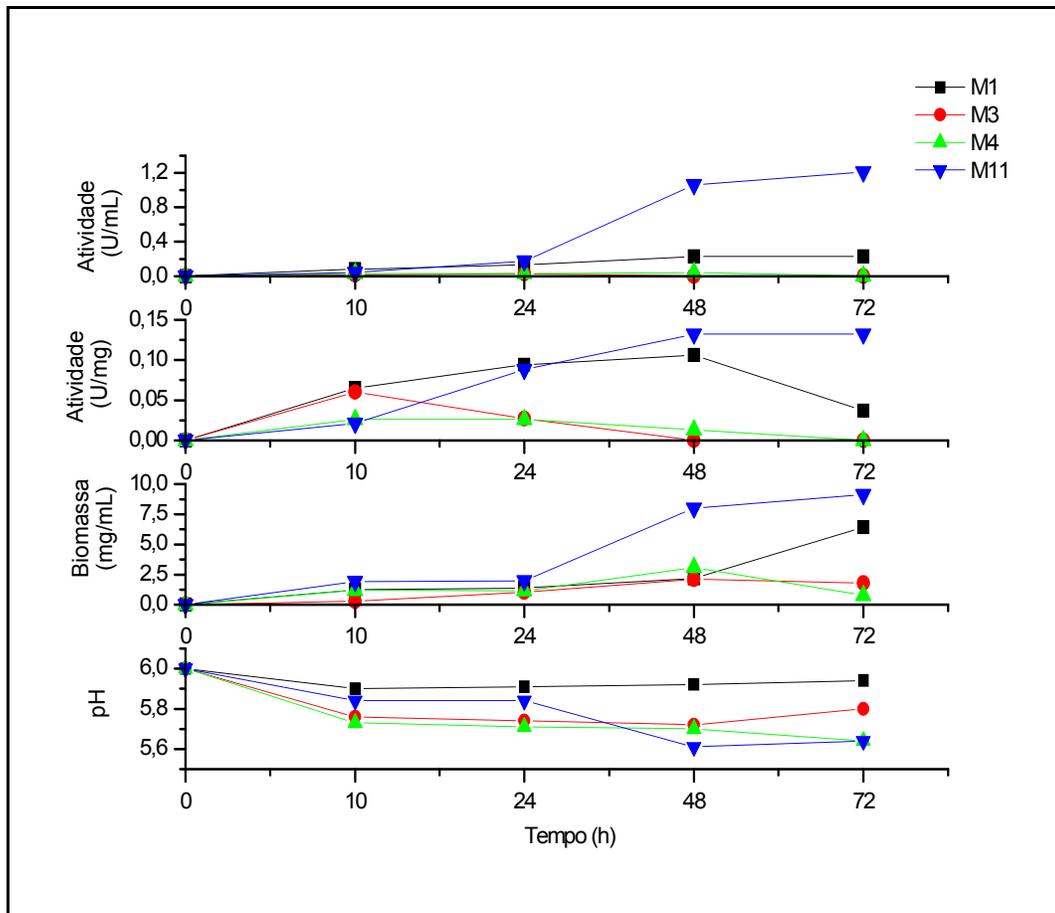
No que diz respeito aos valores de atividades volumétricas, o mesmo também é significativamente maior para o tratamento AA que alcançou atividade máxima de $6,94 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o tratamento TA demonstrou máxima atividade de $5,29 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Pode-se verificar que a atividade enzimática, tanto específica como volumétrica, é maior quando se utiliza a desproteínização com alcalase. Portanto, por foi escolhido este tratamento do soro para o presente estudo de produção de β -galactosidase.

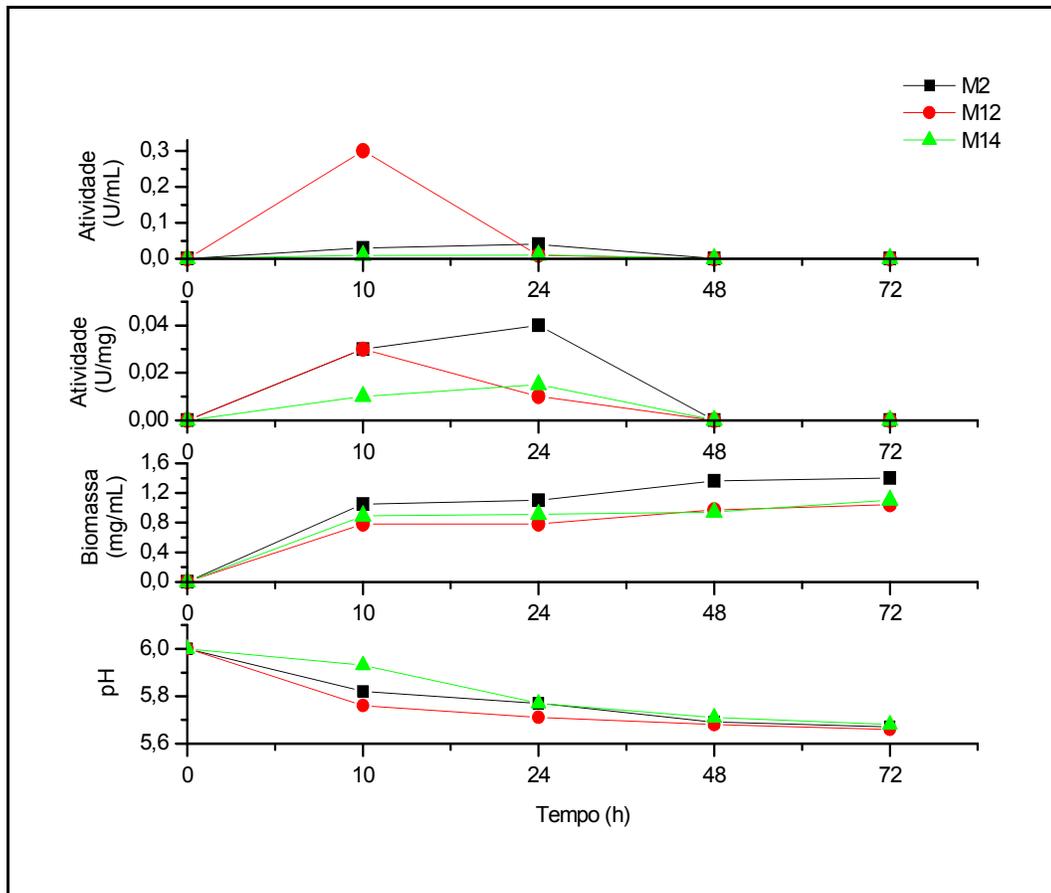
5.3 Seleção do microrganismo

Sete linhagens foram avaliadas do gênero *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis* (NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564) e *Kluyveromyces marxianus* (CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e var *bulgaricus* ATCC 16045) além de 4 linhagens isoladas de soro de leite (M1, M3, M4 e M11) e 3 isoladas de leite de búfala (M2, M12 e M14), para a escolha do microrganismo com maior capacidade de produção da enzima.

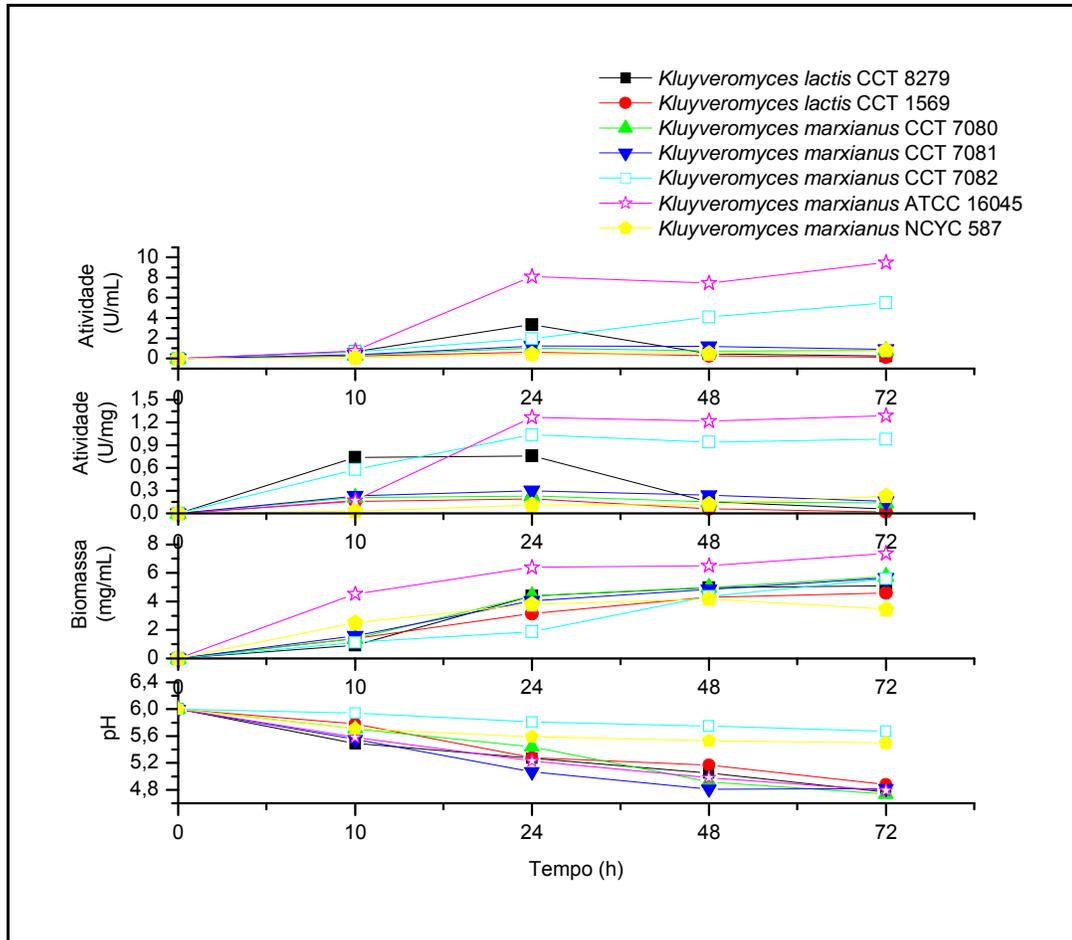
Os resultados estão apresentados na Figura 3 que mostra o acompanhamento da produção da β -galactosidase, do crescimento celular e da variação no pH durante a fermentação e das atividades enzimáticas para os microrganismos estudados.



(a)



(b)



(c)

Figura 3: Acompanhamento da atividade enzimática específica, atividade enzimática, da produção da biomassa e variação no pH para as cepas (a) isoladas do soro de leite, (b) isoladas de leite de búfala, (c) para as cepas de bancos de cultura.

Pode-se observar através da figura 3, que as culturas isoladas de soro de leite (M1, M3, M4 e M11) apresentaram um aumento na atividade específica, na atividade volumétrica e na biomassa no decorrer do tempo. No entanto, o pH mostrou uma leve diminuição dos seus valores, exceto pela linhagem M1 que mostrou um pH praticamente constante, variando de 6,0 a 5,6 para as linhagens M3, M4 e M11.

As cepas isoladas do leite de búfala (M2, M12 e M14) mostraram picos de atividades específica e volumétrica nas horas iniciais de cultivo, tendo uma posterior queda das mesmas. O pH mostrou uma leve diminuição dos seus valores, variando de 6,0 a 5,6 e a biomassa aumentou para todas as linhagens durante o tempo de cultivo.

As cepas de *K.marxianus* CCT 7082 e ATCC 16045, que obtiveram maiores produções de β -galactosidase, comportaram-se de maneira semelhante. Ambas tiveram um aumento da biomassa, atividades específica e volumétrica e uma diminuição do pH no decorrer do tempo de cultivo.

A cepa de *K. lactis* CCT 8279, que obteve a terceira maior produção da enzima, obteve picos de atividades específica e volumétrica em 24 h de cultivo e apresentou posterior queda das mesmas. A biomassa aumentou e o pH diminuiu no durante o cultivo.

As demais linhagens de bancos de cultura (*K. lactis* CCT 1569, *K. marxianus* CCT 7080, CCT 7081 e NCYC 587) apresentaram comportamento semelhante ao longo do cultivo, com valores de atividades específicas e volumétricas semelhantes e abaixo dos microrganismos de bancos de cultura anteriormente citados. As atividades, tanto específica como volumétrica, tiveram seu máximo obtidos em 10 h de fermentação e, posteriormente, permaneceram praticamente constantes. A biomassa aumentou e o pH diminuiu no decorrer do cultivo.

Os microrganismos de bancos de cultura apresentaram atividade específica e volumétrica maiores que as cepas isoladas. A atividade específica variou de 0 e 0,15 U.mg⁻¹ para cepas isoladas e de 0 a 1,5 U.mg⁻¹ para as cepas de bancos de cultura. A atividade volumétrica variou de 0 e 1,2 U.mL⁻¹ para cepas isoladas e de 0 a 1,5 U.mL⁻¹ para as cepas de bancos de cultura.

A literatura relata processos fermentativos com comportamentos semelhantes aos apresentados neste trabalho, onde a máxima atividade enzimática é acompanhada pela máxima produção da biomassa (RECH *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2003; RAJOKA *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2005; CORTÉS *et al.*, 2005).

Os valores obtidos para atividade enzimática volumétrica com maior produção de β -galactosidase no presente estudo foi pela linhagem *K. marxianus* ATCC 16045, no entanto, Inchaurredo *et al.* (1994), que cultivaram diversas cepas de *Kluyveromyces lactis* e *marxianus* em um meio contendo lactose como fonte de carbono mostraram maiores valores de atividade volumétrica para as cepas de *K. lactis* quando comparada a atividade alcançada pelas linhagens de *K. marxianus*.

Rech & Ayub, em 2007, verificaram que a alimentação do meio de soro de leite mais concentrado foi o mais eficiente para estimular a produção de β -galactosidase por *K. marxianus*. Visando selecionar cepas capazes de crescer em altas concentrações de lactose e melhorar a produção de β -galactosidase, os microrganismos foram

inoculados em meio com soro de leite concentrado, e conseqüentemente, altas concentrações para lactose (100 g.L^{-1}).

A máxima atividade específica observada foi $1,3 \text{ U.mg}^{-1}$ referente ao microrganismo *K. marxianus* ATCC 16045, seguida do *K. marxianus* CCT 7082 que atingiu $1,04 \text{ U.mg}^{-1}$. Os microrganismos isolados a partir de soro de leite e leite de búfala não apresentaram altas produções da enzima β -galactosidase. A máxima atividade específica dentre os isolados não ultrapassou $0,13 \text{ U.mg}^{-1}$ para o microrganismo M11, sendo esta bem mais baixa que as atividades observadas em alguns dos microrganismos do banco de cultura. Já a atividade volumétrica máxima observada foi $9,0 \text{ U.mL}^{-1}$ referente ao microrganismo *K. marxianus* ATCC 16045, seguida do *K. marxianus* CCT 7082 que atingiu $5,5 \text{ U.mL}^{-1}$.

Dentre os microrganismos avaliados, a levedura *K. marxianus* ATCC 16045 foi a que obteve maiores produções de β -galactosidase e, portanto, foi selecionada para os ensaios de otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase tendo em vista ter apresentado maior produção da enzima em altas concentrações de lactose provenientes do soro de leite concentrado.

5.4 Planejamento fracionário

Nesta etapa avaliou-se o efeito das concentrações de lactose, de extrato de levedura, de sulfato de amônio, da peptona, da água de parboilização de arroz e o pH inicial do meio de cultura na produção da enzima β -galactosidase através de um planejamento experimental fracionário 2^{6-2} . A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento fracionário com os valores codificados e reais bem como as respostas para a atividade enzimática máxima.

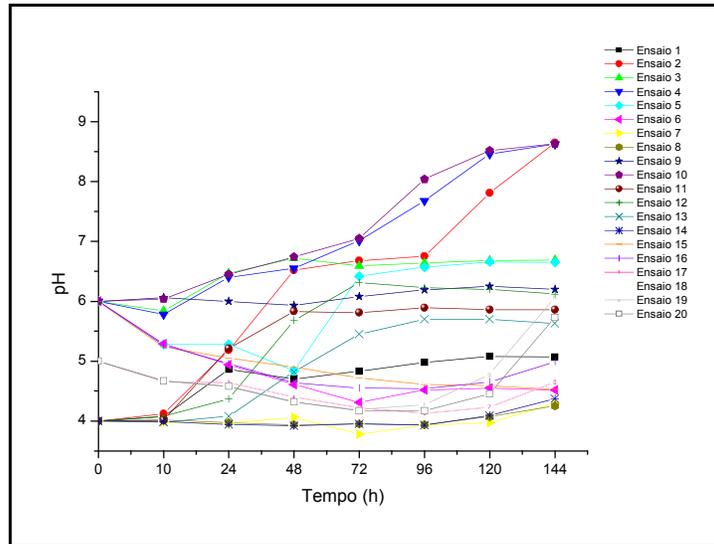
A resposta avaliada foi a atividade enzimática da β -galactosidase no decorrer do cultivo, sendo também realizado o acompanhamento da produção da biomassa, do consumo dos açúcares totais medidos como lactose e a variação no pH.

A Figura 4 apresenta o comportamento da atividade enzimática, da produção da biomassa e a variação no pH para os ensaios do planejamento fatorial fracionário, ao longo dos experimentos.

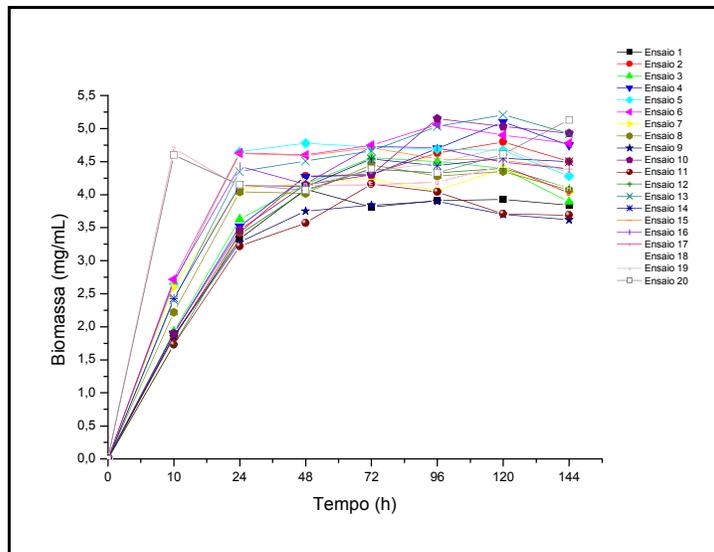
Tabela 7: Matriz do planejamento experimental fracionário 2^{6-2} (16 ensaios e 4 pontos centrais), valores codificados e reais

ENSAIOS	Extrato de				Água de Parboilização de arroz		Atividade enzimática máxima (U.mL ⁻¹)
	Levedura (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Lactose (g.L ⁻¹)	(NH ₂) ₄ SO ₄ (g.L ⁻¹)		pH	
1	-1 (1)	-1 (0)	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (4)	1,41
2	1 (20)	-1 (0)	-1 (10)	-1 (0)	1 (30)	-1 (4)	3,42
3	-1 (1)	1 (20)	-1 (10)	-1 (0)	1 (30)	1 (6)	2,6
4	1 (20)	1 (20)	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	1 (6)	4,7
5	-1 (1)	-1 (0)	1 (100)	-1 (0)	1 (30)	1 (6)	7,67
6	1 (20)	-1 (0)	1 (100)	-1 (0)	-1 (0)	1 (6)	8,37
7	-1 (1)	1 (20)	1 (100)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (4)	6,65
8	1 (20)	1 (20)	1 (100)	-1 (0)	1 (30)	-1 (4)	9,9
9	-1 (1)	-1 (0)	-1 (10)	1 (12)	-1 (0)	1 (6)	1,97
10	1 (20)	-1 (0)	-1 (10)	1 (12)	1 (30)	1 (6)	3,96
11	-1 (1)	1 (20)	-1 (10)	1 (12)	1 (30)	-1 (4)	2,79
12	1 (20)	1 (20)	-1 (10)	1 (12)	-1 (0)	-1 (4)	6,4
13	-1 (1)	-1 (0)	1 (100)	1 (12)	1 (30)	-1 (4)	6,95
14	1 (20)	-1 (0)	1 (100)	1 (12)	-1 (0)	-1 (4)	8,4
15	-1 (1)	1 (20)	1 (100)	1 (12)	-1 (0)	1 (6)	8,32
16	1 (20)	1 (20)	1 (100)	1 (12)	1 (30)	1 (6)	9,44
17	0 (10,5)	0 (10)	0 (55)	0 (6)	0 (15)	0 (5)	7,59
18	0 (10,5)	0 (10)	0 (55)	0 (6)	0 (15)	0 (5)	7,59
19	0 (10,5)	0 (10)	0 (55)	0 (6)	0 (15)	0 (5)	7,33
20	0 (10,5)	0 (10)	0 (55)	0 (6)	0 (15)	0 (5)	7,27

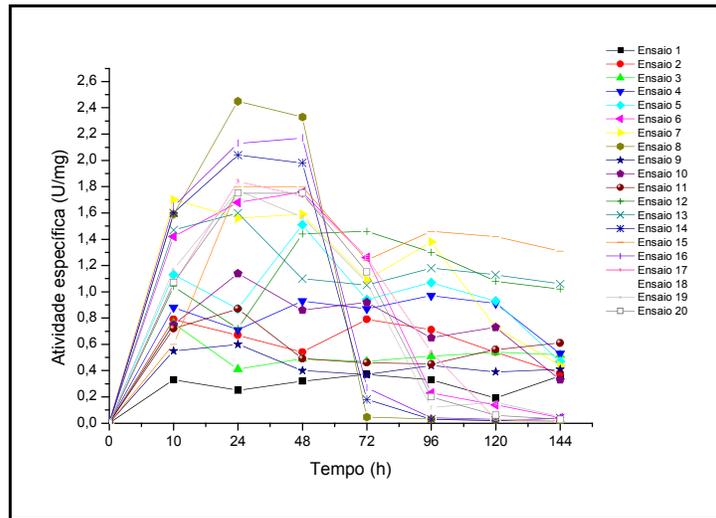
O comportamento do pH (Figura 4a) varia de um ensaio para o outro durante o tempo de cultivo, em alguns ensaios houve diminuição e em outros aumento do mesmo. Na maioria dos ensaios o mesmo se comportou de maneira constante no decorrer do tempo.



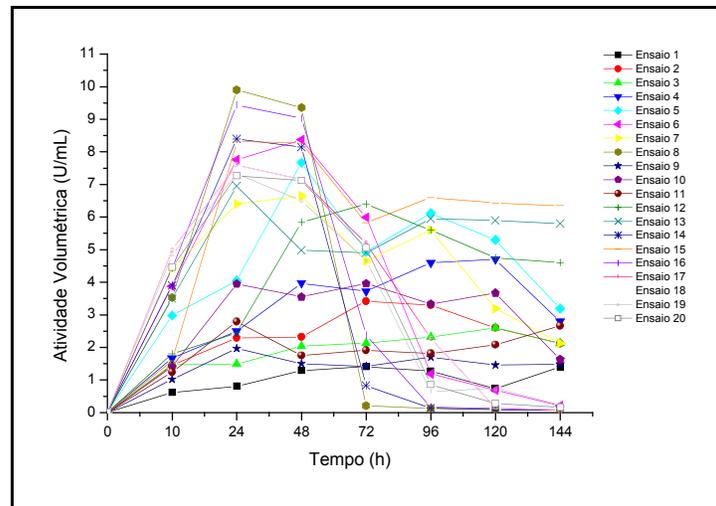
(a)



(b)



(c)



(d)

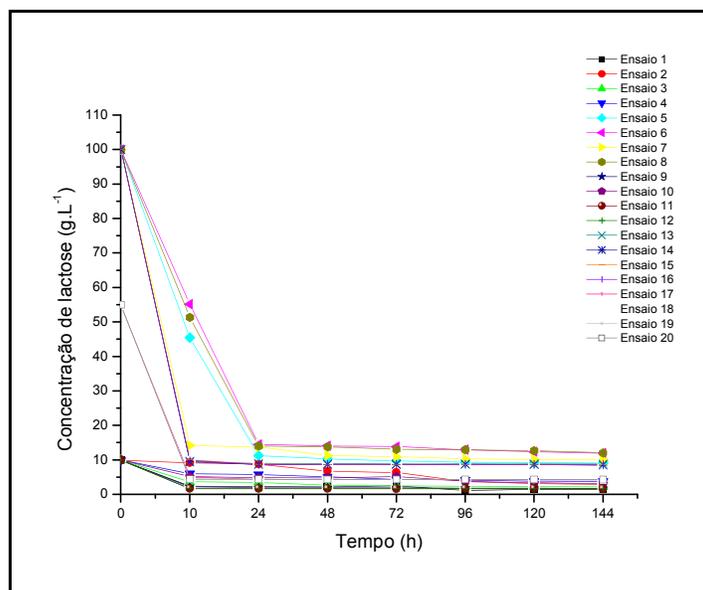


Figura 4: Acompanhamento da variação no pH (a), da produção da biomassa (b), da atividade enzimática específica (c), atividade enzimática volumétrica (d), Concentração de lactose de soro de leite (e) ao longo da fermentação para o planejamento experimental fracionário 2^{6-2}_{IV}

Quando avaliamos a biomassa, pode-se observar, que para todos os ensaios realizados a mesma aumentou durante as primeiras 24 h de cultivo mantendo-se praticamente constante após esse período como pode-se observar na Figura 4(b).

Observa-se que todos os ensaios apresentam comportamento similar, em que o pico de atividade enzimática acompanha a máxima produção da biomassa. Para os ensaios 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 e para os pontos centrais a máxima atividade foi obtida em 24 h de cultivo.

Para os ensaios 5, 6 e 7 os picos de atividade ocorreram em 48 h, já os ensaios 1, 2 e 12 apresentaram pico de atividade em 72 h de cultivo, para os ensaios 3, 4 e 13 o pico foi em 96 h.

A lactose provinda de soro de leite foi praticamente consumida em uma totalidade em todos os ensaios do planejamento, demonstrando que o microrganismo foi capaz que consumir o substrato presente no meio de cultura.

As Figuras 5 e 6 demonstram o efeito dos componentes do meio de cultura avaliados sobre a atividade enzimática volumétrica e específica, respectivamente.

As atividades enzimáticas volumétricas máximas obtidas para cada ensaio, apresentadas na Tabela 7, foram utilizadas para realizar a análise dos efeitos da

concentração dos componentes do meio de cultura e do pH sobre sua produção. Conforme apresentado na Figura 5, verifica-se que ocorreu um incremento na atividade enzimática ao mudar todas as variáveis avaliadas do nível -1 para o +1.

Porém, nem todas apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança sobre a resposta. O efeito do extrato de levedura, da peptona, da lactose e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram significativos, enquanto a água de parboilização do arroz e do pH não tiveram efeito significativo.

As Tabelas 8 e 9 mostram os valores dos efeitos de cada variável para atividade volumétrica e específica, respectivamente.

Tabela 8: Efeitos dos componentes do meio de cultura sobre a atividade enzimática volumétrica

Variável	Efeito	Desvio padrão	T(3)	p	-90%	+90%
Média	6,13	0,03	162,18	0,00	6,04	6,22
Extrato de levedura	2,02	0,08	23,97	0,00	1,82	2,22
Peptona	1,08	0,08	12,77	0,00	0,88	1,28
Soro/Lactose	4,80	0,08	56,80	0,00	4,60	5,00
S. de amônia	0,43	0,08	5,18	0,01	0,23	0,63
Água de parboilização	0,06	0,08	0,75	0,50	-0,13	0,26
pH	0,13	0,08	1,63	0,19	-0,06	0,33

Tabela 9: Efeitos dos componentes do meio de cultura sobre a atividade enzimática específica

Variável	Efeito	Desvio padrão	T(3)	p	-90%	+90%
Média	1,42	0,01	136,05	0,00	1,40	1,45
Extrato de levedura	0,44	0,02	19,08	0,00	0,39	0,50
Peptona	0,27	0,02	11,51	0,00	0,21	0,32
Soro/Lactose	1,05	0,02	44,87	0,00	0,99	1,10
S. de amônia	0,18	0,02	7,99	0,00	0,13	0,24
Água de parboilização	0,03	0,02	1,49	0,23	-0,02	0,09
pH	-0,12	0,02	-5,33	0,01	-0,18	-0,06

A concentração de lactose foi variável que mais afetou a produção enzimática, aumentando em média $5,5 \text{ U.mL}^{-1}$, quando ocorrer um incremento de 10 g.L^{-1}

para 100 g.L^{-1} . A concentração de extrato de levedura teve efeito positivo médio de $1,7 \text{ U.mL}^{-1}$ na resposta quando sua concentração passou 1 g.L^{-1} para 20 g.L^{-1} .

A partir dos resultados obtidos nesse planejamento selecionou-se as variáveis concentração de lactose de soro de leite, de extrato de levedura, de peptona e de sulfato de amônio pra serem avaliadas num planejamento completo visando otimizar o meio de cultura.

Quanto ao pH inicial do meio de cultura, o seu valor foi fixado em 4,0 devido o mesmo resultar numa maior atividade enzimática específica (Figura 6) mesmo que o efeito não tenha sido significativo para atividade volumétrica (Figura 5), já a água de parboilização foi mantida no maior nível estudado, pois apesar dessa variável não ter demonstrado efeito significativo, o mesmo foi positivo e sua utilização é interessante para o aproveitamento desse resíduo, diminuindo gastos com seu tratamento.

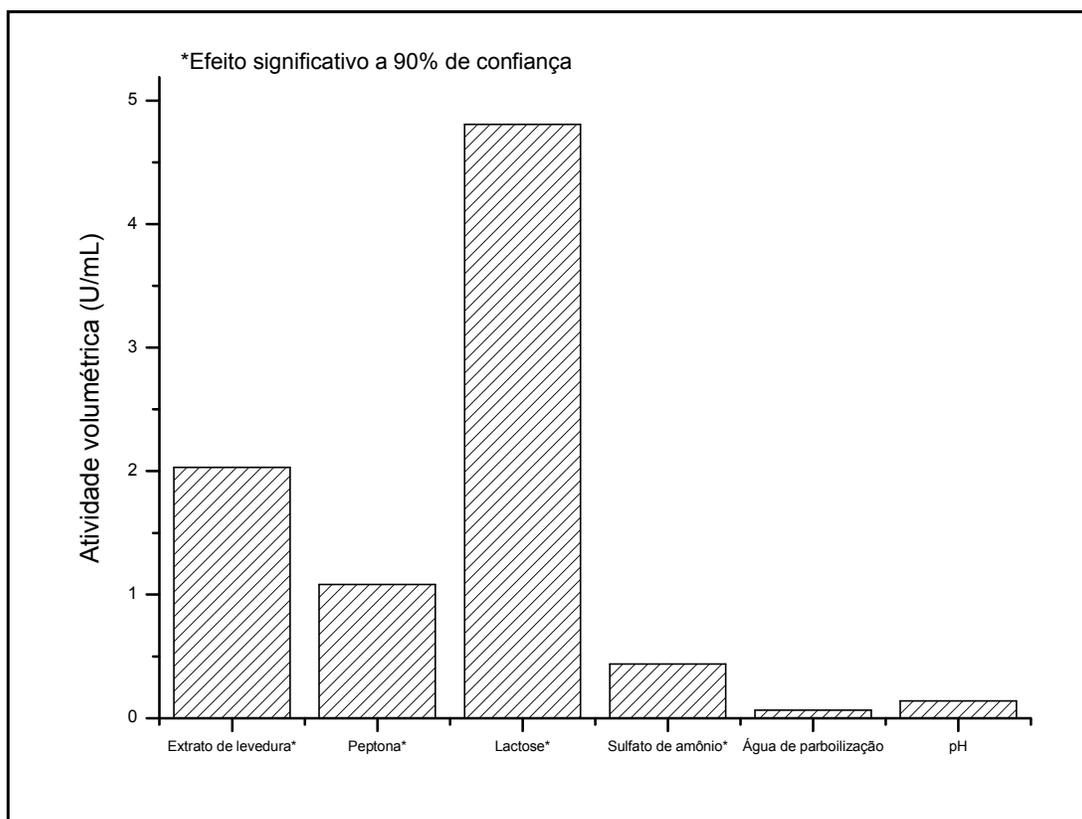


Figura 5: Estimativa dos efeitos na atividade enzimática volumétrica para concentração extrato de levedura, peptona, lactose, e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no planejamento fatorial fracionário.

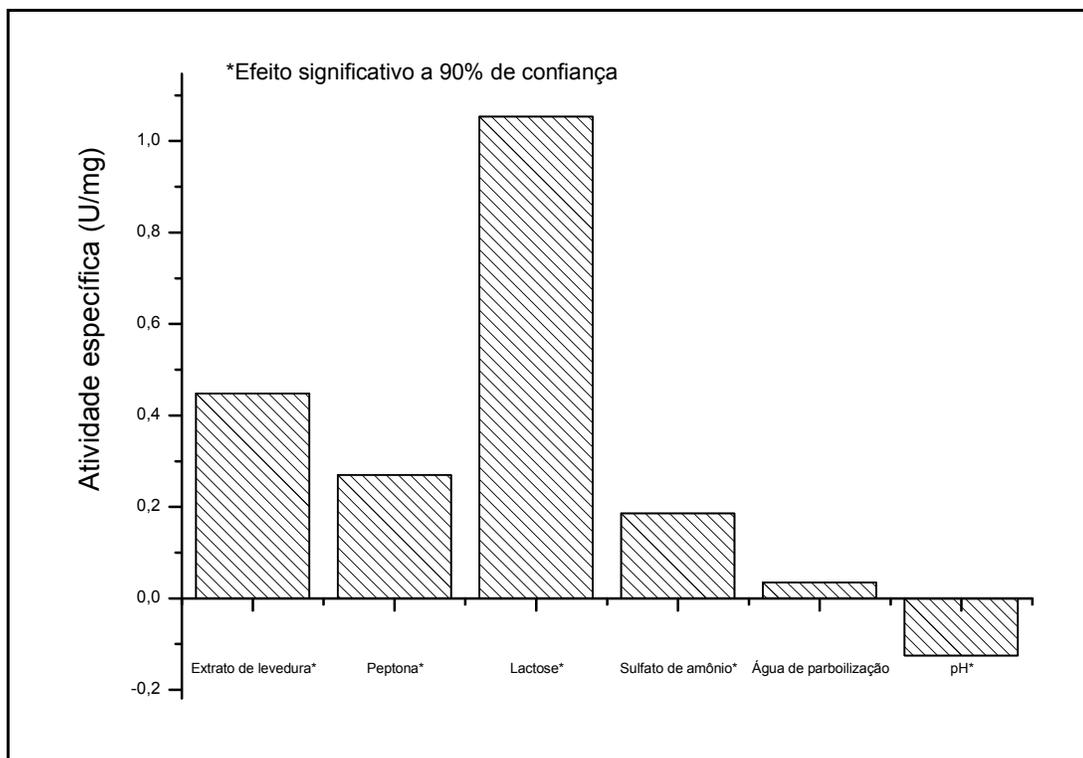


Figura 6: Estimativa dos efeitos na atividade enzimática específica para concentração extrato de levedura, peptona, lactose, e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no planejamento fatorial fracionário.

5.5 Planejamento experimental completo

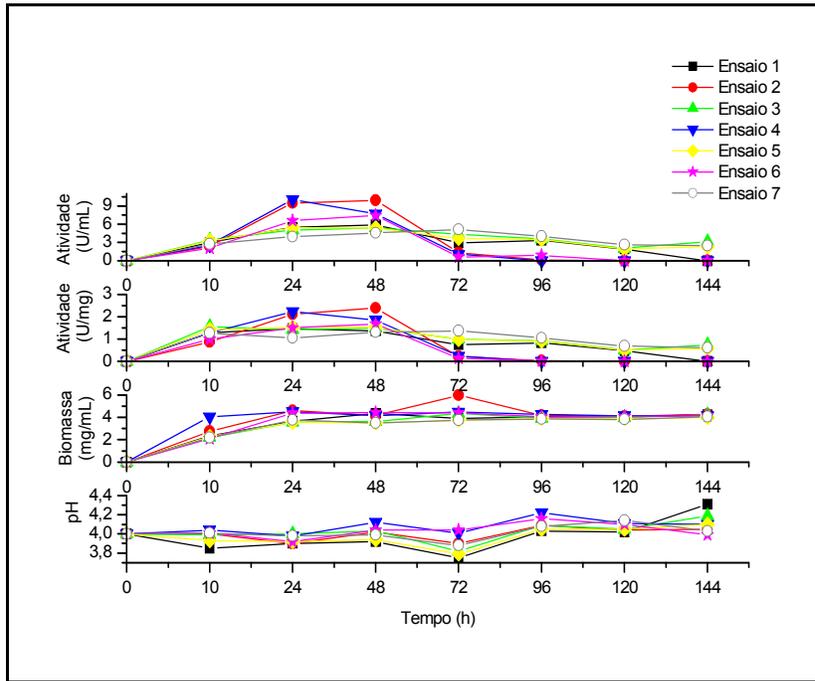
Um planejamento experimental completo 2^4 (16 ensaios, 4 pontos centrais e 8 axiais) foi realizado com as variáveis concentração de lactose de soro de leite, de extrato de levedura, de peptona e de sulfato de amônio. A resposta avaliada foi atividade enzimática de β -galactosidase no decorrer da fermentação. Adicionalmente, realizou-se o acompanhamento da produção da biomassa, do consumo de lactose e da variação no pH ao longo do processo.

A matriz do planejamento completo, valores codificados e reais está apresentada na Tabela 9 e também estão apresentados os dados da atividade enzimática máxima obtidos para cada ensaio, a atividade enzimática prevista pelo modelo fornecida pela Equação 1, e os desvios relativos dos ensaios experimentais em relação ao modelo.

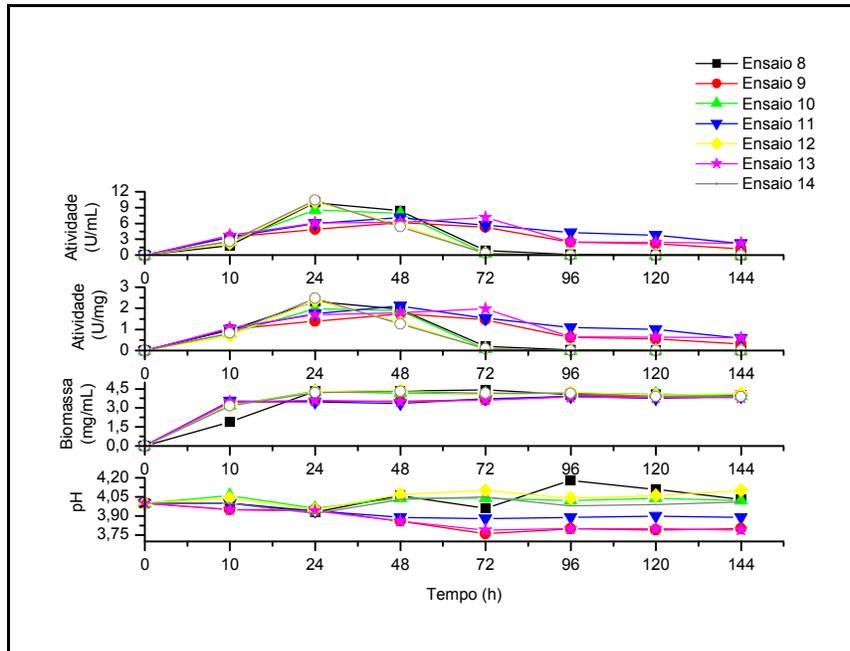
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental completo 2^4 (16 ensaios, 4 pontos centrais e 8 pontos axiais), valores codificados e reais e atividade enzimática máxima como resposta

ENSAIOS	Soro de leite/Lactose (g.L ⁻¹)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	Atividade enzimática máxima (U.mL ⁻¹)	Atividade prevista (U.mL ⁻¹)	Desvio relativo (%)
1	-1 (37,5)	-1 (11,25)	-1 (7,5)	-1 (3,75)	5,9	6,12	-3,73
2	1 (92,5)	-1 (11,25)	-1 (7,5)	-1 (3,75)	9,9	9,24	6,67
3	-1 (37,5)	1 (23,75)	-1 (7,5)	-1 (3,75)	5,4	5,78	-7,04
4	1 (92,5)	1 (23,75)	-1 (7,5)	-1 (3,75)	10,0	9,78	2,20
5	-1 (37,5)	-1 (11,25)	1 (22,5)	-1 (3,75)	5,4	5,92	-9,63
6	1 (92,5)	-1 (11,25)	1 (22,5)	-1 (3,75)	7,5	9,04	-20,0
7	-1 (37,5)	1(23,75)	1 (22,5)	-1 (3,75)	5,2	5,02	3,46
8	1 (92,5)	1(23,75)	1 (22,5)	-1 (3,75)	9,9	9,02	8,89
9	-1 (37,5)	-1 (11,25)	-1 (7,5)	1(11,25)	6,2	6,78	-9,35
10	1 (92,5)	-1 (11,25)	-1 (7,5)	1 (11,25)	8,6	9,02	-4,88
11	-1 (37,5)	1(23,75)	-1 (7,5)	1 (11,25)	7,1	6,44	9,30
12	1 (92,5)	1(23,75)	-1 (7,5)	1 (11,25)	10,4	9,56	8,08
13	-1 (37,5)	-1 (11,25)	1 (22,5)	1 (11,25)	7,1	7,54	-6,20
14	1 (92,5)	-1 (11,25)	1 (22,5)	1 (11,25)	10,4	9,78	5,96
15	-1 (37,5)	1(23,75)	1 (22,5)	1 (11,25)	6,3	6,64	-5,40
16	1 (92,5)	1(23,75)	1 (22,5)	1 (11,25)	9,1	9,76	-7,25
17	-2 (10)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	5,1	4,43	13,14
18	2 (120)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	10,2	10,67	-4,61
19	0 (65)	-2 (5)	0 (15)	0 (7,5)	10,0	8,93	10,70
20	0 (65)	2 (30)	0 (15)	0 (7,5)	7,7	8,57	-11,30
21	0 (65)	0 (17,5)	-2 (0)	0 (7,5)	6,8	7,43	-9,26
22	0 (65)	0 (17,5)	2 (30)	0 (7,5)	8,3	7,43	10,48
23	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	-2 (0)	7,1	6,93	2,39
24	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	2 (15)	8,3	8,33	-0,36
25	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	8,2	8,15	0,61
26	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	8,3	8,15	1,81
27	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	8,0	8,15	-1,88
28	0 (65)	0 (17,5)	0 (15)	0 (7,5)	8,1	8,15	-0,62

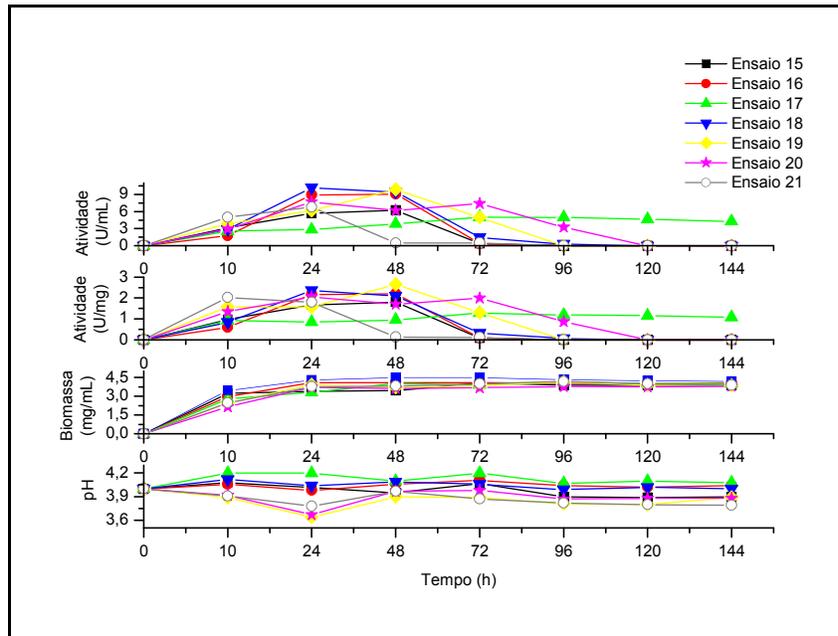
A Figura 7 apresenta o acompanhamento da atividade enzimática, da produção de biomassa e a variação no pH ao longo do cultivo para o planejamento completo.



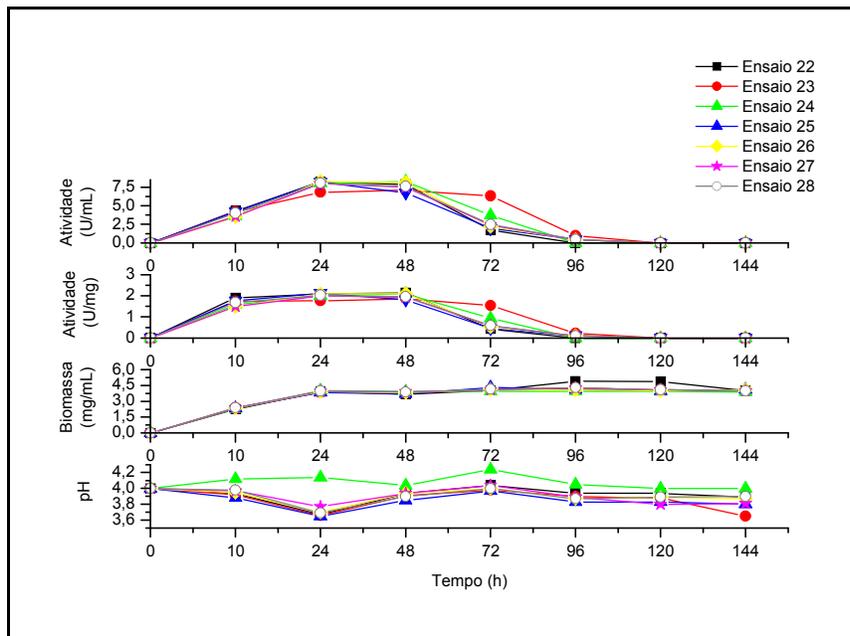
(a)



(b)



(c)



(d)

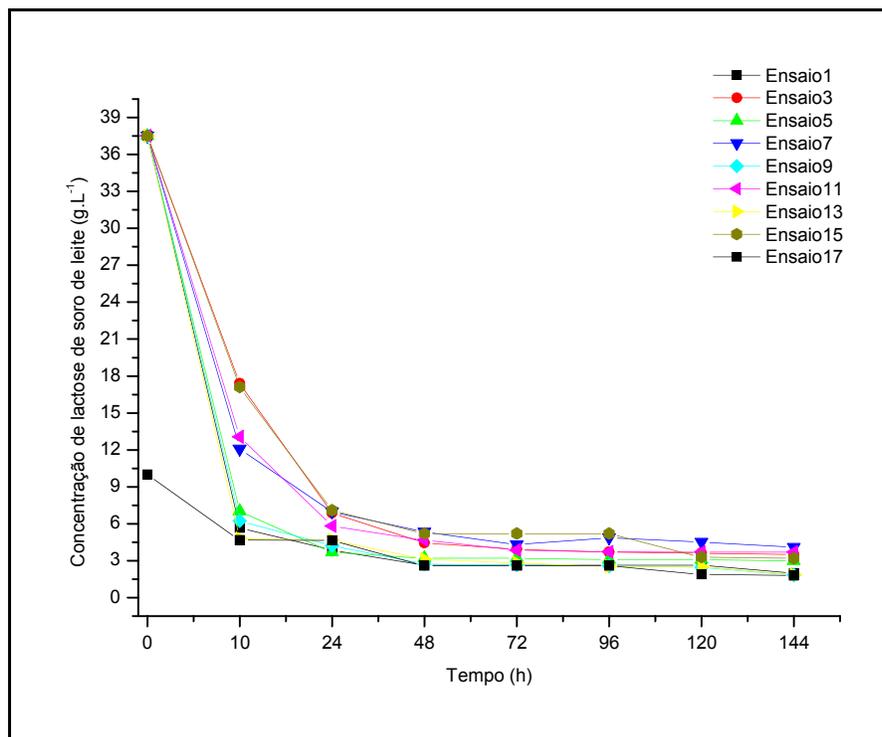
Figura 7: Acompanhamento da atividade enzimática da β -galactosidase, da produção da biomassa e da variação do pH ao longo da fermentação para o planejamento experimental completo: (a) ensaios de 1 a 7; (b) ensaios de 8 a 14; (c) ensaios de 15 a 21; (d) ensaios de 22 a 28.

Neste segundo planejamento, a máxima atividade enzimática pelos ensaios variou de 5,2 a 10,4 U.mL⁻¹. Os melhores valores para atividade enzimática ocorreram nos ensaios 12 e 14.

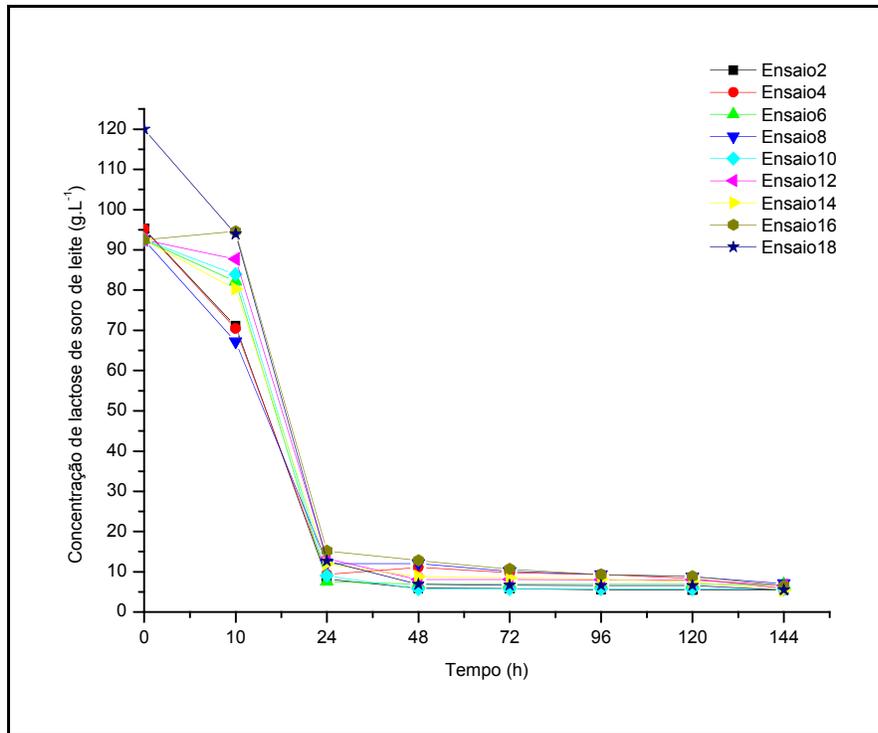
As condições do ensaio 12 foram: concentração de lactose no nível +1 (92,5 g.L⁻¹), concentração de extrato de levedura no nível +1 (23,75 g.L⁻¹), a concentração de peptona no nível -1 (7,5 g.L⁻¹) e concentração de sulfato de amônio no nível +1 (15 g.L⁻¹), apresentando atividade enzimática de 10,4 U.mL⁻¹ em 24 h de cultivo.

Para o ensaio 14 as condições foram: concentração de lactose no nível +1 (92,5 g.L⁻¹), concentração de extrato de levedura no nível -1 (11,25 g.L⁻¹), a concentração de peptona no nível +1 (30 g.L⁻¹) e concentração de sulfato de amônio no nível +1 (15 g.L⁻¹), apresentando atividade enzimática de 10,4 U.mL⁻¹ em 24 h de cultivo.

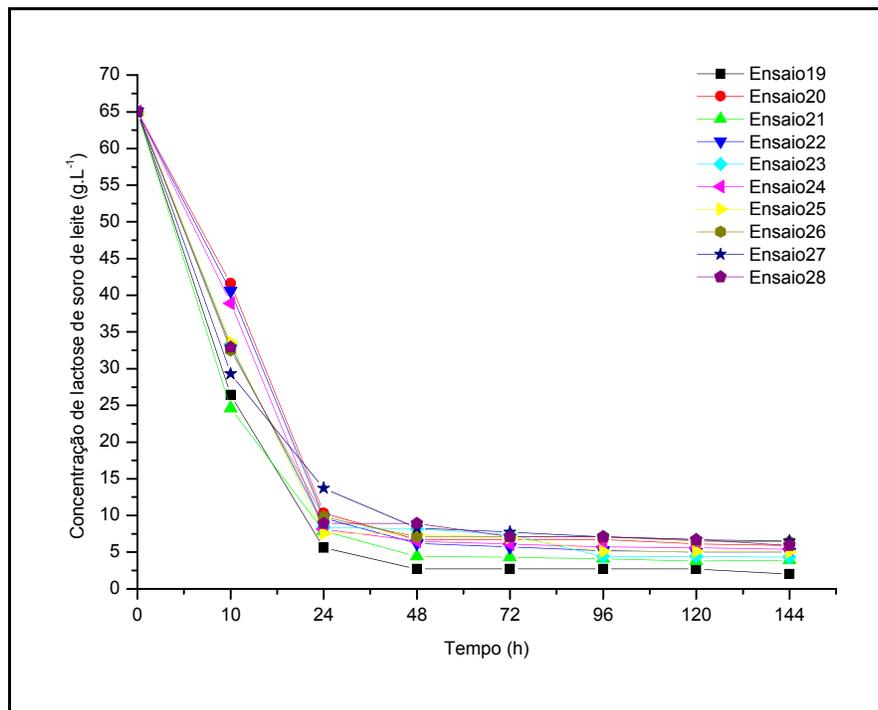
A Figura 8 mostra o acompanhamento da concentração de lactose de soro de leite com o tempo no planejamento completo.



(a)



(b)



(c)

Figura 8: Acompanhamento da variação da concentração de lactose de soro de leite ao longo da fermentação para: (a) os ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17; (b) os ensaios 2,

4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18; (c) do ensaio 19 ao 28, do planejamento experimental completo

Pode-se observar (Figura 8) que a lactose de soro de leite foi praticamente esgotada. Na Tabela 10 observa-se o efeito das variáveis e de suas interações sobre a atividade enzimática máxima no planejamento experimental completo.

Para verificação da validade do modelo quadrático da produção da β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em função das variáveis significativas codificadas (Equação 1), foi realizada uma análise de variância (ANOVA), conforme apresentado na Tabela 11, de acordo com Rodrigues & lemma (2005), onde observa-se a validade do modelo pelo teste F, que foi 3,6 vezes maior que o tabelado.

$$\text{Atividade} = 8,15 + 1,56 (X_1) - 0,15 (X_1)^2 - 0,09 (X_2) + 0,15 (X_2)^2 - 0,18 (X_3)^2 + 0,35 (X_4) - 0,13 (X_4)^2 + 0,22 (X_1 \square X_2) - 0,22 (X_1 \square X_4) - 0,14 (X_2 \square X_3) + 0,24 (X_3 \square X_4) \quad (1)$$

X_1 : Soro de leite (lactose);

X_2 : Extrato de levedura;

X_3 : Peptona;

X_4 : NH_2SO_4 .

Foram calculados, conforme apresentado na Tabela 9, os desvios relativos entre as respostas experimentais e preditas pelo modelo, mostrando que a Equação 1 é válida, já que os desvios ficaram abaixo de 15%, sendo aceitável para produção de bioprodutos (MANERA, 2006).

A partir do modelo obtido foi então possível construir as superfícies de resposta para analisar as melhores condições de concentração de lactose, de extrato de levedura, de peptona e de sulfato de amônio para a produção da β -galactosidase que levam a um maior valor de atividade enzimática. As superfícies de respostas obtidas estão apresentadas na Figura 9.

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão para a resposta atividade volumétrica máxima, demonstrando as variáveis e suas interações para a resposta estudada.

Tabela 10: Coeficiente de regressão para a resposta atividade volumétrica máxima

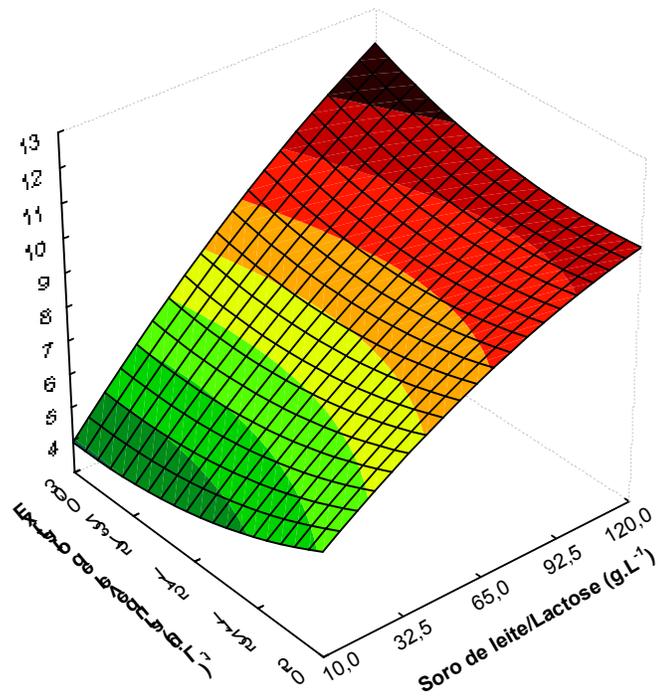
Variáveis	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p	- 95%	+ 95%
Média	8,15	0,06	126,25	0,00	7,94	8,35
Lactose (L)	3,11	0,05	59,13	0,00	2,94	3,28
Lactose (Q)	-0,30	0,05	-5,77	0,01	-0,47	-0,13
Extrato de levedura (L)	-0,18	0,05	-3,47	0,04	-0,35	-0,01
Extrato de levedura (Q)	0,29	0,05	5,61	0,01	0,12	0,46
Peptona (L)	0,03	0,05	0,63	0,57	-0,13	0,20
Peptona (Q)	-0,35	0,05	-6,71	0,00	-0,52	-0,18
NH ₄ SO ₂ (L)	0,70	0,05	13,28	0,00	0,53	0,86
NH ₄ SO ₂ (Q)	-0,27	0,05	-5,29	0,01	-0,44	-0,11
1L □ 2L	0,45	0,06	6,97	0,00	0,24	0,65
1L □ 3L	-0,17	0,06	-2,71	0,07	-0,38	0,03
1L □ 4L	-0,45	0,06	-6,97	0,00	-0,65	-0,24
2L □ 3L	-0,27	0,06	-4,26	0,02	-0,48	-0,06
2L □ 4L	-0,15	0,06	-2,32	0,10	-0,35	0,05
3L □ 4L	0,47	0,06	7,35	0,00	0,26	0,68

Tabela 11: Análise de variância do planejamento experimental completo 2⁴.

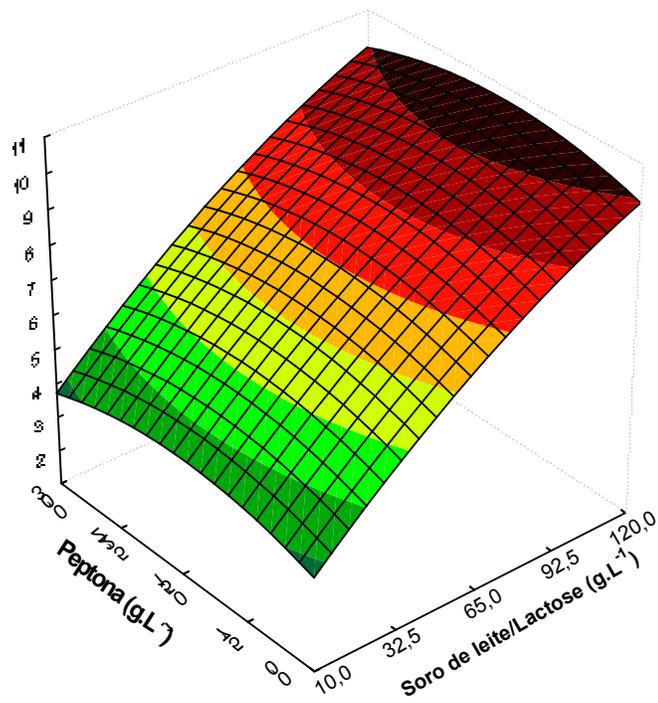
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	66,84	11	6,08	9,07
Resíduo	10,71	16	0,67	
Falta de ajuste	10,66	13		
Erro puro	0,05	3		
Total	77,55	27		

Coeficiente de correlação: 0,86

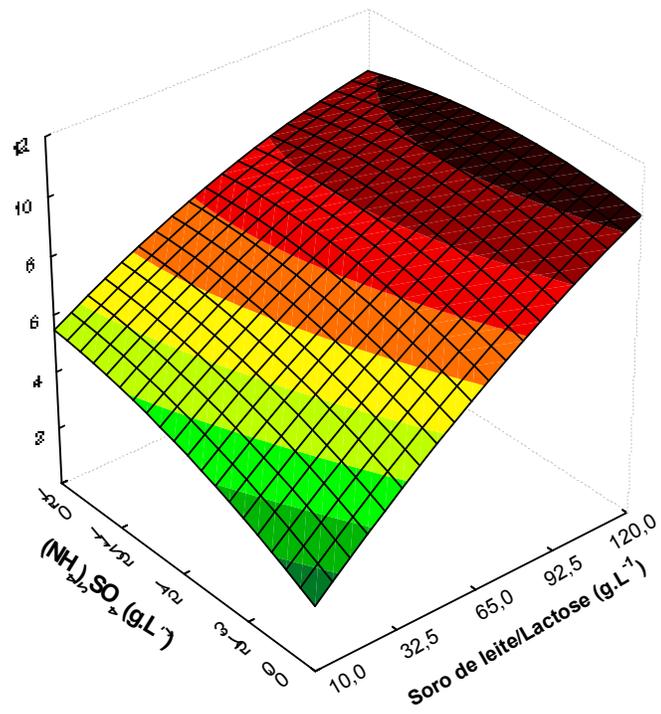
F_{0,95; 11; 16}: 2,46



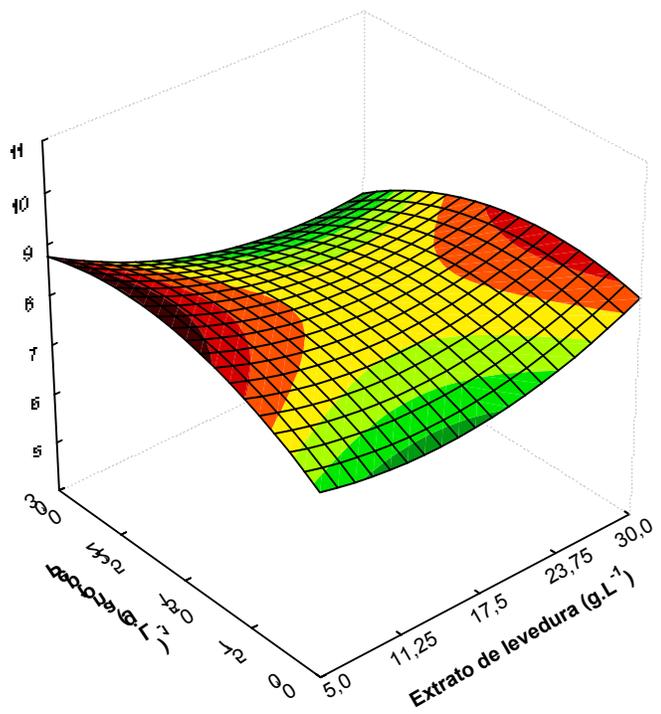
(a)



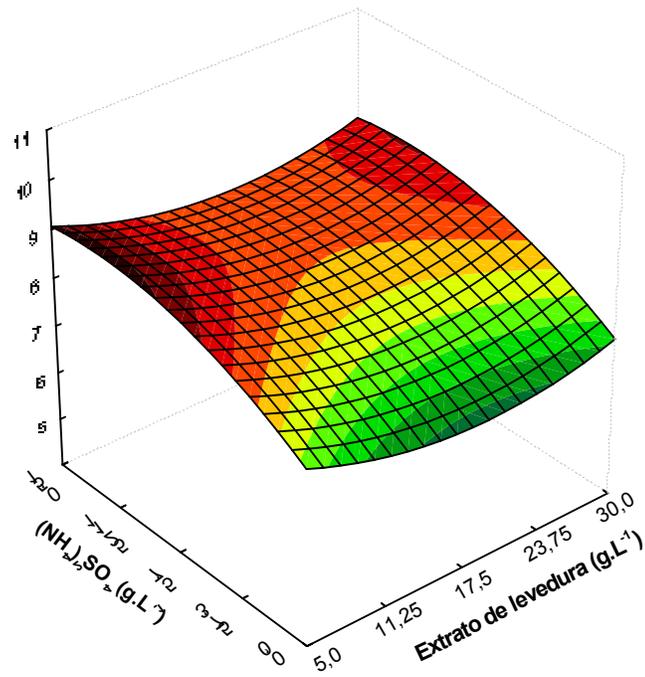
(b)



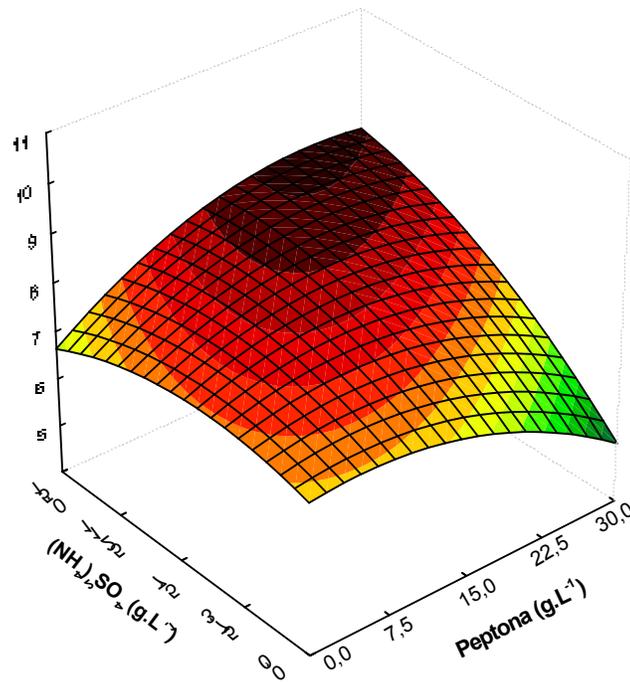
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 9: Superfícies de contorno para a atividade de β -galactosidase como uma função da concentração: (a) da lactose e do extrato de levedura; (b) da lactose e da peptona; (c)

da lactose e do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (d) do extrato de levedura e da peptona; (e) do extrato de levedura e do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (f) da peptona e do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Através da análise das superfícies de contorno da Figura 9 (a, b, c), verifica-se que quando a concentração de lactose é na ordem de 120 g.L^{-1} as demais variáveis não afetam a produção da enzima, que se apresentam com valores de até 11 U.mL^{-1} .

Ao observarmos a figura 9 (d) observamos duas regiões em que se verifica as máximas atividades volumétricas, 9 U.mL^{-1} , tanto nas menores concentrações, quanto nas maiores concentrações de extrato de levedura e nas concentrações de peptonas superiores a 15 g.L^{-1} . Por motivos econômicos optou-se por utilizar a menor concentração de extrato de levedura (5 g.L^{-1}) e a concentração de peptona no ponto central (15 g.L^{-1}), já que nesses valores obtinha-se faixas de máxima atividade da enzima.

A Figura 9 (e) também apresenta duas regiões em que se verifica as máximas atividades (8 U.mL^{-1}) tanto nas menores concentrações, quanto nas maiores concentrações de extrato de levedura e com concentrações de sulfato de amônio a partir do ponto central. Para aumentar a produção enzimática optou-se por utilizar a menor concentração de extrato de levedura (5 g.L^{-1}) e a concentração de peptona no máximo valor (15 g.L^{-1}).

A partir do ponto central de peptona (15 g.L^{-1}) e no máximo de sulfato de amônio (15 g.L^{-1}), na Figura 9 (f), observa-se que os valores de atividade alcançam seu máximo, $9,0 \text{ U.mL}^{-1}$, indicando essa faixa como a região ótima de trabalho.

As superfícies indicam que as maiores atividades podem ser obtidas ao empregar meio de cultura com 120 g.L^{-1} de Lactose, 5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 15 g.L^{-1} de peptona e 15 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Manera *et al.* (2008) estudaram a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por cultivo submerso, otimizando o meio de cultura usando técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. Os parâmetros estudados foram concentrações de lactose, de extrato de levedura de sulfato de amônio e o pH, sendo que todos mostraram efeito significativo na produção da enzima. As concentrações de lactose, de extrato de levedura e de sulfato de amônio foram selecionadas para serem utilizadas num planejamento experimental completo 2^3 . As ótimas condições para uma alta atividade enzimática foram: $28,2 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose, 17 g.L^{-1} de extrato de levedura e $8,8 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio e pH inicial 6,0, tendo a atividade enzimática nessas condições foi $10,6 \text{ U.mL}^{-1}$ em 96h de cultivo. No presente estudo em 24 h de cultivo se obteve aproximadamente a mesma atividade ($10,4 \text{ U.mL}^{-1}$).

Santiago *et al.* (2004) estudaram a produção da β -galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 em soro de leite. Através de um planejamento experimental 2^3 , os autores avaliaram a influência da concentração da lactose do soro (30, 0-50, 0-70,0 g.L⁻¹) e a concentração de extrato de levedura (0, 0-6, 0-12 g.L⁻¹) na atividade enzimática. Os autores verificaram que a adição de extrato de levedura favoreceu a síntese da enzima e o crescimento celular, quando comparada com o mesmo meio sem extrato, porém esta influência foi mais acentuada sobre a atividade enzimática. No ensaio realizado com as menores quantidades de lactose e extrato de levedura a atividade foi menor do que quando os autores empregaram o soro na máxima concentração de lactose (70 g.L⁻¹) na ausência de extrato de levedura, a atividade enzimática foi baixa. Enquanto, no presente estudo o extrato de levedura em pequenas quantidades mostraram melhor produção da enzima. No entanto outros componentes foram utilizados podendo os mesmos terem complementado de maneira eficaz o extrato de levedura, aumentando então a produção da enzima.

Rech *et al.* em 1999, determinaram as condições ideais de crescimento para as leveduras *K. marxianus* CBS 712 e *K. marxianus* CBS 6556, empregando soro de leite como substrato, objetivando a produção de β -galactosidase. O pH e a temperatura ideais de crescimento foram 5,5 e 35-37 °C, para ambos microrganismos. O meio de cultura ideal foi soro de leite *in natura* (70 g.L⁻¹) para a cepa CBS 6556 e soro de leite suplementado com extrato de levedura (10 g.L⁻¹) para a cepa CBS 712. As duas cepas apresentaram pico de atividade nas 10 h de fermentação, a atividade obtida foi 4 U.mL⁻¹ e 5 U.mL⁻¹ respectivamente. Por utilizar um meio de cultura mais simples, a levedura *K. marxianus* CBS 6556 foi submetida para testes de otimização do processo em soro de leite concentrado (210 g.L⁻¹), resultando em 10 U.mL⁻¹ em 15h de cultivo em fermentador.

Assim como Rech & Ayub (2007), Alves (2008) obteve um aumento na atividade volumétrica quando transferiu o cultivo para o fermentador. Alves (2008) produziu β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 e obteve valores de atividade volumétrica de até 17 U.mL⁻¹, em 14 h de cultivo, sendo os mesmo maiores do que os obtidos por Manera *et al.*, (2008), que utilizou agitador rotatório produziu a enzima β -galactosidase utilizando a mesma cepa, obtendo um máximo de atividade volumétrica de 10,6 U.mL⁻¹.

5.6 Estudo da validação do planejamento experimental completo

Os componentes do meio de cultura foram estudados nas faixas que variaram de 10 a 120 g.L⁻¹ de lactose de soro de leite, de 5 a 30 g.L⁻¹ de extrato de levedura, de 0 a 30 g.L⁻¹ de peptona e de 0 a 15 g.L⁻¹ de sulfato de amônio, sendo o cultivo realizado a 30 °C, 180 rpm por 144 h.

A melhor composição do meio de cultura para a produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, determinada através da metodologia de análise da superfície de resposta foi: concentração de lactose de soro de leite de 120 g.L⁻¹, concentração de extrato de levedura de 5 g.L⁻¹, concentração de peptona de 15 g.L⁻¹ e concentração de sulfato de amônio de 15 g.L⁻¹, com pH inicial do meio de cultura fixado em 4,0 e a água de parboilização de arroz fixada em 30 g.L⁻¹. Nesta condição foi avaliado o comportamento cinético da fermentação.

A produção da enzima e da biomassa, o consumo de lactose, e a variação no pH para esta condição estão apresentados na Figura 10.

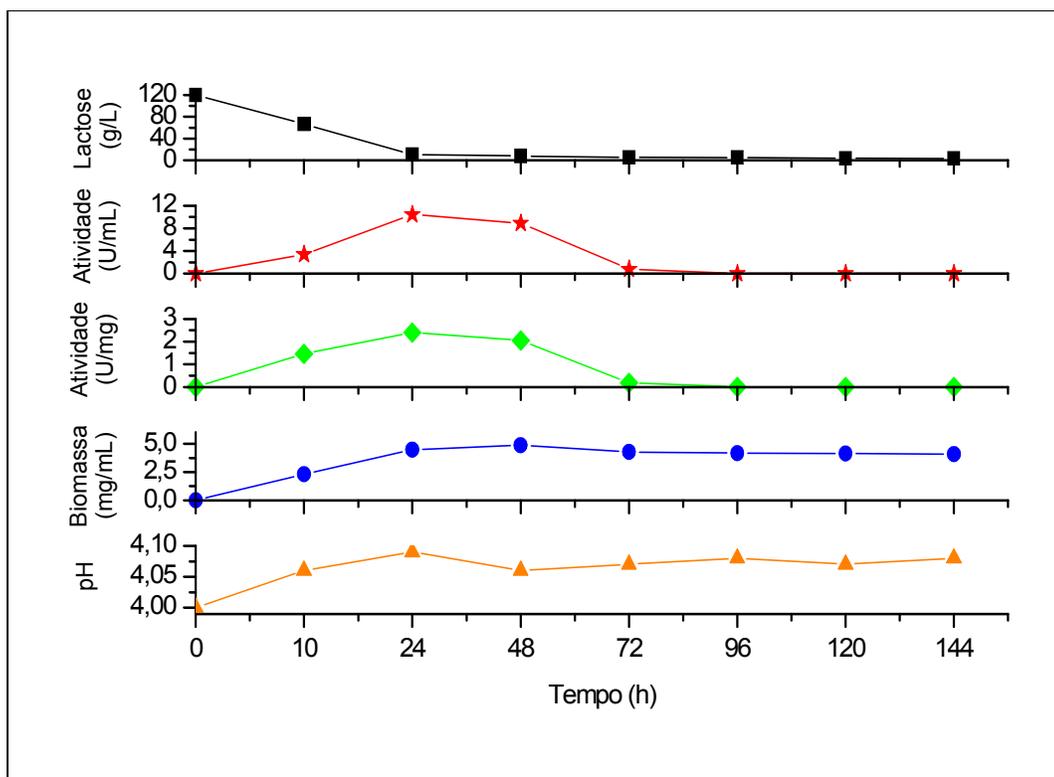


Figura 10: Acompanhamento da produção da enzima β -galactosidase nas condições ótimas do planejamento completo.

Como se pode verificar na Figura 10, a lactose de soro de leite foi praticamente esgotada após 24 h horas de cultivo, tendo após esse período uma quantidade constante. A biomassa teve um aumento substancial ate 24 h de cultivo atingindo valores de 5 mg.mL^{-1} e se manteve praticamente constante no restante do tempo de cultivo. O pH do meio praticamente não variou durante todo o cultivo.

A atividade específica máxima foi de $2,3 \text{ U.mg}^{-1}$ obtida em 24 h de cultivo. Enquanto, a atividade enzimática máxima foi $10,4 \text{ U.mL}^{-1}$ obtida em 24 h de fermentação, na qual já era esperada pelo modelo que previa $9,7 \text{ U.mL}^{-1}$ de atividade, demonstrando apenas 5% de desvio relativo da atividade.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O método que demonstrou maiores vantagens operacionais e experimentais para desproteinização do soro de leite foi o tratamento com alcalase.

Na seleção entre as linhagens estudadas neste trabalho, verificou-se que o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 apresentou maior produção de β -galactosidase, 9 U.mL⁻¹ em 24 h de cultivo a 30 °C e 180 rpm. Esta cepa foi selecionada para os estudos de otimização do meio de cultura para produção da enzima, através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta.

A maximização para a produção da β -galactosidase teve sua condição estabelecida como sendo: concentração de lactose de 120 g.L⁻¹, concentração de extrato de levedura de 5 g.L⁻¹, concentração de peptona de 15 g.L⁻¹ e concentração de sulfato de amônio de 15 g.L⁻¹, com pH inicial do meio de cultura 4,0 e a concentração de água de parboilização de arroz fixada em 30 g.L⁻¹ tendo o seu máximo obtido em 24 h de cultivo a 30 °C e 180 rpm. A atividade enzimática alcançada foi 10,4 U.mL⁻¹.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outros co-produtos agroindustriais para produção de β -galactosidase
- Produzir a enzima em fermentador;
- Avaliar o efeito da agitação e aeração na produção da enzima;
- Purificar e caracterizar a enzima por diferentes técnicas;
- Estudar técnicas de imobilização e comparar os parâmetros da enzima livre e imobilizada;
- Avaliar a reutilização da enzima imobilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C. & BUCKERIDGE, M. S. Purification of a beta-galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae): Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.619-627, 2006.

ALVES, Fernanda Germano. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

AKTAS,N., BOYACI,I.H., MUTLU,M. & TANYOLAC,A. (2006) Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM) 504, **Bioresource Technology**, 97, 2252-2259.

AMATO, G.W. & SILVEIRA, S.F. Parboilização do arroz no Brasil. Porto Alegre: CIENTEC. **Boletim Técnico**, 1991.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995.

BECERRA, M. & GONZALEZ SISO, M. I. Yeast [beta]-galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19, p. 39-44, 1996.

BECERRA, M., BELMONTE, E. R., CERDÁN, M. E., SISO, M.I.G. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-139, 2001.

BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L. & MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of [beta]-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 696-699, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, SECRETARIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Normas de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do arroz**. Brasília, v.8, n.6, p.1-25, 2009.

BURY, D.; JELEN, P. & KALAB, M. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.2, p. 23-29, 2001.

CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; RAMÍREZ, O. T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 773-778, 2005.

CRUZ, R.; CRUZ, V. A., BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M. O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. S. Properties of a new fungal β -galactosidase with potencial application in the dairy industry. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 265-271, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. S. & MER. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of beta-D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.589-593, 2000.

GECIOVA, J.; BURY, D. & JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry--a review. **International Dairy Journal**, v.12, p. 541-553, 2002.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P. & KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable [beta]-galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 161-172, 2005.

HESING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 516-521, 1994.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, A. E. Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. **Food Technology**, v. 45, p. 92-95, 1991.

HSU, C. A.; YU, R. C. & CHOU, C. C. Production of h-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 104, p. 197– 206, 2005.

HSU, C. A.; YU, R. C.; LEE, S. L. & CHOU, C. C. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 186-189, 2007.

INCHAURRONDO, V. A.; WILSON, L.; TOMASSELO, G. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. & VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a [beta]-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* 592. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G. & VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for [beta]-galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p. 33-40, 2004.

KALIL, S. J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 257-264, 2001.

KESKINLER, B.; ERHAN, E.; AKAY, G.; KAYA, M. & BAYGUVEN, B. Microfiltration of whey proteins adsorbed on yeast cells. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, p. 71-78, 2004.

KIM, S. H.; LIM, K. P. & KIM, H. S. Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by b-D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal Dairy Science*. v. 80, p. 2264-2269, 1997.

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

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

LADERO, M.; SANTOS, A. & GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p. 1–9, 2006.

LIMA, U. A. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Editora Edgar Blucher. 2001. V. 3: Processos fermentativos e enzimáticos.

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 35–40, 2004.

MAHONEY, R. R.; NICKERSON, T. A.; WHITAKER J. R. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures of optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 11, p. 1620-1629, 1974.

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

MANERA, A. P. Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 e caracterização parcial da enzima. **2006**. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MANERA, A. P.; ORES, J. C. ; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 (in press, v1 2008). **Food Technology and Biotechnology**, v. 1, p. 1-6, 2008.

MARTINS, D. B. G.; SOUZA, C. G.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 decreases by high concentrations of galactose. **Current Microbiology**, v.44, p. 379-382, 2002.

MATHEUS R. & A. L.; RIVAS, N. Producción y caracterización parcial de beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada em suero de leche desproteínizado. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, 2003.

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

MOEINI, H.; NAHVI, I. & TAVASSOLI, M. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 249-255, 2004.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 24-29, 2001.

NAHVI, I & MOEINI, H. Isolation and identification of yeast strains with high β -galactosidase activity from dairy products. **Biotechnology**, v. 3, p. 35-40, 2004.

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

NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 845-849, 2001.

OZBEK, B. & ULGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

PANESAR, R.; PANESAR,P.S.; SINGH,R.S.; KENNEDY,J.F. & BERA,M.B. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. **Food Chemistry**, v.101, p.786-790, 2007.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S. & CHATELLIER, S. Yeast identification - past, present, and future methods. **Medical Mycology**, v. 45, p. 97-121, 2007.

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

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163–2169, 2007.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAID, R. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology & Biotechnology**, v. 41, p. 315-320, 2003.

RECH, R.; CASSINI., S. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of protein-hidrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

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

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária – UFPel, 2000. V. 3: produção de enzimas, engenharia dos processos fermentativos.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do pão editora, 2005.

RODRÍGUEZ, A. P.; LEIRO, R. F.; TRILLO, C. C.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G.; BECERRA, M. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis* - *Aspergillus niger* β -galactosidase. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1-13, 2006.

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

SANTOS, A.; LADERO, M. & GARCIA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a [beta]-Galactosidase from *Kluyveromices Fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SCHIMIDEL, W. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Editora Edgar Blucher. 2001. V. 2: Engenharia bioquímica.

SENER, N.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A modeling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, 2006 – artigo impresso.

SENSES-ERGUL, S.; AGOSTON, R.; BELAK, A.; DEAK, T. Characterization of some Yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. **International Journal of Food Microbiology**, v.108 p. 120 – 124, 2006.

SILVA, C. H. C.; PULS, J.; SOUSA, M. V. D. & FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 114-119, 1999.

SILVA, M. E. D. & FRANCO, T. T. Purification of microbial b-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 324-331, 1999.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T.; STEINBO, M.; KULBE, K. D.; LORENZ, W.; HALTRICH, D. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using beta-Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 4999-5006, 2006.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized [beta]-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p. 631-637, 2000.

TANGO, M. S. A. & GHALY, A. E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass and Bioenergy**, v.16, p. 61-78, 1999.

VASILJEVIC, T. & JELEN, P. Production of [beta]-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.

VASILJEVIC, T. & JELEN, P. Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude [beta]-galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 175-184, 2002.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.