



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

INFLUÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO β-GALACTOSIDASE POR *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 UTILIZANDO SORO DE QUEIJO

**M.P.B. Pereira¹; T. C. de Souza²; C. M. G. de F. Lemos³;
J. A. M. Lemos⁴ e L. R. B. Gonçalves⁵**

⁽¹⁾ Discente do DEQ/UFC ⁽²⁾ Bolsista de iniciação científica do CNPQ/DETAL/UFC
⁽³⁾ Técnica de laboratório da FUNCAP/DEQ/UFC ⁽⁴⁾ Bolsista do Programa de Educação Tutorial
do PET/DEQ/UFC ⁽⁵⁾ Docente do DEQ/UFC
Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará
Endereço- Campus do Pici, Bloco 709 – CEP 60455-760, Fortaleza, CE,
e-mail: mariana.paulinia@gmail.com

RESUMO - A importância industrial da enzima β-galactosidase (lactase, EC 3.2.1.23) está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, algo de grande importância devido ao problema da intolerância à lactose presentes em um grande número de pessoas em várias partes do mundo. Ao longo dos anos, com o intuito de melhorar a produção da β-galactosidase, esta enzima vem sendo estudada com o objetivo de obtenção de condições otimizadas de produção. Dessa forma, o estudo de parâmetros como a aeração é importante porque ele determina a oxigenação da cultura, influenciando o consumo de substrato, e permitindo ou inibindo a síntese dos produtos. Além disso, contribui para a mistura do meio de fermentação, principalmente quando a velocidade de agitação mecânica é baixa. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi o estudo da influência da aeração na produção da β-galactosidase pelo cultivo do microrganismo *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite suplementado com extrato de levedura. Os ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada de 1L e duas condições distintas de aeração durante as fermentações foram avaliadas.

Palavras chave: lactase, reator batelada, aeração.

INTRODUÇÃO

Com a expansão do consumo mundial de leite, queijos e derivados nos últimos anos, a produção de soro, um dos principais subprodutos da indústria de laticínios, aumentou consideravelmente. Em função de

seu elevado poder poluente e da dificuldade de sua eliminação, pesquisas têm sido desenvolvidas, buscando alternativas para o aproveitamento dos componentes do soro, principalmente, a lactose (Carminatti, 2001).

A hidrólise da lactose em monoses (glicose e galactose) tem se mostrado um dos

métodos mais promissores para remover a lactose do leite e de seus subprodutos, como o soro, sendo os monossacarídeos, mais facilmente digeríveis e solúveis (Bódalo *et al.*, 1991; Fox e Mcsweeney, 1998; Walstra e Jenness, 1984; Ordóñez, 2005; Klein *et al.*, 2010).

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) ou lactase hidrolisa as ligações galactosídicas β -D-1,4 da lactose carboidrato característico do leite e conhecido popularmente como “açúcar do leite”. Esta enzima pode ser encontrada em plantas e animais, assim como em uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo leveduras, fungos e bactérias (Gékas e López-Leiva, 1985).

De acordo com a Resolução nº 205, de 17/11/2006 e pela RDC nº 26, de 26/05/2009, para fins alimentícios, a enzima lactase deve ser de origem microbiana: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.*, geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Recognized as Safe*).

A enzima β -galactosidase obtida por leveduras é produzida intracelularmente, por isso há a necessidade do rompimento celular ou a permeabilização da membrana da célula sem causar desnaturação da enzima (Santiago *et al.*, 2004). Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes podem ser aplicados (Medeiros *et al.*, 2008).

O estudo de diferentes condições operacionais, como a aeração e agitação, é importante porque ele determina a oxigenação da cultura, influenciando o consumo de substrato, e permitindo ou inibindo a síntese dos produtos. Se por um lado, a agitação controla a transferência de nutrientes e a distribuição de ar, pelo outro a aeração contribui para a mistura do meio de fermentação, principalmente quando a velocidade de agitação mecânica é baixa (Alves, 2010). Esse estudo possui um papel importante na produção de enzimas e pode fornecer informações para o scale-up.

Neste contexto, presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes condições operacionais (agitação e aeração) na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis*

NRRL Y1564 utilizando soro de leite desproteínizado como fonte de carbono em um biorreator de bancada.

MATERIAIS E METÓDOS

Micro-organismo

A espécie *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 foi doada pelo USDA (United States Department of Agriculture) pertencentes a coleção de cultura da ARS (Agricultural Research Service). A cultura estoque foi mantida em meio ágar YEPD (contendo: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) sob refrigeração.

Composição e pré-tratamento do soro de queijo

O soro de queijo em pó utilizado para fermentação foi adquirido da Relat - Laticínios Renner S.A.(Estação, Rio Grande do Sul) contendo a seguinte composição (g/100g): carboidratos 73 g; proteínas 10 g; gorduras totais 1,0 g; gorduras saturadas 0,5 g; sódio 1080 mg e cálcio 796 mg.

O pré-tratamento do soro de queijo foi realizado de acordo com Lima (2012). Nesse procedimento o soro de queijo em pó foi diluído para 50 g/L de lactose e aquecido a 90°C. Em seguida adicionou-se ácido láctico sob agitação suave até o pH atingir 4,8. A agitação era então interrompida e a solução mantida em repouso por alguns minutos, para sedimentação das proteínas. Após a etapa de pré-tratamento do soro, a solução obtida foi utilizada como meio de cultivo suplementado com 1 g/L de extrato de levedura, sendo o pH corrigido com KOH 4 mol/L até pH 6,0 e esterilizado a 110°C por 10 min.

Produção da enzima β -galactosidase

Para a preparação do inóculo de *Kluyveromyces lactis* utilizou-se soro de leite pré-tratado como meio de inóculo. O micro-organismo foi repicado em placas de Petri contendo meio YEPD para preparação do inóculo e incubado em estufa microbiológica a 30 °C por 24 horas. Após este período, foram

transferidas três alçadas da cultura para Erlemeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio de propagação de inóculo.. Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório (Shaker Tecnal TE – 480) a 30 °C, 180 rpm por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, centrifugou-se o inóculo a 15000 rpm por 10 min para se obter a concentração celular desejada para o ensaio no biorreator.

Extração da Enzima

O pellet de células foi lavado uma vez com 20 mL de água destilada gelada e centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C. Após a lavagem o pellet de células foi ressuspensionado em tampão fosfato de potássio pH 6,6 e 0,1mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ para uma concentração celular de 2,9 mg/mL (Lima, 2012).

O processo de extração foi realizado através de ensaios de rupturas com pérolas de vidro em agitador tipo vórtex. Este consiste em utilizar cargas de pérolas de vidro de 1,10 g/mL por um período de 30 min, com intervalos de 2 min em banho de gelo a cada 5 min de processo (Medeiros *et al.*, 2008; Freitas, 2013). Após o rompimento das células, centrifugou-se a 10.000g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi analisado quanto a atividade enzimática.

Métodos Analíticos

Atividade enzimática de β -galactosidase: A atividade da β -galactosidase foi determinada segundo Inchaurredo *et al.* (1994), usando *o*-nitrofenyl-beta-D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato.

Concentração de biomassa: A concentração celular foi determinada através da análise da DO (densidade ótica). A densidade ótica foi acompanhada por espectrofotometria a 620 nm e a concentração de biomassa, em g/L, foi determinada através da curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do pH e do crescimento celular na produção de β -galactosidase

Foram realizados cultivos aeróbios para verificar o efeito da agitação e aeração, simultaneamente, na produção de lactase. As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram o perfil de crescimento celular, atividade enzimática e o pH durante os ensaios.

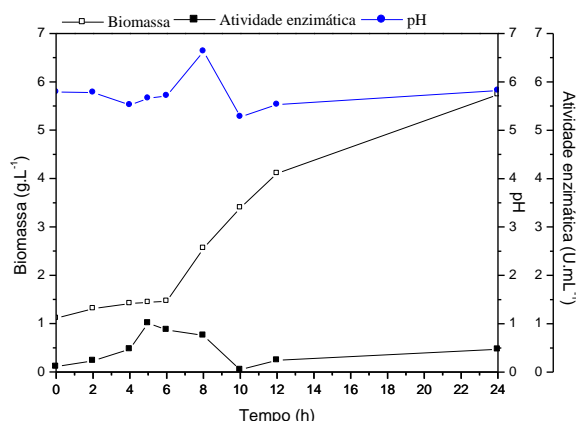
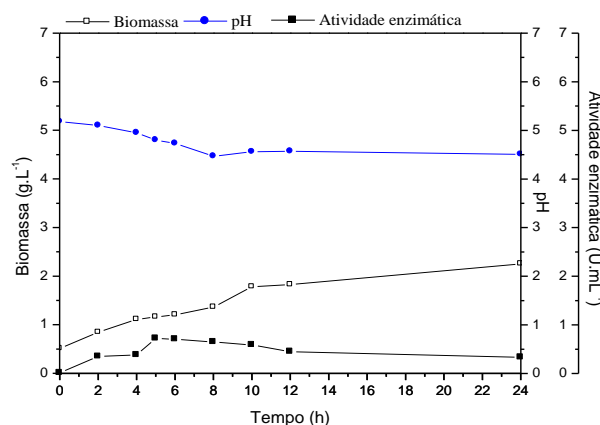


Figura 1: Perfil do crescimento celular e atividade enzimática na produção de lactase em função do tempo para *Kluyveromyces*



lactis NRRL Y1564 a 200 rpm, 1vvm. (■) Atividade enzimática, (○) Biomassa, (●) pH

Figura 2: Perfil do crescimento celular e atividade enzimática na produção de lactase em função do tempo para *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 a 200 rpm, 2vvm. (■) Atividade enzimática, (○) Biomassa, (●) pH

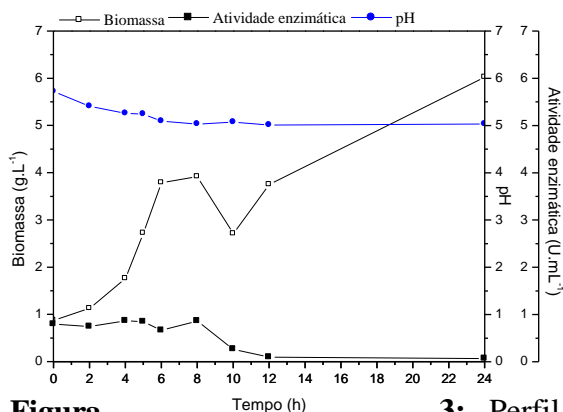


Figura 3: Perfil do crescimento celular e atividade enzimática na produção de lactase em função do tempo para *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 a 300 rpm, 1 vvm. (■) Atividade enzimática, (○) Biomassa, (●) pH

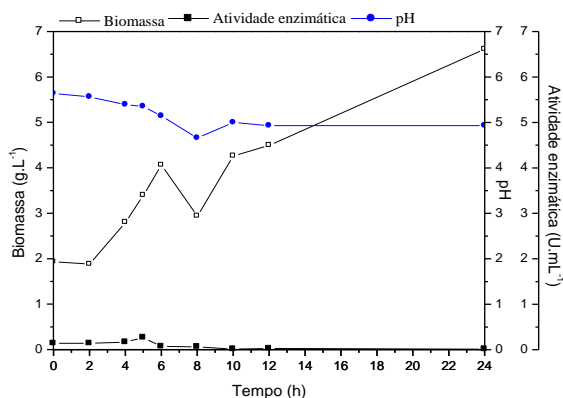


Figura 4: Perfil do crescimento celular e atividade enzimática na produção de lactase em função do tempo para *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 a 300 rpm, 2 vvm. (■) Atividade enzimática, (○) Biomassa, (●) pH

Através dos gráficos percebemos o aumento da biomassa e a queda do pH ao longo do processo. O perfil do pH foi similar para todos os experimentos, e os resultados mostram que

não há uma grande variação, com a fermentação começando com um pH 5,5 e terminando com valores próximos a 5,0. De acordo com Schneider *et al.* (2001), o pH cai devido ao acúmulo de CO₂, oriundo do metabolismo do micro-organismo.

Em meios que contêm lactose como única fonte de carbono, a síntese de β-galactosidase em *K. lactis* está associada ao

crescimento populacional. Vários estudos têm sido realizados, e a observação mais comum é que a atividade da enzima por unidade de concentração de células é máxima na entrada da fase estacionária, caindo em seguida quando a lactose ainda é detectada no meio (Mahoney *et al.*, 1974; Dickson e Markin, 1980; Inchaurredo *et al.*, 1994).

Acredita-se que o aumento da atividade de β-galactosidase esteja relacionado com a concentração ideal de lactose no meio, resultando na indução do lac-gal regulon. Já a queda da atividade pode ser causada por inúmeros fatores fisiológicos que determinam essa fase do crescimento, entre os quais a resposta ao estresse nutricional e aos produtos do metabolismo primário, como etanol (Ornelas, 2001).

Influência da agitação e da aeração na produção de β-galactosidase

Avaliou-se a influência da agitação e da aeração na produção da enzima β-galactosidase por *K. lactis* NRRL Y1564 em soro de leite ao longo de 24 horas de fermentação. Obtiveram-se maiores resultados de atividade enzimática, específica e produtividade com 5 h de cultivo. Esses valores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Influência da agitação e da aeração na produção da enzima β-galactosidase

| Ensaio | | Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹) | Produtividade (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹) |
|---------|-------|--|--|
| | | extrato) | |
| 200 rpm | 1 vvm | 1,009 | 0,201 |
| 200 rpm | 2 vvm | 0,717 | 0,143 |
| 300 rpm | 1 vvm | 0,865 | 0,216 |
| 300 rpm | 2 vvm | 0,264 | 0,053 |

Na Tabela 1, observa-se há uma maior atividade enzimática (1,009 U.mL⁻¹) com 5 horas de cultivo, nas menores condições de agitação e aeração (200 rpm, 1 vvm). Após esse período houve uma diminuição na produtividade da enzima como, também, na

atividade enzimática. A atividade enzimática obtida nesse estudo foi superior ao resultado obtido no estudo com *K. lactis* NRRL Y-1564 realizado por MANERA *et al.* (2008), em que a atividade máxima foi de $0,70 \text{ U.mL}^{-1}$ com 24 horas de cultivo em mesa agitadora.

Ornelas *et al.* (2008) em seu estudo, verificou que a maior produção da enzima foi observada na transição entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária, como pode ser observado na Figura 5.

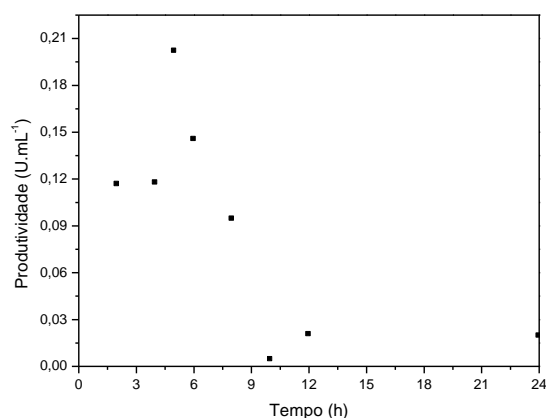


Figura 5- Produtividade da enzima β -galactosidase por *K. lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite a 200 rpm, 1vvm

O entendimento de como a concentração de oxigênio modula o metabolismo das leveduras é essencial para o aperfeiçoamento dos processos. *K. lactis* é classificada como aeróbia estrita, entretanto, o excesso de substrato fermentativo pode inibir a respiração, mesmo em ambientes aeróbicos, uma vez, que há a saturação da capacidade respiratória dos micro-organismos. Este fenômeno é conhecido, na fisiologia das leveduras, como efeito Crabtree (Wiebe *et al.*, 2008; Gonzales-Siso *et al.*, 2000).

Essa variação no metabolismo respiro-fermentativo de *K. lactis* está relacionada à aeração durante o cultivo, pois *K. lactis* é considerada uma levedura Crabtree negativa, isto é, se houver um ambiente com excesso de açúcar e saturado de oxigênio ela respira e não fermenta. A fermentação somente ocorrerá quando a concentração de oxigênio for limitante (Ornelas, 2001).

CONCLUSÕES

Os cultivos aeróbios variando a agitação e a aeração mostraram a viabilidade da produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 utilizando soro de leite desproteínizado como fonte de carbono mostrou-se uma alternativa viável.

Uma análise do perfil do pH durante os cultivos foi similar para todos os experimentos e verificou que, em valores de pH próximos a 5,0 a enzima diminui a sua atividade. A partir das curvas de atividade enzimática e específica verificou-se que a maior produção de lactase ocorre a 200 rpm e 1 vvm obtendo uma atividade enzimática de $1,009 \text{ U.mL}^{-1}$ extrato com 5 horas de cultivo.

REFERÊNCIAS

- Resolução nº 26, de 26 de maio de 2009. Aprova lista de enzimas permitidas para o uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução, em substituição ao anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 maio 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0026_26_05_2009.html>. Acesso em: 27 jun. 2013.
- ALVES, F.G; FILHO, F.M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J; Maximization of β -Galactosidase Production: A Simultaneous Investigation of Agitation and Aeration Effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v 160, p 1528–1539, 2010.
- BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J.L.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F.; DÍAZ, F. A. Comparison of Different Methods of β -Galactosidase Immobilization. *Process Biochemistry*, v.26, n.6, p.349–353. 1991.
- CARMINATTI, C.A; Ensaios de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (USFC),

- Florianópolis – Santa Catarina, 79 f., 2001.
- DICKSON, R.C, MARKIN, J.S. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. Journal of Bacteriology, v.142, n.3,p.777-785, 1980.
- FREITAS, M.F.M. Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 99 f., 2013.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry 1ed.London: Thomson Science, 461p, 1998.
- GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review .Process Biochemistry, v. 20, p. 2-12. 1985.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I. The Biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, v.57, p.1-11, 1996.
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic bath cultures in lactose-limited synthetic medium. Process Biochemistry, v. 29, p. 47-54, 1994.
- KLEIN, M. P. et al. Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização do doce de leite. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1530-1535, 2010.
- MAHONEY, R.R., NICKERSON, T.A., WHITAKER, J.R. Selection of strains, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces lactis*. Journal Dairy Science, v.58, n.11, p. 1620-1629, 1974.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Food Technology and Biotechnology, v.46, n. 1, p. 66-72, 2008.
- MEDEIROS, F. O. ; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. Química Nova, v.31, p. 336-339, 2008
- ORDÓÑEZ, J.A. Tecnologia de Alimentos. SãoPaulo: Artmed, 2005. 279p.
- ORNELAS, A.P.R.C.; Atividade de β -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* na fase de desaceleração do crescimento em soro de queijo ultrafiltrado.Dissertação(Mestrado em Microbiologia Agrícola,). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa– Minas Gerais, 64 f., 2001
- ORNELAS, A. P; SILVEIRA, W. B; SAMPAIO, F. C; PASSOS, F. M. The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. Journal Appl Microbiol, 2008
- SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J.Estudo da produção de b-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.
- SCHNEIDER, A. L. S., MERKLE, R., CARVALHO-JONAS, M. F., JONAS, R., FURLAN, S. Biotechnology Letters, v. 23, p. 547–550,2001.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. Química y físicalactológica. Zaragoza: Acribia, 1984. 423 p.
- WIEBE, M.G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJÄRVI, L.;TOIVARI, M.; KOKKONEN, J.T.; KIURU, J.; KETOLA, E.A.; JOUHTEN, P.;HUUSKONEN, A.; MAAHEIMO, H.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxigen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. FEMS Yeast research, v.8, n.1, p.140-154, 2008.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.