

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ COORDENAÇÃO DE
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

LUCIANA MARIA RACHOW

**PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE A PARTIR DO PERMEADO DE
SORO DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC
36907**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2019

LUCIANA MARIA RACHOW

**PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE A PARTIR DO PERMEADO DE
SORO DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC
36097**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – COEBB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Câmpus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva.

TOLEDO
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE A PARTIR DO PERMEADO DE SORO DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

Por

LUCIANA MARIA RACHOW

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 22 de novembro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. *O(A) candidato(a) foi arguido(a)* pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o **trabalho Aprovado**.

Prof. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva (Orientador)

Prof. Dr. Clóvis Bombardelli (Membro – *Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos*)

Técnica de laboratório Dra. Danielle Camargo (Membro – *Universidade Tecnológica Federal do Paraná*)

***A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rosane e Aldair, que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse estar aqui hoje e continuam sendo meu suporte e aos meus avós, que se orgulham tanto ao me ver tornando-se engenheira. Amo vocês para sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir a vida e poder compartilhar-lá com pessoas tão especiais.

Aos meus pais, Rosane e Aldair, que são minha base e meu porto seguro. Obrigada por todo esforço, dedicação, paciência e amor, devo tudo e principalmente essa graduação à vocês! Aos meus irmãos, Fábio, Karine e Aline, por compreender inúmeras faltas e me apoiarem em todos os desafios: me orgulho muito de vocês! Aos meus avós, Ervaldo, Maria Ilaria, Álvaro e Silvia, que se preocupam tanto comigo e me desejam tantas coisas boas, vocês fazem parte dessa conquista! E a toda a minha família, por sempre torcer por mim. Vocês fazem toda a diferença.

À UTFPR Câmpus Toledo por me permitir o acesso ao ensino público e de qualidade.

À professora dra. Gracinda Marina Castelo da Silva, por me receber com tanto carinho desde o primeiro ano da graduação e com amor e paciência me ensinar muito sobre a engenharia e a vida. Obrigada por contribuir para meu crescimento profissional e pessoal e pela sua amizade. Você tem minha eterna admiração.

À todos os meus professores que se tornaram também amigos durante a graduação, obrigada pela dedicação, paciência e incentivo. Foi um privilégio poder aprender com vocês. Em especial ao professor Clóvis e a Danielle, por aceitarem participar dessa banca e contribuírem com melhorias para meu trabalho.

Aos técnicos de laboratório da universidade, Danielle, Rafael, Irauzza, Carol e Bruna, obrigada pela prestatividade, atenção e principalmente amizade.

À empresa SOORO por fornecer o material dessa pesquisa e à Indiara, que me auxiliou durante a Iniciação Científica e supervisionou o meu estágio nessa empresa, muito obrigada! Foi uma oportunidade ímpar.

Aos meus amigos, obrigada por compartilharem comigo esses anos, as dificuldades e inúmeras lembranças boas. Desejo sucesso imenso à todos. Em especial aos meus amigos Esteffany, Latoya, Anderson, Adrieli, Tatiane e Letícia, pela parceria em qualquer ocasião e incentivo sempre. Vocês fizeram toda a diferença na minha vida e me orgulho muito dos engenheiros que serão! *I miss you already!*

E de modo geral agradeço à todas as pessoas que contribuíram de uma forma ou outra para meu crescimento ao longo desses anos, eu não teria conseguido sem vocês.

RESUMO

O aproveitamento de substratos advindos dos processos industriais apresenta-se com uma alternativa viável na obtenção de produtos com alto valor agregado. A indústria de laticínios, por exemplo, é responsável pela geração de resíduos com alta demanda química e bioquímica de oxigênio, como o permeado de soro de leite, um subproduto da concentração do soro de leite. O permeado é constituído basicamente por lactose, um dissacarídeo fermentescível pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, que converte lactose em galactose e glicose devido a atividade enzimática da β -galactosidase. Entretanto, ele não apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento celular, de forma que necessita de suplementação. Desse modo, elaborou-se um planejamento delineamento composto central rotacional com as variáveis temperatura, agitação e composição de sais (sulfato de amônio, fosfato de potássio dibásico e sulfato de magnésio heptahidratado) para avaliar a produção de β -galactosidase a partir da fermentação do permeado de soro de leite pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Os ensaios foram realizados com 2 g_{cél} L⁻¹, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, nas condições de 30 a 50 °C, 120 a 180 RPM, 0 a 20 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 1 a 9 g L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico, 0,2 a 1 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado e a atividade enzimática foi determinada pelo método do ONPG. Após a determinação da condição que proporcionou a maior atividade enzimática realizou-se o ensaio em biorreator com 3,5 L de meio. Os resultados obtidos nos experimentos propostos pelo planejamento apresentaram constância em relação a atividade enzimática durante o acompanhamento por 8 horas sendo que as melhores respostas foram obtidas para os pontos centrais – a 40°C, 150 RPM e 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico e 0,6 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado, com atividades de 20,726, 20,890 e 20,879 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹ e a 40 °C, 180 RPM e 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico e 0,6 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado, que apresentou 20,771 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹, porém com um baixo rendimento celular. O tratamento estatístico mostrou que as variáveis testadas foram significativas porém apresentaram um efeito negativo para a variável resposta. O ensaio em biorreator foi realizado com a condição central do planejamento e a atividade enzimática variou de 20,409 a 19,256 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹ em 5 horas de cultivo. A avaliação da DQO e DBO mostrou que a fermentação em biorreator permitiu a redução a 41,105 e 63,95% da carga orgânica, respectivamente. Desse modo, os resultados obtidos mostram que o permeado de soro de leite apresenta potencial para uso como substrato para produção de β -galactosidase porém requer estudos a cerca das fontes de suplementação e a fermentação pode ser um método empregado para redução do nível poluente do material.

Palavras-chave: β -galactosidase; fermentação de lactose, resíduo de laticínio, soro de leite, permeado de soro de leite; *Kluyveromyces marxianus*.

ABSTRACT

The use of substrates from industrial processes is a viable alternative to obtain products with high added value. The dairy industry, for example, is responsible for the generation of high COD and BOD residues such as whey permeate, a byproduct of cheese whey concentration. The permeate is basically lactose, a fermentable disaccharide by the yeast *Kluyveromyces marxianus*, which converts lactose to galactose and glucose due to the enzymatic activity of β -galactosidase. However, it does not have all the nutrients needed for cell growth, so it needs supplementation. Thus, a central rotational composite design with temperature, agitation and salt composition (ammonium sulfate, dibasic potassium phosphate and magnesium heptahydrate) was designed to evaluate the production of β -galactosidase from the fermentation of whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* yeast ATCC 36907. Assays were performed with 2 g_{cel} L⁻¹, 10 g L⁻¹ yeast extract, under conditions of 30 to 50 °C, 120 to 180 RPM, 0 to 20 g L⁻¹ ammonium sulfate, 1 to 9 g L⁻¹ dibasic potassium phosphate, 0.2 to 1 g L⁻¹ magnesium sulfate heptahydrate and enzymatic activity were determined by the ONPG method. After determining the condition that provided the highest enzymatic activity, the bioreactor assay with 3.5 L medium was performed. The results obtained in the experiments proposed by the planning presented a constant in relation to the enzymatic activity during the follow up for 8 hours and the best answers were obtained for the central points - at 40 °C, 150 RPM and 10 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ ammonium sulfate, 5 g L⁻¹ dibasic potassium phosphate and 0.6 g L⁻¹ magnesium sulfate heptahydrate, with activities of 20,726, 20,890 and 20,879 U_{ONPG} g_{cel}⁻¹ and at 40 °C, 180 RPM and 10 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ ammonium sulfate, 5 g L⁻¹ dibasic potassium phosphate and 0.6 g L⁻¹ magnesium sulfate heptahydrate, which showed 20,771 U_{ONPG} g_{cel}⁻¹, but with a low cell yield. Statistical treatment showed that the tested variables were significant but had a negative effect for the response variable. The bioreactor assay was performed with the central condition of the design and the enzymatic activity ranged from 20.409 to 19.256 U_{ONPG} g_{cel}⁻¹ within 5 hours of cultivation. The COD and BOD evaluation showed that bioreactor fermentation allowed the reduction to 41.105 and 63.95% of the organic load, respectively. Thus, the results show that whey permeate has potential for use as substrate for β -galactosidase production but requires studies on supplementation sources and fermentation can be a method used to reduce the pollutant level of the material. .

Key-words: β -galactosidase; lactose fermentation, dairy residue, whey, whey permeate; *Kluyveromyces marxianus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de obtenção do soro de leite.	12
Figura 2 - Fluxograma de obtenção do permeado de soro de leite.	15
Figura 3 - Processo de separação por membranas.	15
Figura 4 - Estrutura da molécula de lactose.	17
Figura 5 - Morfologia da levedura <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em microscopia óptica, 100x.	21
Figura 6 - Representação do metabolismo da lactose em leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i>	23
Figura 7 - Estrutura tridimensional da β -galactosidase produzida por <i>Escherichia coli</i>	26
Figura 8 - Hidrólise da lactose pela β -galactosidase.	27
Figura 9 – Concentração celular de <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 cultivada em meio YPD.	39
Figura 10 - Concentração celular de <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 cultivada em meio com permeado de soro de leite e extrato de levedura.	39
Figura 11 - Gráfico de Pareto obtido para a atividade enzimática.	61
Figura 12 - Demonstração da relação dos valores preditos versus observados para a atividade enzimática.	62
Figura 13 - Superfície de resposta para atividade enzimática.	64
Figura 14 - Relação dos valores previstos e desejabilidade para Atividade Enzimática.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa dos valores para instalação de sistemas de tratamento de efluentes de laticínios que processam entre 80.000 e 120.000 litros dia ⁻¹	13
Tabela 2 - Relação das variáveis pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo para trabalhos que utilizaram resíduo de laticínio como meio de cultivo de diferentes cepas de <i>K. marxianus</i> para produção de β -galactosidase.....	30
Tabela 3 - Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no planejamento experimental a nível de 10% de confiança.....	41
Tabela 4 - Matriz do planejamento composto central para a fermentação do permeado de soro de leite.....	41
Tabela 5 - Caracterização do permeado de soro de leite.....	45
Tabela 6 - Atividade enzimática da β -galactosidase expressa por U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹ obtida durante 8 horas de fermentação em batelada do permeado de soro de leite com <i>Kluyveromyces marxianus</i> a partir do planejamento DCCR.....	47
Tabela 7 - Atividade enzimática da β -galactosidase expressa por U _{ONPG} mL ⁻¹ obtida durante 8 horas de fermentação em batelada do permeado de soro de leite com <i>Kluyveromyces marxianus</i> a partir do planejamento DCCR.....	86
Tabela 8 - Viabilidade celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> após 1 e 8 horas de fermentação do permeado de soro de leite em batelada.....	53
Tabela 9 - Análise do modelo de regressão linear/quadrático por meio da ANOVA (R ² =0,85), obtido para a resposta Atividade Enzimática (U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹) após 8 horas. Em negrito estão os valores com p<0,1.....	64
Tabela 10 – Valores mínimos, críticos e máximos observados para a obtenção do melhor resultado de atividade enzimática.....	67
Tabela 11 - Resultados obtidos a partir da fermentação do permeado de soro de leite em biorreator em batelada a 40 °C, 150 RPM, 10 g L ⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L ⁻¹ de sulfato de amônio, 5 g L ⁻¹ de fosfato de potássio e 0,6 g L ⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado.....	70

LISTA DE SIGLAS

AMM	Água de maceração de milho
BHI	Ágar infusão cérebro-coração
CPS	Concentrado proteico de soro
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
Da	Daltons
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	3,5-dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
GOS	Galactooligossacarídeos
GRAS	Generally Regarded as Safe
GRT	Graus Redutores Totais
M	Molar
mL	Mililitro
Mmol	Milimol
μmol	Micromol
Nº	Número
PSM	Processo de Separação por Membranas
QPS	Qualified Presumption of Safety
RPM	Rotações por minuto
SDA	Ágar de Sabourad dextrose
U	Unidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto
U _{ONPG}	Quantidade de μmols de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação
UHT	Ultra High Temperature
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Uv-Vis	Ultravioleta visível
vvm	Volume de ar por volume de meio
WPC	Whey Protein Concentrated
YM	Extrato de levedura e malte
YPD	Extrato de levedura, peptona, dextrose
YPL	Caldo de levedura, peptona e lactose

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 Soro de leite.....	12
3.2 Permeado de soro de leite.....	14
3.3 Lactose.....	17
3.4 Leveduras.....	19
3.5 Microrganismos empregados na produção de β -galactosidase.....	20
3.5.1 As leveduras <i>Kluyveromyces marxianus</i>	20
3.6 Enzimas.....	25
3.7 A enzima β -galactosidase.....	26
3.8 Importância da suplementação nutricional do meio de fermentação.....	28
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Substrato.....	34
4.1.2 Caracterização do substrato.....	34
4.1.2.1 Açúcares totais medidos como lactose.....	34
4.1.2.2 Umidade.....	34
4.1.2.3 Proteínas.....	35
4.1.2.4 Lipídios.....	35
4.1.2.5 Sais minerais.....	36
4.1.2.6 Determinação de sólidos solúveis.....	37
4.1.2.7 Determinação do pH.....	37
4.1.2.8 Análise de DQO e DBO.....	37
4.2 Microrganismo empregado.....	37
4.2.1 Curva de concentração celular.....	38
4.3 Planejamento experimental delineamento composto central rotacional DCCR ..	40
4.4 Ensaios fermentativos.....	41
4.4.1 Análise do processo fermentativo.....	42
4.4.1.1 Viabilidade celular.....	42
4.4.1.2 Determinação da atividade enzimática.....	42
4.5 Ensaio fermentativo no biorreator.....	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1. Caracterização do permeado de soro de leite.....	45
6.2 Experimentos do planejamento delineamento composto central rotacional DCCR.....	47
6.3 Tratamento estatístico dos resultados obtidos para a atividade enzimática da β -galactosidase na fermentação do permeado de soro de leite.....	59
6.4 Fermentação no biorreator.....	65

7. CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS	70
ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose atinge de 60 a 70% da população mundial, causando sintomas de má digestão deste dissacarídeo, devido à insuficiência/deficiência de uma enzima análoga a lactase (β -galactosidase) no trato digestivo (BANSAL, *et. al*, 2008; ALVES, 2018). Indivíduos acometidos por essa doença podem ingerir a enzima em suas refeições, pois ela catalisa a quebra da lactose em glicose e galactose, permitindo o consumo dos derivados lácteos (SOUZA JÚNIOR, 2004).

Para sua produção pode-se empregar os processos fermentativos, que são realizados por microrganismos e utilizar resíduos industriais como substrato, reduzindo os custos do processo. As leveduras do gênero *Kluyveromyces* destacam-se na produção desta enzima, pois utilizam a lactose como fonte de carbono, e por serem consideradas *GRAS (Generally Regarded as Safe)* são uma alternativa para uso na indústria farmacêutica e alimentícia (SOUZA JÚNIOR, 2004; ALVES, 2008).

Para tanto, substratos à base de lactose podem ser utilizados na fermentação da levedura *K. marxianus* e neste contexto se inserem os efluentes de laticínios, como o permeado de soro de leite. Ele é um resíduo gerado na ultrafiltração do soro de leite, é altamente poluente com uma DQO e DBO elevada, de respectivamente 50 a 102 g L⁻¹ e 30 a 50 g L⁻¹ e isso requer tratamentos onerosos para posterior descarte no meio ambiente (ANDRADE, MARTINS, 2002; BALDASSO *et al.*, 2009; PRAZERES, *et al.*, 2012; ANDRADE, *et al.*, 2015).

A fermentação do permeado foi conduzida sob condições que propiciaram a maior produção de biomassa para obtenção da enzima, minimizando a produção de etanol. Para tanto, elaborou-se um planejamento experimental composto central para as variáveis de agitação, temperatura e suplementação com sais afim de otimizar a produção da enzima. As variáveis mantidas constantes foram a concentração de extrato de levedura, pH e concentração de lactose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial fermentativo da levedura *K. marxianus* utilizando permeado de soro de leite como substrato para produção de β -galactosidase.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a caracterização do permeado de soro de leite;
- ✓ Elaborar um planejamento experimental composto central para avaliar a influência das variáveis temperatura, agitação e suplementação com sais na produção de β -galactosidase ;
- ✓ Realizar a fermentação do permeado de soro de leite nas condições propostas no planejamento empregando a levedura *K. marxianus* para determinar a máxima atividade enzimática da β -galactosidase produzida.
- ✓ Realizar a fermentação do permeado de soro de leite com a levedura *K. marxianus* em biorreator a partir da melhor condição obtida nos experimentos propostos no planejamento e avaliar o comportamento da levedura frente às condições impostas.

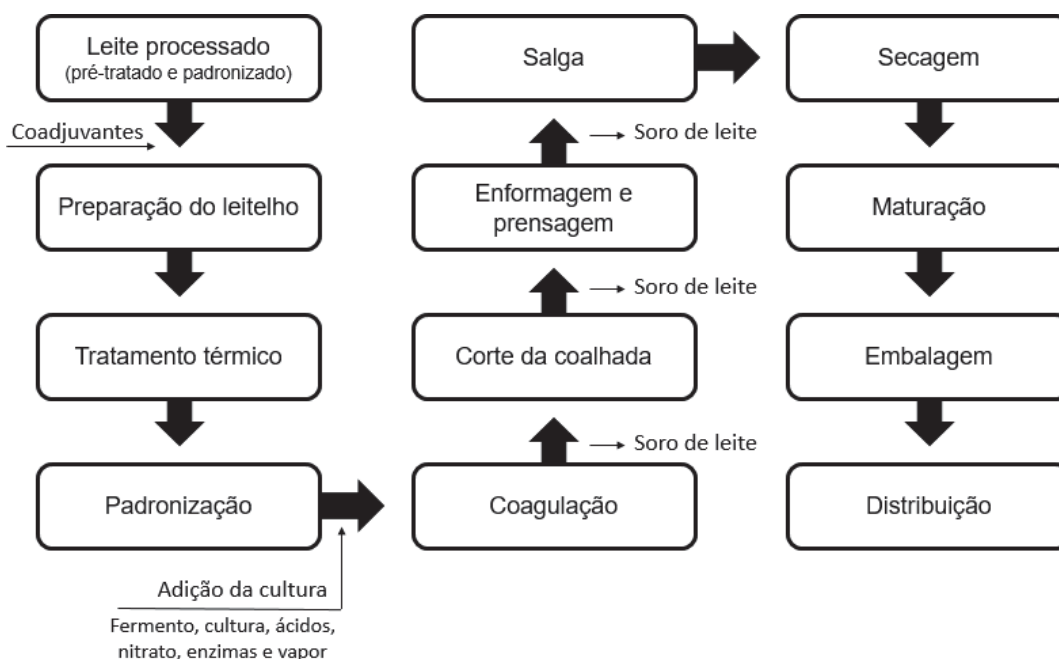
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Soro de leite

O soro de leite é um subproduto oriundo das indústrias de laticínios, obtido na fabricação do queijo (Figura 1), após a precipitação da proteína do leite pela caseína com consequente separação da gordura. Esse material constitui-se de um fluido opaco amarelo-esverdeado, rico em aminoácidos essenciais e vitaminas, como tiamina, riboflavina, vitaminas B₆ e B₁₂ e ácido pantotênico (TEIXEIRA, 2002; BALDASSO et al., 2011; ALVES, 2018).

Este coproduto de indústria de laticínio é composto por aproximadamente 93,1% de água, 3,73 – 5% de lactose, 3 - 2,52% de proteínas, 0,41 – 0,55 % de sais e 0,3 – 0,46% de gordura, com pH em torno de 5,5 a 6. Quando obtido o extrato seco, o soro apresenta cerca de 70 a 80% de lactose (BEUCLER, DRAKE, FOEGEDIND, 2005; VIGNAGA, 2017).

Figura 1 - Fluxograma de obtenção do soro de leite.



Fonte: Adapt. Burlani (2014).

Para a produção de 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite, sendo obtidos 9 litros de soro de leite (FLORÊNCIO, *et al.*, 2013). A nível mundial, a produção do soro é de 2,6 milhões de toneladas por ano, com um aumento estimado de 3% ao ano (FAOSTAT, 2017).

Cerca de 50% dessa produção não é reutilizada industrialmente e necessita de tratamentos para liberação no ambiente. A parte que é reaproveitada é incorporada em processos industriais na composição de alimentos, bebidas lácteas, sendo 45% na forma líquida, 30% na forma pulverizada e 15% como lactose bem como subprodutos delactosados e o restante como queijo (ALBIERO, 2013).

Dentre os maiores produtores de queijo no mundo, o Brasil ocupa o quinto lugar. Segundo informações da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIC), em 2013 a produção de queijo foi de 1,1 milhões de toneladas com 110 mil metros cúbicos de soro (KIENDL, 2005; BARBOSA, *et al.*, 2010; SCARCELLI, 2015).

Em relação a região oeste do Paraná, são produzidos por dia cerca de 1 milhão de litros de soro, 10% são destinados à alimentação animal e 90% vendidos à empresas, para serem incorporados em alimentos (ALBIERO, 2013).

Quanto ao soro que não é reutilizado, este se torna um resíduo e necessita de tratamento para ser liberado ao ambiente. Esse processo requer investimentos em equipamentos, mão-de-obra qualificada e espaço físico, o que encarece o processo, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estimativa dos valores para instalação de sistemas de tratamento de efluentes de laticínios que processam entre 80.000 e 120.000 litros dia⁻¹.

Sistema de tratamento	Valor R\$
Filtro Anaeróbico com filtro biológico e percolador	1.197.134,78
Filtro Anaeróbico com biofiltro aeróbico Submerso	766.928,84
Filtro Anaeróbico com disposição final dos resíduos do solo	690.315,04
Lodo ativado	665.116,60

Fonte: Gomes (2006); Burlani (2014).

Após tratamento, o soro é direcionado ao ambiente. Caso a demanda por oxigênio ainda seja elevada, o material afeta a estrutura físico-química do solo, diminui o rendimento das colheitas (PONSANO, PINTO, CASTRO GOMES, 1992), leva à instabilidade em sistemas de tratamento de esgoto e contamina a água subterrânea e superficial (GHALY, KAMAL, AVERY, 2003). Apesar dos esforços, os tratamentos empregados não são 100% eficazes, ou seja, não reduzem totalmente a matéria orgânica poluidora, atingindo apenas os níveis exigidos pela legislação.

O soro de leite apresenta uma elevada carga poluidora devido a alta demanda química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio, de respectivamente 50 a 102000 mg L⁻¹ e 30 a 50000 mg L⁻¹, sendo esta DBO dez vezes maior que a requerida pelo esgoto doméstico (PRAZERES, *et al.*, 2012; MAWSON, 1994; ANDRADE, *et al.*, 2015).

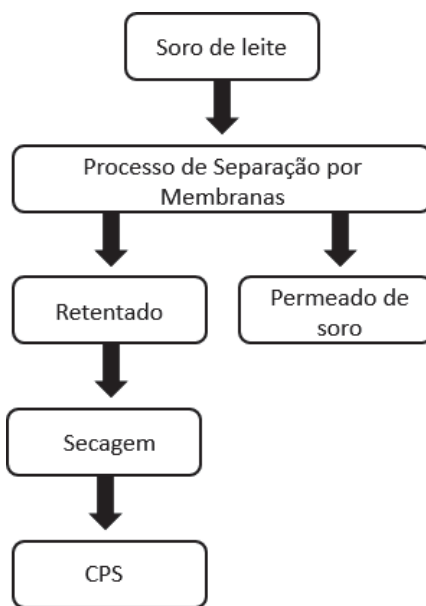
Para reduzir custos com tratamento de efluente e com possíveis contaminações ambientais, o soro pode ser reutilizado pela indústria. Para isso, dispõem-se da engenharia e biotecnologia como ferramentas para a valorização de resíduos. A partir de processos fermentativos, um microrganismo consome o substrato gerando produtos de interesse (ANDRADE, *et al.*, 2015). Com o soro de leite, resíduo em questão, pode-se produzir etanol – contribuindo para o ramo das energias renováveis –, aminoácidos, enzimas e outros compostos de interesse (BANSAL, *et al.*, 2008).

Outras alternativas para sua reutilização estão associadas à incorporação em alimentos, como na produção de sorvetes, bebidas lácteas, soro de ricota, alimentação animal e na formulação do *whey protein concentrated* (WPC) (BALDASSO, *et al.*, 2011). Entretanto, esse processo gera o permeado de soro de leite, um resíduo sem finalidade dentro da indústria.

3.2 Permeado de soro de leite

O permeado é um material líquido ou pó obtido no processo de ultrafiltração do soro de leite (Figura 2) (BRASIL, 2013).

Figura 2 - Fluxograma de obtenção do permeado de soro de leite.

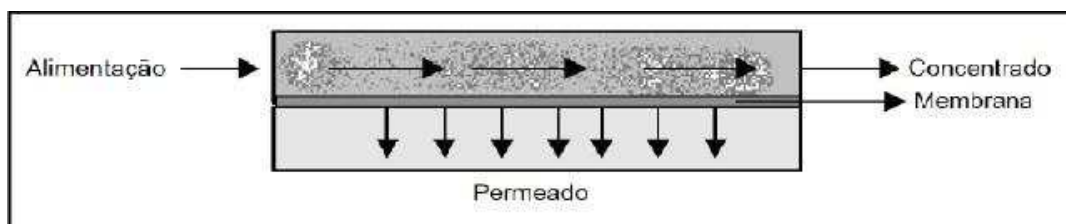


*CPS: Concentrado proteico de soro.

Fonte: Adapt. Hein (2015).

Nesta etapa, as membranas atuam como barreiras, permitindo apenas a passagem de partículas com tamanho, formato e características específicas (Figura 3) (HEIN, 2015).

Figura 3 - Processo de separação por membranas.



Fonte: Baldasso (2008).

A separação por membranas origina o retentado e o permeado. O primeiro, passa pela secagem e é utilizado na produção do concentrado proteico de soro (CPS).

Já o permeado não possui aplicação industrial e portanto constitui-se como um resíduo (BALDASSO, 2008; ZACARCHENCO, 2012).

O permeado é composto por aproximadamente 85 a 93% de água, 5 a 10% de lactose, 0,53 a 1% de minerais, 0,36 a 0,4% de gordura e 0,6 a 0,85% de proteínas. Na forma seca, essas concentrações são de 80 a 95% de lactose, 0,4 a 0,5% de sais minerais, 0,01 a 0,05% de gordura e 0,05 a 0,08% de proteína (BEUCLER, DRAKE, FOEGEDIND, 2005; BALLER, 2015; VIGNAGA, 2017).

A etapa de ultrafiltração é importante por que recupera proteínas com valor nutricional. Apesar disso, ela não reduz a DBO e DQO do efluente, que fica em torno de 80 g L⁻¹ a 60 g L⁻¹, respectivamente. Para que estes subprodutos possam ser lançados nos corpos hídricos, são necessário tratamentos específicos, que acarretam em custos adicionais para os laticínios (ANDRADE, MARTINS, 2002; BALDASSO, et al., 2009). Neste sentido, para reduzir o potencial poluidor bem como os gastos das indústrias com o tratamento dos seus resíduos, busca-se agregar valor ao subproduto.

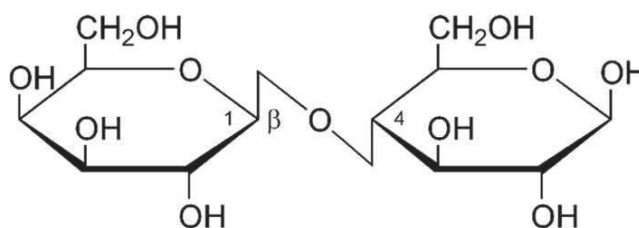
A produção de β -galactosidase a partir de resíduos a base de lactose pode ser feita pela levedura *K. marxianus*, a qual é capaz de metabolizar vários tipos de açúcares: D-xilose, rafinose, celobiose, L-arabinose, glicose, sacarose e a lactose (KREGGER- VAN RIJ, 1984; MARTINS, 2005). Simultânea a produção da enzima, o microrganismo também produz etanol, que constitui uma fonte de energia renovável. Além disso, de acordo com Rech (1998), essa levedura apresenta elevada taxa de crescimento e termotolerância (crescimento a 45 – 52 °C), com $\mu_{\text{máx}}$ de 0,49 e 0,61 h⁻¹ em soro de queijo para as cepas CBS 712 e CBS 6556, respectivamente. Já Scholz (2011) encontrou valor de $\mu_{\text{máx}}$ de 0,862 e 0,725 h⁻¹ para 30 °C, utilizando como fonte o soro de leite, milhocina e extrato de levedura para a cepa CBS 6556 (ABDEL-BANAT, et al., 2010)) (BRITO, 2015).

Entretanto, o permeado não apresenta todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento da levedura em questão. Em geral, as leveduras sintetizam as bases nitrogenadas necessárias ao seu crescimento a partir do íon amônio, de tal forma que o meio deve ser suplementado com este nutriente (HEIN, 2015).

3.3 Lactose

A lactose tem fórmula molecular $C_{22}H_{42}O_{21}$ e nomenclatura 4-O- β -galactopiranosil-D-glicose [β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose], sendo um dissacarídeo formado por α -D-glicose e β -D-galactose unidos por um ligação glicosídica do tipo β -1,4 glicosídica (CAMPBELL, 2000), conforme a figura 4.

Figura 4 - Estrutura da molécula de lactose.



Fonte: Mena (2015).

Para ser utilizada pela levedura *K. marxianus*, requer ativação de uma proteína transportadora de lactose e da produção da β -galactosidase, a qual catalisa a quebra da lactose em glicose e galactose (FIEDUREK, SZCZODRAK, 1994; HENSING, et al., 1994; FURLAN, et al., 2001).

Apesar de apresentar caráter polar, a molécula de lactose é pouco solúvel quando comparada aos outros açúcares, cerca de dez menos que a sacarose (BARBOSA, et al., 2010). Dessa forma, contribui para o efeito poluente nos recursos hídricos, ocasionando efeitos tóxicos aos peixes e laxativos em humanos (SOUZA JÚNIOR, 2004).

O consumo e a presença de lactose em alimentos pode apresentar alguns problemas. Em humanos, a insuficiência/deficiência de uma enzima análoga a β -galactosidase, a β -galactosidase-florizina hidrolase causa a intolerância e problemas de má digestão (SZILAGYI, 2002).

Quando consumido pelos seres humanos, a lactose também necessita ser hidrolisada em glicose e galactose. Esse processo ocorre na mucosa intestinal pela ação da enzima β -galactosidase (PERINI, 2013). Essa enzima está localizada na superfície do intestino delgado, um local chamado de borda em escova, um local revestido por microvilosidades. Após a hidrólise, os enterócitos (células vermelhas) da

membrana celular do intestino absorvem os monossacarídeos, de modo que a atividade enzimática e o tempo de passagem pela mucosa intestinal são importantes para a absorção adequada (SWAGERTY JR *et al.*, 2002).

Na indústria alimentícia, a lactose é responsável pela baixa doçura, solubilidade e cristalização da lactose em sorvetes e leite condensado. Além disso, os resíduos base desse dissacarídeo apresentam alta demanda química e bioquímica de oxigênio (AL-JAZAIRI *et al.*, 2015).

Para resolver esses problemas, opta-se pela hidrólise da lactose, esta que pode ser realizada por método ácido ou enzimático. Este último apresenta vantagens, pois as enzimas são catalisadores biodegradáveis, o que reduz os efeitos de corrosão do processo sobre os equipamentos e evita a formação de subprodutos indesejados, além de não requer etapas de desmineralização e descoloração. Destaca-se também o custo menor, visto que o método ácido necessita de uma estrutura resistente à condição de estresse químico, que encarece o processo (MARTINS, 2005; BARBOSA, ARAÚJO, 2007).

Essa etapa hidrolítica traz muitos benefícios para a indústria alimentícia, uma vez que o gasto com adição de sacarose na preparação de produtos açucarados é reduzido (ALVES, 2008). Além disso, a hidrólise aumenta a solubilidade e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar dos produtos. Dessa forma, possibilita a fabricação de novos produtos isentos ou com baixos teores de lactose, além de evitar a cristalização de produtos fermentados (PERINI, 2013).

Para otimizar e baratear esse processo, pode-se utilizar microrganismos que seja capazes de fermentar um substrato com baixo valor agregado, como os resíduos de laticínios. Para a obtenção da β -galactosidase pode-se empregar processos fermentativos utilizando microrganismos como *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus* que vem sendo estudados quanto ao potencial industrial (GEKA, LOPEZ-LEIVA, 1985; SHAIKH, KHINE, KHAN, 1997). Neste sentido, tem se destacado a levedura *K. marxianus*, que é capaz de utilizar a lactose como fonte de crescimento, produzindo a β -galactosidase (DINIZ, 2009)..

Porém, está levedura também metaboliza a lactose para a produção de etanol

tendo o seu crescimento inibido em concentrações de álcool próximas a 6% (v v⁻¹) (BRITO, 2015). Assim, essa é a principal barreira para o estabelecimento de um processo fermentativo industrial. Para produção de bioetanol, recomenda-se o emprego da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é mais tolerante ao etanol do que a *K. marxianus*, porém requer etapas de pré-tratamento, bem como a hidrólise (ALVES, 2018).

3.4 Leveduras

As leveduras são microrganismos eucariontes, sapróbios ou parasitas que utilizam o carbono orgânico como fonte de energia, fungos unicelulares não filamentosos esféricos ou ovais (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Esses seres apresentam vasta aplicação biotecnológica, na indústria de fermentação (vinhos, cerveja, pão), química (enzimas, pigmentos), farmacêutica (vacinas, probióticos, hormônios), na tecnologia ambiental (biorremediação, controle biológico e bioabsorção de metais, reutilização de subprodutos industriais) e nas pesquisas (biologia celular, molecular, bioquímica e genética) (HEISING *et al.*, 1994; WALKER, 1998; BELÉM, LEE, 1998).

Quanto à reprodução, as leveduras podem reproduzir-se assexuada ou sexuadamente. Na primeira, a célula-mãe forma um broto que se separa e dá origem a célula filha (separação formando pseudo-hifas), processo chamado de brotamento ou a levedura se divide e dá origem a duas novas células iguais, pela fissão (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Por outro lado, quando a levedura não se divide corretamente, devido a um fator estressante, há esporulação e conjugação, mitose e meiose (MARTINS, 2005).

Esses microrganismos apresentam um genoma pequeno, de até 15.000 kb, com poucos íntrons (sequência de nucleotídeos) e sequências repetidas. Os cromossomos são lineares e de diferentes tamanhos, formados por cadeias de fita dupla de DNA associadas às histonas (PEREZ-ORTIN, MATALLANA, FRANCO, 1989).

As leveduras são importantes por que são anaeróbicas facultativas. Elas utilizam oxigênio ou algum composto orgânico como aceptor final de elétrons, de modo que se houver oxigênio no meio, elas respiram aerobicamente e metabolizam açúcares, formando dióxido de carbono e água, e na ausência de oxigênio elas fermentam os açúcares produzindo etanol e dióxido de carbono (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Além disso, elas dispõem de vantagens genéticas e fisiológicas que possibilitam a utilização de resíduos industriais como meio de cultivo, para produção de biomassa, enzimas e proteínas heterológicas, por exemplo (MARTINS, 2005).

3.5 Microrganismos empregados na produção de β -galactosidase

Entre as espécies de microrganismos estudadas para a produção da β -galactosidase, pode-se empregar bactérias (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Xanthomonas*...), leveduras (*Bullera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*...) e fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizobium*, *Streptomyces*...) (GODOY, 2016).

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos estudados para produção de β -galactosidase. Entretanto, devido à sua patogenicidade ela não é empregada industrialmente. Leveduras e fungos dos gêneros *Kluyveromyces* e *Aspergillus*, respectivamente, são mais utilizados pois apresentam maior rendimento e produtividade, além de não serem patogênicos (OLIVEIRA, GUIMARÃES, DOMINGUES, 2011).

3.5.1 As leveduras *Kluyveromyces marxianus*

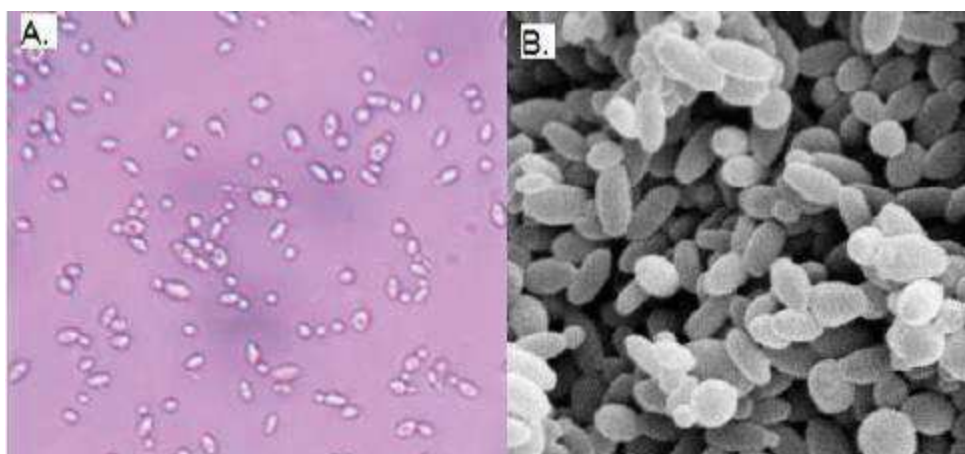
As *Kluyveromyces sp.* produzem β -galactosidases ideais para aplicações no tratamento de leite. Isso por que as enzimas produzidas estão adaptadas a uma faixa

de pH próximo do neutro, ideal para hidrólise da lactose, além de atuarem em ampla faixa de temperaturas, entre 40 a 52 °C (MANERA, et al., 2008; AL-JAZAIRI, et al., 2015; DINIZ, et al., 2014). Entretanto, a enzima produzida é intracelular, e desta forma, a lactose é transportada para o interior da célula por uma permease e ali ela é hidrolisada. Esse fato requer uma etapa adicional de lise celular para purificação da enzima, o que encarece o processo (OLIVEIRA, GUIMARÃES, DOMINGUES, 2011).

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são do tipo homotáticas, diplóides, com alto polimorfismo intra-específico e com número de cromossomos variando de 6 a 12. Podem ser encontradas em habitats como: grãos de Kefir, leite cru, queijos, néctar, insetos e solo, por exemplo (BELLOCH, et al., 1998).

A *K. marxianus* (Figura 5) é um fungo unicelular que pertence ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae, e também é conhecida como *Candida kefir*. Apresenta reprodução assexuada por brotamento multilateral e que produz ascóporos que se originam de um zigoto ou partenogenicamente (ALEXOPOULOS et al., 1996). Ela foi descrita a primeira vez como *S. marxianus*, em 1888 por E. C. Hansen (GABARDO, 2015) e atende por vários sinônimos: *S. kefir*, *S. fragilis*, *K. fragilis*, entre outros (MARTINS, 2005).

Figura 5 - Morfologia da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 em microscopia óptica, 100x.



Fonte: Tavares (2017).

Leveduras da espécie *K. marxianus* são utilizadas industrialmente pois são consideradas microrganismo do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*) nos

Estados Unidos e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) na União Europeia (SANTIAGO, et al., 2004). Isso significa que elas são aceitas pelo FDA (*Food and Drug Administration*), para seu emprego em indústrias farmacêuticas e alimentícias, pois essa classificação indica menor restrição em seu uso, o que favorece a aplicação biotecnológica (SCHAFFRATH, BREUNIG, 2000; FUKUHARA, 2005). Devido a estas características, são passíveis de diversas aplicações biotecnológicas, como por exemplo a produção de proteína celular, de componentes aromáticos, de etanol, redução da lactose em produtos lácteos, biorremediação e principalmente, hospedeiro para produção de proteínas heterológicas (DINIZ, 2009).

K. marxianus e *K. lactis* são leveduras que apresentam uma proximidade filogenética pois possuem um ancestral comum recente (LACHANCE, 2007). Análises bioquímicas e genéticas são necessárias para diferenciar os dois microrganismos, porém, a *K. lactis* é vista como um modelo alternativo à *S. cerevisiae*, enquanto a *K. marxianus* apresenta aplicabilidade industrial. Isso ocorre por que a *K. marxianus* possui elevada diversidade metabólica e grau de polimorfismo intra-específico (KURTZMANN, FEEL, 1998).

Além disso, devido ao fato de assimilar lactose, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* podem ser empregadas como recurso para o reaproveitamento de resíduos à base de lactose dos laticínios, como o permeado de soro de leite (SOUZA JÚNIOR, 2004; ALVES, 2008).

Essa levedura apresenta potencial para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pois é capaz de produzir enzimas de interesse no setor, como a β -galactosidase (HUSAIN, 2010). Além disso, desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, como a obtenção de leite com baixo teor de lactose, para consumo por indivíduos intolerantes e na prevenção da cristalização em produtos de laticínio (SANTIAGO, 2004; SHUKLA, 2013).

Outros biocompostos de interesse também podem ser produzidos pelas *K. marxianus*. Para tanto, têm-se as β -glicosidase, poligacturonases, compostos aromáticos como fenil-etanol (TAVARES, 2017) e inulinase (MENA, 2015).

O uso da *K. marxianus* oferece algumas vantagens em relação aos demais microrganismos, uma vez que esta apresenta um bom rendimento de crescimento, que tem um importante impacto econômico na indústria de alimentos e aceitabilidade

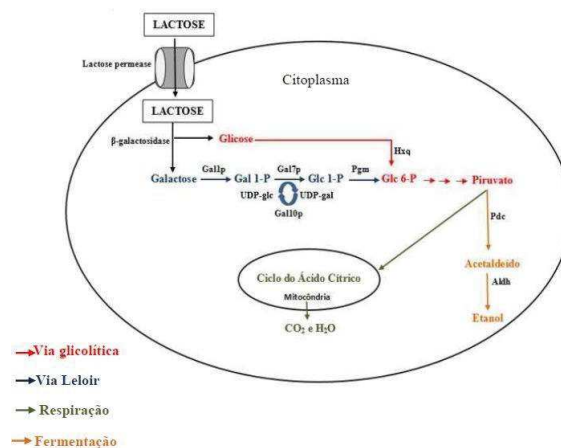
como um microrganismo seguro. Todas essas características são aspectos técnicos importantes quando se considera que os produtos fermentados têm aplicações alimentares ou farmacêuticas; maior atividade de β -galactosidase do que outras leveduras e crescimento em ampla faixa de temperatura (de 30 a 45 °C, com termotolerância de 40 a 45 °C, podendo se desenvolver até 52 °C) (MANERA, *et al.*, 2008; AL-JAZAIRI, *et al.*, 2015).

Além disso, ela apresenta elevada taxa de crescimento ($\mu_{\max} = 0.86 \text{ h}^{-1}$ para MARTINS, 2005 e $\mu_{\max} = 0.6 \text{ h}^{-1}$ para TAVARES, 2017), capacidade de assimilar grande variedade de fontes de carbono (celobiose, D-xilose, lactose, L-arabinose, rafinose e sacarose) e ampla faixa de pH (2.6 a 6) (TAVARES, 2017).

A *K. marxianus* também é capaz de converter lactose em etanol. Essa etapa requer a produção da enzima β -galactosidase, que hidrolisa a molécula de lactose em glicose e galactose, ambos carboidratos fermentescíveis pela levedura em questão. A levedura mais utilizada para fermentações alcoólicas, a *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de metabolizar a lactose presente no soro, e para isso, requer uma etapa adicional de hidrólise, que demanda tempo e custo.

A *K. marxianus* possui os genes LAC12 e LAC4, que codificam a permease de lactose e a enzima β -galactosidase, respectivamente (DICKSON, SHEETZ, LACY 1981; RILEY, DICKSON, 1984). A representação do metabolismo de lactose por leveduras do gênero *Kluyveromyces* pode ser compreendido pela Figura 6.

Figura 6 - Representação do metabolismo da lactose em leveduras do gênero *Kluyveromyces*.



Onde, Gal1p: galactoquinase; Gal7p: uridiltransferase; Pgm: fosfoglicomutase;

Hxq: hexoquinase; Pdc: piruvato descarboxilase; e Aldh: aldeído desidrogenase.

Fonte: Brito (2015).

Na levedura, a lactose é transportada pela permease do meio extracelular para o intracelular, sendo esta uma proteína de membrana facilitadora do tipo simporte, pois utiliza o gradiente de prótons em direção à célula para transportar os β -galactosídeos. Em seguida, a β -galactosidase hidrolisa a lactose em glicose, a qual segue para a via glicolítica, enquanto a galactose é metabolizada à glicose 1-P pela via de Leloir, para posteriormente ser convertida em glicose 6-P que entra na via glicolítica (SEIBOTH et al., 2007; SYRIOPOULOS et al., 2008).

Ao fim da glicólise, tem-se o piruvato, que dependendo das condições de cultivo, pode seguir pelo ciclo do ácido cítrico, que é totalmente oxidado a CO₂, ou entrar na via fermentativa, sendo reduzida a etanol (BAI, et al., 2008; PFEIFFER, MORLEY, 2014).

Os genes responsáveis pela síntese da β -galactosidase são organizados na forma de *operon*, e podem ser transcritos através de um único RNA mensageiro e traduzidos pelos ribossomos. Esse *operon* é chamado de *operon lac*, e é promovido pelo gene *lacP* e regulado pelo *lacO*, que são transcritos até serem reprimidos por uma proteína do gene *lacI*. Ele é constituído por três genes estruturais: *lacZ*, que codifica a β -galactosidase, o *lacY*, que controla a entrada da lactose na célula e o *lacA*, responsável pela produção da β -galactosídeo transacetilase, que transfere o grupo acetil do acetil-CoA para os β -galactosídeos (RECH, 1998).

A *K. marxianus* foi inicialmente classificada como fermentativa facultativa do tipo *Crabtree-negative* (GABARDO, 2015). Essa classificação determina que o microrganismo utiliza a fermentação para produção de energia na presença de altas concentrações de açúcar, mesmo na presença de oxigênio (aerobiose facultativa). Entretanto, a preferência pela via respiratória ou fermentativa depende da linhagem da *K. marxianus* e das condições de cultivo (WALKER, 1998; BELLAVER et al., 2004; FONSECA, CARVALHO, GOMBERT, 2013; LANE et al., 2011).

Entretanto, uma regulação ineficiente do metabolismo respiro-fermentativo pode fazer com que a *K. marxianus* produza etanol, pois como ela é capaz de produzir ATP, seu metabolismo é direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílicos ou para

fermentação alcoólica (VAN DIJKEN, WEUSTHUIS, PRONK, 1993). Isso faz com que ela seja como uma levedura respiro-fermentativa, e nesse caso, é capaz de realizar, simultaneamente, fermentação e respiração, e isso dependerá do equilíbrio entre essas duas vias.

A intensidade desse efeito varia entre as espécies de *Kluyveromyces*, e devido a isso, nem todas as cepas são boas produtoras de etanol, e portanto, a concentração de oxigênio no meio é um fator importante para o crescimento da levedura (TAVARES, 2017).

O etanol produzido pela *K. marxianus* pode afetar a produção da enzima β -galactosidase, uma vez que torna-se tóxico para a levedura (BRITO, 2015). A molécula de etanol age de tal forma que liga-se aos grupos polares dos fosfolípidios da membrana plasmática, fazendo com que a quantidade de água na estrutura se reduza e ocorra a desidratação (PATRA, *et al.*, 2006).

Isso afeta a integridade da estrutura, aumentando a permeabilidade e fluidez, o que leva a dissipação do potencial eletroquímico de membrana com a subsequente acidificação intracelular. De modo geral, o etanol causa alterações metabólicas e estruturais na levedura, e assim, inibe o crescimento e reduz a viabilidade celular (MA; LIU, 2010; VANEGAS *et al.*, 2012; PASCHOS, XIROS, CHRISTAKOPOULOS, 2015).

O transporte de aminoácidos e açúcares também é afetado pela presença do etanol, pois ocorre a redução da espessura da membrana (DICKE, YIM, FALLER, 2010). Além disso, espécies reativas de oxigênio são estimuladas pela presença desse metabólico e causam danos ao DNA, lipídios e proteínas. As enzimas hexoquinase e o piruvato quinase também são afetadas, pois têm suas conformações estruturais danificadas (ALEXANDRE, ANSANAY-GALEOTE, BLONDIN, 2001; LEI *et al.*, 2007; BLEOANCA *et al.*, 2013).

3.6 Enzimas

As enzimas são proteínas (com exceção das ribozimas, moléculas de RNA catalíticas) que agem como catalisadores de reações bioquímicas pois apresentam uma atividade específica. Elas são responsáveis por controlar processos de conversão de nutrientes em energia e tornar os processos bioquímicos mais

eficientes, acelerando-os (NELSON, COX, 2014).

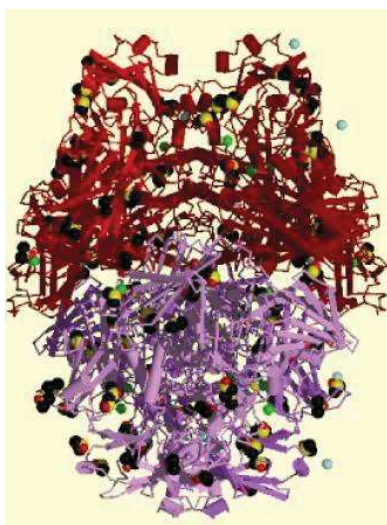
Para se determinar a fonte produtora de uma enzima deve-se considerar sua especificidade, pH, temperatura, estabilidade, ativação, inibição, disponibilidade e custo. Essa produção pode ocorrer a partir dos tecidos animais e vegetais, sendo as enzimas obtidas utilizadas *in natura* ou extraídas e purificadas do meio de cultivo (SILVA, FRANCO, 1999).

Esta última forma de obtenção é mais utilizada pois os microrganismos apresentam um ciclo curto de vida comparado aos vegetais, além do baixo custo de obtenção. O uso da biotecnologia para obtenção de compostos de interesse requer condições brandas de temperatura e pressão, os substratos a serem utilizados são de baixo custo e o tempo de produção é menor (MEDEIROS, 1999; SUKHAM FRANCO, 1999; HERNALSTEENS, 2006).

3.7 A enzima β -galactosidase

A β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) (Figura 7) é uma enzima conhecida como β -galactosidase , β -D-lactosidase além de nomes comerciais, como Maxilact, Hydrolact, Lactozym e Oryzatym, por exemplo (MARTINS, 2005).

Figura 7 - Estrutura tridimensional da β -galactosidase produzida por *Escherichia coli*.



Fonte: Martins (2005).

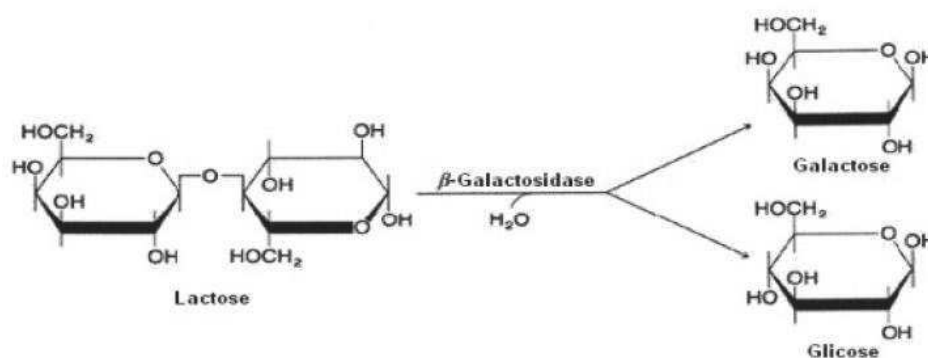
Ela pode ser encontrada em vegetais – amêndoas, pêsegos, damascos e maçãs –, nos animais – órgãos como intestino, cérebro, testículos, placenta – e produzida por fungos filamentosos, bactérias e leveduras (RICHMOND, GRAY, STINE, 1981).

O emprego de leveduras para a produção de β -galactosidase é o mais utilizado pois as enzimas produzidas apresentam boa estabilidade no tratamento de produtos lácteos com pH neutro (entre 6,5 e 7), como o soro doce. A atividade e estabilidade das enzimas são influenciadas pelas condições de cultivo do processo fermentativo (temperatura, pH, arejamento, agitação, tempo de incubação) e composição do meio de crescimento (FURLAN et al., 2001; HSU et al., 2005).

O peso molecular para uma enzima produzida por *K. marxianus* varia de 90000 e 201000 Daltons (Da). As β -galactosidases provenientes de fungos filamentosos e leveduras apresentam estabilidade a pHs e temperaturas ótimos entre 3,0 – 5,0 e 50 – 55 °C; 6,0 – 7,0 e abaixo de 40 °C (HOLSINGER, KLIGERMAN, 1991; ROBINSON, 1991).

A ação da β -galactosidase consiste em hidrolisar a molécula de lactose em glicose e galactose (Figura 8), moléculas que apresentam maior poder adoçante, maior solubilidade e maior facilidade de absorção pelo intestino (SOUZA JÚNIOR, 2004; ALVES, 2008). Dessa forma, ela é empregada na indústria alimentícia na elaboração de produtos lácteos sem lactose, para evitar a cristalização e textura arenosa, acelerar a maturação de queijos, essência para sucos, vinhos e caldas e dispensar a etapa de pré-evaporação em iogurtes, e na indústria farmacêutica, para indivíduos que apresentam intolerância a esse dissacarídeo (HUSAIN, 2010).

Figura 8 - Hidrólise da lactose pela β -galactosidase.



Fonte: Perini (2013).

Na indústria farmacêutica sua aplicação se dá na forma de medicamento. Como a enzima reduz o teor de lactose de produtos derivados, sua ingestão torna possível o consumo de lácteos a quem apresenta intolerância a lactose, também chamada de hipolactasia (RICHMOND et al., 1981; BANSAL, et al., 2008; ALVES, 2018).

Aproximadamente 65% da população mundial apresenta sinais e sintomas de má digestão da lactose (RODRIGUEZ et al., 2008; VUORISALO, et al., 2012; MATHÍUS, et al., 2016), devido à insuficiência ou deficiência da enzima β -galactosidase-florizin hidrolase, que é homóloga a β -galactosidase e está presente no jejuno (porção do intestino delgado entre o duodeno e o íleo) (SZILAGYI, 2002; SANTIAGO et al., 2004; CAMPBELL, WAUD, MATTHEWS,

2005). Essa doença pode ser congênita – determinada por um gene autossômico recessivo – ou causada por processos de gastroesterectomia, redução de intestino ou doenças relacionadas, em que o epitélio intestinal é comprometido (MARTINS, 2005; ALVES, 2008).

3.8 Importância da suplementação nutricional do meio de fermentação

Os processos fermentativos necessitam de um substrato como sacarose, glicose ou lactose que atuará como fonte de carbono, além de fontes de nitrogênio, fosfato e nutrientes em menor quantidades, como as vitaminas e minerais. Enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa, como é o caso da β -galactosidase. Neste tipo de fermentação o microrganismo é inserido no meio inóculo, onde ele se desenvolve sob condições controladas de pH, temperatura, agitação e aeração (WAINWRIGHT, 1995).

A fermentação do permeado de soro de leite requer suplementação para que as necessidades nutricionais da levedura sejam atendidas. Estudos relatam que o uso de extrato de levedura maximiza o rendimento em biomassa de *K. marxianus*, enquanto o uso de uréia não é significativo (MARTINS, 2005).

Diferentes cepas apresentam diferentes desempenhos na fermentação do substrato em questão, conforme abordado por Rech (1998), que verificou que a linhagem CBS 6556 foi descrita como capaz de consumir todo o açúcar do soro *in*

natura (70 gL⁻¹), enquanto a CBS712 não apresentou o mesmo rendimento. Para tanto, as condições que propiciaram o melhor rendimento foram pH 5,5 e temperatura entre 30 e 37 °C.

Há poucos relatos na literatura quanto à produção de β -galactosidase a partir do permeado de soro de leite. Assim, a Tabela 2 fornece um levantamento bibliográfico com os melhores resultados obtidos de atividade enzimática de β -galactosidase e as respectivas condições acerca da produção dessa enzima a partir de meios contendo lactose, em função de diferentes variáveis de processo fermentativo, como pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo.

Tabela 2 - Relação das variáveis pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo para trabalhos que utilizaram resíduo de laticínio como meio de cultivo de diferentes cepas de *K. marxianus* para produção de β -galactosidase.

Cepa	pH	T (°C)	Agitação (RPM)	Tempo (h)	Ativ. Enzimática	AUTOR
DIYS11	5	30	150	40	5075 U _{ONPG} mL _{cél} ⁻¹ min ⁻¹	Al-Jazairi <i>et al.</i> , 2015
	3	20	250	64	4997 U _{ONPG} mL _{cél} ⁻¹ min ⁻¹	
	6	25	200	52	4892 U _{ONPG} mL _{cél} ⁻¹ min ⁻¹	
	4	30	150	40	4756 U _{ONPG} mL _{cél} ⁻¹ min ⁻¹	
CCT 7082	6	30	180	120	10,7 U mL _{cél} ⁻¹	Manera, 2008
	6	30	180	96	10,6 U mL _{cél} ⁻¹	
CCT 7082	6	30	500	16	17 U mL ⁻¹	Alves, 2008
CCT 7082	7	30	180	48	1733,7 U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹	Manera, 2011
	5	30	180	48	1718,5 U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹	
CBS 6556	5,5	31	200	24	9,8 U mL _{cél} ⁻¹	Perini, 2013
CBS 6556	5,5	37	200	12	458,5 U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹	Rech, 1998
					441,8 U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹	

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Al-Jazairi, *et al.*, (2015) avaliaram a influência de concentração inicial de lactose, agitação, pH do meio, tempo de incubação e temperatura para produção de β -galactosidase em meio YPL (caldo de levedura, peptona e lactose). Todas as variáveis aplicadas demonstraram efeitos significativos positivos para a produção da enzima, maximizando a produção até determinado ponto, o qual, se ultrapassado, reduzia a atividade enzimática.

A levedura apresentou bom desenvolvimento em uma faixa de pH que variou de ácido para neutro e temperatura entre 20 e 30 °C. As diferentes combinações avaliadas proporcionaram valores de atividade enzimática semelhantes, e portanto, busca-se o menor tempo de cultivo para minimizar gastos.

Manera *et al.*, (2008) otimizaram o meio de cultivo para a produção de β -galactosidase utilizando *K. marxianus*. Os autores variaram a concentração de lactose, sulfato de amônio, extrato de levedura e pH por meio de um planejamento rotacional central e mantiveram fixa a concentração de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e de fosfato monopotássico (KH_2PO_4).

Para o resultado de atividade enzimática de $10,7 \text{ U mL}^{-1}$ empregou-se 55 g L^{-1} de lactose, 20 g L^{-1} de extrato de levedura e 7 g L^{-1} de sulfato de amônio, em pH 6 e 120 horas de fermentação. Já para a atividade de $10,6 \text{ U mL}^{-1}$ a composição do meio foi de $28,2 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, 17 g L^{-1} de extrato de levedura e $8,8 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) após 96 horas de fermentação.

Os autores verificaram que a combinação entre baixa concentração de lactose e alta de extrato de levedura proporcionava a máxima produção da enzima, em torno de $11-12 \text{ U mL}^{-1}$. Quando a concentração de lactose era alta e a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ era baixa, ou o inverso, verificou-se que a atividade estava acima de 8 U mL^{-1} . A produção da enzima atingiu valores de cerca de 10 U mL^{-1} quando a concentração de extrato de levedura foi alta (20 g L^{-1}) e $(NH_4)_2SO_4$ foi maior que 7 g L^{-1} .

As superfícies obtidas indicaram que alta atividade enzimática pode ser obtida ao usar meio de cultura com $28,2 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, 17 g L^{-1} de extrato de levedura e $8,8 \text{ g L}^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$, e esta foi a melhor condição obtida para a produção de β -galactosidase enzima por *K. marxianus* CCT 7082. Uma melhoria significativa da atividade da β -galactosidase foi alcançada com a otimização do meio de cultura, sendo quatro vezes maior do que em um meio não otimizado.

Alves (2008) avaliou a influência da agitação e aeração para produção da enzima, em meio contendo lactose, extrato de levedura, sulfato de magnésio heptahidratado e sulfato de amônio em pH 6. O autor verificou a influência positiva das variáveis estudadas na produção da enzima, obtendo o melhor resultado a 500 rpm e 1,5 vvm, com uma produtividade de 16 U mL^{-1} em 16 horas de fermentação e máxima produtividade de etanol ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) com 24 horas.

Manera *et al.*, (2011) avaliaram a produção de β -galactosidase em soro de queijo suplementado com água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de levedura Prodex-lac® e sulfato de amônio em pH variado. Com exceção da variável

pH, as demais demonstraram-se significativamente positivas no processo e os resultados elencados na Tabela 2 foram obtidos com 70 g L⁻¹ de lactose, 100 g L⁻¹ de AMM, 4 g L⁻¹ de Prodex-lac® e 48 horas de cultivo para ambos, pH 7 para o primeiro e 5 para o segundo e 0 e 10 g L⁻¹ de sulfato de amônio respectivamente.

A concentração de lactose, de AMM e o pH apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança; sendo os dois primeiros um efeito positivo (ao passar de nível houve incremento na atividade enzimática) e o terceiro um efeito negativo. As concentrações de Prodex-lac e (NH₄)₂SO₄ não apresentaram efeito estatisticamente significativo dentro das faixas estudadas.

A partir desses resultados, os autores elaboraram um delineamento composto central rotacional. Nele, trabalhou-se com a concentração de lactose, AMM e pH. Os melhores resultados foram obtidos com os pontos centrais, sendo eles 70 g L⁻¹ de lactose, 65 g L⁻¹ de AMM e pH 5, após 24 horas. Com isso, os autores demonstraram a importância da suplementação do meio de cultivo, principalmente pelo uso de fontes de nitrogênio.

Perini (2013) enriqueceu o soro de leite com AMM, variou a temperatura e manteve agitação em 200 RPM, durante 24 horas. O autor verificou que 14,36 g L⁻¹ de AMM, 820 mL L⁻¹ de soro e queijo e 31 °C foram as condições que contribuíram para a maior atividade enzimática (9,8 U mL⁻¹). Após essa determinação, avaliou-se a influência da agitação e aeração do cultivo, obtendo resultados significativos para 400 RPM e 2,67 vvm, apresentando uma atividade enzimática de 6,59 U mL⁻¹.

Rech (1998) utilizou soro de leite em pó (70 g L⁻¹), extrato de levedura (10 g L⁻¹) e ureia (10 g L⁻¹) como meio de cultivo. A autora variou pH e temperatura, mantendo a 200 RPM por 24 horas. A melhor velocidade inicial de crescimento foi obtida em pH 5,5 e não obteve-se resultados significativamente diferentes em relação às temperaturas empregadas, 30 e 37 °C, porém o emprego a 30 °C reduz custos e risco de contaminação em um processo industrial. A atividade máxima de β-galactosidase (≈ 5 U mL⁻¹) foi verificada com 30 horas e maior crescimento da levedura em meio com extrato de levedura enquanto a suplementação de ureia não mostrou-se significativa.

Deina (2018) avaliou por meio de um planejamento composto central as melhores condições de temperatura, pH, concentração celular e extrato de levedura

para produção de β -galactosidase e etanol. A autora trabalhou com temperaturas de 30, 34, 40, 46 e 50 °C, sendo à 40 °C os resultados ótimos e o máximo de atividade enzimática após 3 horas de cultivo. Para os resultados expostos na Tabela 2 utilizou-se pH 7 e 10 g L⁻¹ de extrato de levedura.

Santiago (2004) trabalhou com uma composição fixa de 6,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 5,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,6 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Manera (2008) utilizou como suplementação 1,2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 5 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,4 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Manera, et al. (2011) variou a concentração de sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄) em 0, 5 e 10 g L⁻¹, e constatou melhores resultados para a máxima quantidade, enquanto as concentrações de KH₂PO₄ e de MgSO₄.7H₂O foram fixadas em 5 e 0,4 g L⁻¹. Além disso, observou-se que a maioria dos trabalhos não variou a agitação, um parâmetro importante. Ela é fundamental em um processo fermentativo pois permite a homogeneização do meio e mantém o microrganismo em suspensão, o que favorece o consumo dos nutrientes pelo microrganismo bem como propicia a transferência de oxigênio da fase gasosa para líquida, em casos de fermentação aeróbia (PERINI, 2013).

Diante do exposto, pode-se elencar a importância da suplementação quando deseja-se otimizar a produção de β -galactosidase . Uma suplementação à base de fontes de nitrogênio como extrato de levedura e/ou uma composição de sais é essencial pois permite a disponibilidade de nutrientes importantes à levedura, como magnésio (cofator), fósforo (geração de ATP) e nitrogênio.

4. METODOLOGIA

O procedimento experimental foi realizado nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo.

4.1 Substrato

O substrato – permeado de soro de leite – foi coletado na empresa Sooro de Marechal Cândido Rondon.

Após a coleta, o permeado foi acondicionado em frascos de 1 litro a temperatura de $-8,0 (\pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C})$ em congelador vertical Bosch, Freezer 32 e descongelados conforme a necessidade a temperatura ambiente.

4.1.2 Caracterização do substrato

4.1.2.1 Açúcares totais medidos como lactose

Os açúcares totais medidos como lactose foram quantificados pelo método fenol-ácido sulfúrico, de acordo com Dubois (1956).

Elaborou-se uma curva padrão de lactose com diluições de 1:10 até 1:500. Em um tubo de ensaio pipetou-se 0,5 mL da amostra diluída, 0,5 mL de fenol 80% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado P.A.. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Spectroquant, Pharo 100 a 490 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com a amostra de permeado.

4.1.2.2 Umidade

A determinação da umidade foi realizada pela metodologia de secagem em estufa SOLAB, SL-100 a $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$, segundo o Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se o cadinho previamente seco em estufa e uma massa conhecida da amostra (aproximadamente 10 g). O conjunto foi mantido em estufa por 6 horas a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, levado ao dessecador por 15 minutos e pesado. O procedimento foi repetido até peso constante.

A umidade da amostra foi calculada pela equação 1:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_{cs} - m_v}{m_a} \quad (1)$$

Na qual,

m_{cs} : massa do cadinho com amostra seca (g);

m_v : massa do cadinho vazio (g);

m_a : massa da amostra.

4.1.2.3 Proteínas

A determinação de proteína foi realizada na empresa SOORO Concentrado Indústria de Produtos Lácteos por meio do método Dumas, pelo equipamento analisador elementar da marca LECO® modelo FP-528 por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) validado pela análise de proteínas pelo método de micro Kjeldahl, segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). A análise consiste na combustão, redução, separação e detecção realizada no próprio equipamento, calibrado com padrão conhecido de Rice Flour, também da marca LECO®

4.1.2.4 Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada pelo método Bligh-Dyer (1959), descrita a seguir.

Secou-se um béquer de 50 mL em estufa SOLAB, SL-100 a 100°C por 30 minutos. Após o término da secagem, acomodou-se o béquer em dessecador por 15 minutos e pesou-se em balança.

Pipetou-se 3 mL da amostra e transferiu-se para um béquer de 100 mL. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Homogeneizou-se com um bastão de vidro e agitou-se em agitador magnético por 30 minutos.

Adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de uma solução de sulfato de sódio 1,5%. Tampou-se o frasco e agitou-se por mais 2 minutos. Cessou-se a

agitação e aguardou-se a separação das fases. Descartou-se a camada superior com o auxílio de uma pipeta e filtrou-se o restante do material num funil pequeno com papel filtro. Mediu-se 5 mL do filtrado e despejou-se no béquer previamente tarado e resfriado. Deixou-se o béquer em estufa SOLAB, SL-100 a 80 °C até evaporação do solvente (30 minutos). Retirou-se o béquer da estufa, levou-o ao dessecador e pesou-se em balança analítica Shimadzu.

A quantidade de lipídios presente no material foi obtida pela equação 2.

$$\text{Teor de óleo} \left(\frac{\text{g}_{\text{óleo}}}{\text{mL}_{\text{amostra}}} \right) = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad (2)$$

Na qual,

M₁: Massa do béquer antes do procedimento;

M₂: Massa do béquer após o procedimento;

V: volume da amostra.

4.1.2.5 Sais minerais

Os sais minerais foram quantificados a partir da incineração em mufla Jung, 212 de 550 a 570 °C, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Pesou-se o cadinho previamente seco em estufa, adicionou-se aproximadamente 10 g da amostra e evaporou-se a água contida no material em estufa SOLAB, SL-100, a 65 °C. Após a evaporação, levou-se os cadinhos ao forno mufla por 5 horas, até a amostra constituir-se de cinzas brancas ou acinzentadas, e pesou-se o conjunto cadinho + amostra. A porcentagem de cinzas foi calculada pela equação 3.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_{cs} - m_v}{m_a} \quad (3)$$

Na qual,

m_{cs}: massa do cadinho com amostra seca (g);

m_v: massa do cadinho vazio (g);

m_a: massa da amostra.

4.1.2.6 Determinação de sólidos solúveis

A determinação de sólidos solúveis foi realizada pelo método de refração, o qual utiliza a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para isso, empregou-se um refratômetro digital MEGABRIX, RHB-32ATC. O resultado foi expresso em °Brixm que representa os sólidos dissolvidos na amostra. A calibração do refratômetro foi realizada utilizando água destilada.

4.1.2.7 Determinação do pH

O potencial hidrogênionico foi determinado utilizando o equipamento medidor de pH TECNOPON, RS 232, calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

4.1.2.8 Análise de DQO e DBO

A demanda química e bioquímica de oxigênio foi determinada para o permeado *in natura* em laboratório terceirizado, o Laboratório de Qualidade de água do GERPEL da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. A metodologia seguida para os procedimentos foi a SMEWW – 23º nd. 2017, método: 5220-D para DQO e SMEWW – 23º nd. 2017, método: 5210-B para DBO.

4.2 Microrganismo empregado

Para a produção de β -galactosidase utilizou-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (NCYC 587), da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP, fornecida pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Câmpus Cascavel.

O microrganismo foi mantido em meio de manutenção “Malt Extract Ágar Base” inclinado (extrato de malte 30 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹), a 4 °C, em geladeira Bosh, Style Single Door 34 com repiques a cada 2 meses (CAMARGO, 2016).

O microrganismo foi propagado em erlenmeyer de 125 mL com 100 mL de meio YPD (20 g L⁻¹ peptona, 10 g L⁻¹ extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de glicose). O procedimento foi executado em fluxo laminar Grupo Velco, a fim de evitar-se

contaminações na cepa. O cultivo foi mantido em incubadora Thoth, 6430 com agitação a 200 rpm, temperatura de 30 °C, por 16 horas. Após o término do cultivo, as células foram centrifugadas a 2000 RPM por 20 min, lavadas com água destilada estéril, centrifugadas novamente e ressuspensas em água destilada estéril. Após esses procedimentos, as células foram utilizadas como inóculo ou estriadas no meio inclinado para manutenção (CAMARGO, 2016).

Após a propagação celular, avaliou-se a viabilidade das células em câmara de Neubauer.

4.2.1 Curva de concentração celular

Após a propagação do microrganismo, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 100 mL de água destilada estéril, novamente centrifugadas, concentradas com 50 mL de água destilada estéril e realizou-se diluições para estabelecer uma curva padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis Spectroquant, Pharo 100 a 620 nm e a concentração celular foi calculada conforme a curva de calibração feita com peso seco (OLSSON, NIELSEN, 1997).

Para a elaboração da curva de peso seco centrifugou-se 10 mL da amostra de cultivo por 20 minutos, ressuspendeu-se em água destilada e filtrou-se a suspensão em sistema de filtração com membrana 0,45 µm, previamente pesada e seca em micro-ondas até peso constante. O conjunto membrana + material retido foi seco em micro-ondas a 100 W por 20 minutos (RECH, 1998). A concentração celular foi determinada pela equação 4.

$$C_{m\grave{a}e} = 1000 * \frac{(m_F - m_I)}{V} \quad (4)$$

Na qual,

m_F : massa da membrana + amostra (g);

m_I : massa da membrana (g);

V : volume de filtrado (mL).

A partir da Eq. 4 calculou-se a concentração celular de cada amostra diluída,

conforme a Equação 5.

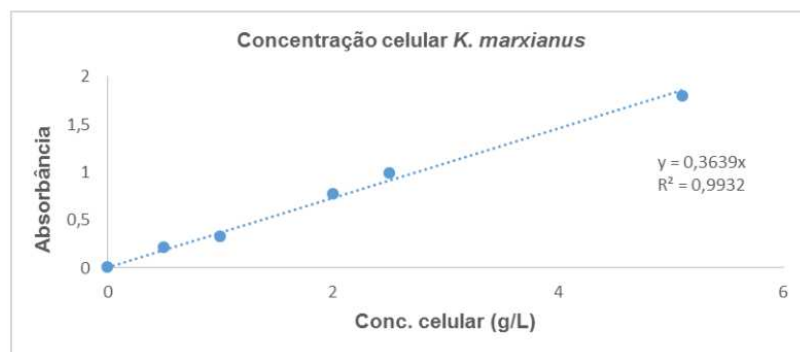
$$C = \frac{C_{\text{mãe}}}{F} \quad (5)$$

Na qual,

F: fator de diluição.

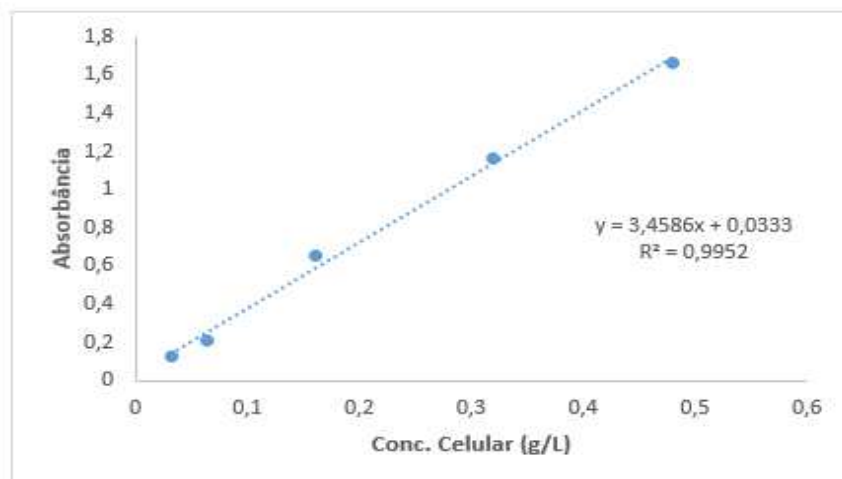
As curvas de concentração celular foram elaboradas para o crescimento da levedura em meio YPD e permeado de soro de leite suplementado com 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, conforme mostra a Figura 9 e 10, respectivamente.

Figura 9 – Concentração celular de *K. marxianus* ATCC 36907 cultivada em meio YPD.



Fonte: Autor (2019).

Figura 10 - Concentração celular de *K. marxianus* ATCC 36907 cultivada em meio com permeado de soro de leite e extrato de levedura.



Fonte: Autor (2019).

As Figuras 9 e 10 mostram a curva de concentração celular para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* em meio YPD e permeado de soro de leite e extrato de levedura. As equações de reta obtidas foram utilizadas para determinar a concentração celular de inoculação (2 g L^{-1}) e concentração celular no meio de cultivo para cálculo da atividade enzimática.

4.3 Planejamento experimental delineamento composto central rotacional DCCR

Elaborou-se um planejamento experimental composto central com 3 repetições no ponto central, avaliando os efeitos de temperatura, agitação e concentração de sais (sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosfato monopotássico KH_2PO_4 e sulfato de magnésio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Para a definição dos pontos centrais utilizou-se a Tabela 2 do item 3.8.

De acordo com a Tabela 2, a agitação varia de 150 a 250 RPM. Entretanto, os equipamentos *shakers* utilizados para os experimentos operam em até 200 RPM. Dessa forma e considerando os dados bibliográficos, optou-se por 150 RPM como nível central.

O tempo de cultivo será estabelecido a partir da realização de ensaios fermentativos com o permeado de soro de leite *in natura*, acompanhando o processo até a atividade enzimática reduzir-se. Nesse período será avaliado substrato ($^\circ\text{Brix}$) (item 4.1.2.6), crescimento celular (4.2.1) e atividade enzimática (4.4.1.2). A partir desses ensaios, o tempo de cultivo será determinado.

Considerando o exposto no item 3.8 referente à suplementação com a composição de sais, determinou-se como ponto central as seguintes concentrações: 10 g L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g L^{-1} de KH_2PO_4 e $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A partir dessas variáveis (Tabela 2), elaborou-se o planejamento experimental (Tabela 3) composto central com 3 repetições no ponto central, utilizando o software STATISTICA® 8.0.

Tabela 3 - Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas no planejamento experimental a nível de 10% de confiança.

Variáveis	Níveis				
	-1,67332	-1	0	+1	+1,67332
Temperatura (°C)	30	35	40	45	50
Agitação (RPM)	120	135	150	165	180
Mistura de sais					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	0	5	10	15	20
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	1	3	10	15	9
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Fonte: Autor (2019).

Tabela 4 - Matriz do planejamento composto central para a fermentação do permeado de soro de leite.

Ensaio	Temperatura	Agitação	Concentração de sais
1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1
3	0	0	0
4	-1	+1	+1
5	0	+1,67332	0
6	-1	-1	+1
7	0	0	+1,67332
8	+1,67332	0	0
9	+1	+1	-1
10	-1	+1	-1
11	0	0	0
12	+1	-1	+1
13	0	0	-1,67332
14	-1	-1	-1
15	-1,67332	0	0
16	0	0	0
17	0	-1,67332	0

Fonte: Autor (2019).

4.4 Ensaios fermentativos

O procedimento fermentativo foi realizado em erlenmeyers de 250 mL com volume de amostra de 100 mL, em incubadora Thoth, 6430, com uma concentração celular de 2 g L⁻¹.

Alves (2008) constatou que 17 g L⁻¹ de extrato de levedura conferiram maior valor de atividade enzimática, Rech (1998) trabalhou com uma concentração fixa de

10 g L⁻¹ e Santiago (2004) verificou que 12 g L⁻¹ contribuíram para os melhores resultados. Tendo em vista esses resultados, decidiu-se utilizar uma concentração fixa de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura.

Previamente à realização dos ensaios propostos pelo planejamento realizou-se um ensaio para identificação do ponto com maior atividade enzimática, com o objetivo de assim determinar o tempo total de cultivo. Esse ensaio foi chamado de ensaio controle e foi realizado no meio com permeado de soro de leite suplementado com 10 gL⁻¹ de extrato de levedura, 150 RPM e 30 °C, condições estas de preparo de inóculo.

4.4.1 Análise do processo fermentativo

4.4.1.1 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada por meio da coração das células, conforme Molinaro, Caputo, Amendoeira (2010). Pipetou-se do meio de cultivo uma alíquota de 0,1 mL e adicionou-se 0,4 mL de azul de metileno 1%. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo, transferiu-se para a câmara de Neubauer e realizou-se a contagem em microscópio BIOVAL. As células vivas são representadas na forma translúcida e as células mortas coradas de azul.

A viabilidade celular foi expressa pela Equação 6.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número total de células}} \quad (6)$$

4.4.1.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo). Em tubo de Eppendorf adicionou-se 780 μ L de tampão K e 110 μ L de amostra contendo a enzima. O tubo foi mantido em banho-maria BIOPAR, por 10 minutos a 30 °C. Em seguida, adicionou-se 110 μ L de ONPG 35 mM. Após 1 minuto interrompeu-se a reação com 220 μ L de carbonato de sódio Na₂CO₃ 1M. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm em espectrofotômetro UV-Vis Spectroquant, Pharo 100. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento, usando o meio no lugar da amostra. A atividade enzimática foi calculada realizado a partir da Lei de Lambert-Beer (equação 7) (RECH, 1998).

$$A = \epsilon_{\text{ONPG}} * L * C_{\text{ONPG}} \quad (7)$$

Na qual,

A: absorvância da amostra;

ϵ : coeficiente de extinção molar do ONPG ($\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$);

L: caminho ótico (cm);

C_{ONPG} : concentração de ONPG ($\mu\text{mol ml}^{-1}$).

Considerando a diluição da amostra que contém a enzima, temos a equação 8.

$$C_{\text{ONPG}} = \frac{A * V_f}{\epsilon_{\text{ONPG}} * L * V_a} * F \quad (8)$$

Na qual,

A: absorvância;

V_f : volume final do teste;

V_a : volume inicial da amostra;

F: fator de diluição.

A atividade enzimática volumétrica é determinada pela equação 9.

$$A_V = \frac{C_{\text{ONPG}}}{t} \quad (9)$$

Na qual,

t: tempo de reação (min);

A_V : atividade enzimática volumétrica em $U_{\text{ONPG}} \text{ mL}^{-1}$ (quantidade de μmoles de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação).

No caso da β -galactosidase, $t = 1 \text{ min}$; $V_f = 1,22 \text{ mL}$; $V_a = 0,11 \text{ mL}$; $\epsilon_{\text{onpg}} = 3,1 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ e $L = 1 \text{ cm}$, a atividade enzimática volumétrica fica de acordo com a Equação 10.

$$A_V = 3,576 * A * F \quad (10)$$

A partir da equação 10 calculou-se a atividade específica da β -galactosidase ($U_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$), através da Equação 11.

$$\text{Atividade enzimática específica } \left(\frac{U_{\text{ONPG}}}{\text{g}_{\text{cél}}} \right) = \frac{\text{Atividade enzimática volumétrica}}{X} \quad (11)$$

Na qual,

X: Concentração celular no fermentador em $\text{g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$.

4.5 Avaliação estatística

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram tratado estatisticamente (cálculo dos efeitos principais das variáveis juntamente com suas interações, a superfície de resposta e Análise de Variância (ANOVA)), a nível de 10% de significância, utilizando o software *STATISTICA* versão 8.0.

4.5 Ensaio fermentativo no biorreator

Após o tratamento estatístico verificou-se a condição do planejamento delineamento composto central rotacional que ofereceu as melhores condições para a obtenção da máxima atividade enzimática e aplicou-se ao biorreator. Portanto, os parâmetros de agitação, temperatura e concentração de sais foram determinados previamente pelos ensaios em erlenmeyers. As condições de pH, concentração celular e extrato de levedura foram mantidas em 7, 2 $\text{g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$ e 10 g L^{-1} .

No biorreator determinou-se a viabilidade celular (item 4.4.1.1), sólidos totais (4.1.2.6), pH, concentração celular (4.2.1) e atividade enzimática (4.4.1.2). Após o processo fermentativo destinou-se amostras do meio de cultivo para análise de DQO e DBO conforme o item 4.1.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do permeado de soro de leite

Os resultados obtidos para a caracterização do permeado são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização do permeado de soro de leite.

Parâmetro	Presente estudo	VIGNAGA, 2017	SOORO (base seca)
Umidade (%)	85,24	-	1,09
Lactose (%)	8,46	9,54	89,9
Lípidios (%)	0,03	<0,05	0
Sais inorgânicos (%)	2,96	0,94	5,6
Proteína (%)	<0,1	<0,1	3,45
°Brix	15	15,6	15
pH	6,62	6,3	6,42

Fonte: Autor (2019).

Conforme mostrado na Tabela 5, o permeado apresenta uma quantidade de sólidos totais de 15 °Brix, sendo que a lactose é a molécula mais representativa, com 8,46% (84,6 g L⁻¹). A presença desse carboidrato permite o uso do permeado de soro de leite como meio de cultura para o crescimento microbiano, pois a *K. marxianus* pode assimilar diferentes formas de carboidratos, entre elas a lactose (SANTIAGO, et al., 2004; PASSOS, 2014). Para tanto, a levedura consome o dissacarídeo presente no meio e converte em energia química para a célula, bem como os sais e o extrato de levedura que atuam como cofatores. O consumo dos nutrientes reduz a disposição de sólidos e conseqüentemente o número de °Brix. A lactose é hidrolisada à glicose e galactose, que são direcionadas para a via da glicose e via de Leilor, respectivamente. Ambas as vias podem convergir para a produção piruvato e posteriormente de etanol ou manutenção e crescimento celular (BRITO, 2015).

O material também é constituído por 0,03% de lípidios e <0,1% de proteínas. O baixo teor de lípidios e proteínas é resultante da eficiência do processo de concentração do soro de leite. Na primeira etapa ocorre a remoção da gordura por centrifugação e na segunda a retenção das proteínas por nano e ultrafiltração. Além disso, a baixa disponibilidade de proteínas é um fator importante pois altas

concentrações favorecem a formação de espuma durante o processo fermentativo.

Em relação ao teor de cinzas, com 2,96%, ele é representado em grande parte pelo cálcio (0,85%), potássio (1,85%) e fósforo (0,62%) (PASSOS, 2014). Os minerais presentes são considerados micronutrientes que fornecem energia química para a célula, atuando como cofatores para o crescimento microbiano (BALDASSO, 2008; ALVES, 2018; REGHELIM, RIGHI, 2018). A atividade das enzimas β -galactosidases isoladas das leveduras do gênero *Kluyveromyces* é influenciada pela presença de íons, como magnésio, sódio e potássio, que potencializam esse resultado. Já a presença de cálcio e metais pesados, como o potássio e chumbo causa redução e inibição da atividade enzimática (MLICHOVÁ, ROSENBERG, 2006).

O pH próximo do neutro favorece a adaptação da levedura bem como condições propícias para a estabilidade da enzima. As β -galactosidases produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam pH ótimo entre 6,5 e 7,0, ideal para aplicações que demandam o pH neutro, como o tratamento do leite (FREITAS, 2013; GODOY, 2016).

A Tabela 5 também apresenta a caracterização do permeado realizada por Vignaga (2017). A autora utilizou o permeado proveniente da mesma fonte que este trabalho, ou seja, fornecido pela empresa SOORO Concentrado. As diferenças verificadas para os valores de porcentagem de lactose, lípidios e sais minerais existem pois ambos materiais coletadas divergem quanto ao lote. Ou seja, a essência da matéria-prima é diferente, visto que varia conforme a época do ano, produtor e eficiência dos equipamentos.

As informações apresentadas na Tabela 5 na coluna referente ao produto em base seca foram fornecidas pela empresa SOORO. O material passa por um processo de secagem por *spray-drier* e é reconstituído em água para análise de °Brix e pH. As demais análises seguem procedimentos internos validados. Gabardo *et al.* (2015) realizou a análise centesimal da composição do permeado de soro de leite em pó proveniente da empresa SOORO com 92,4% de lactose, 1,8% de proteínas, 0,0% de gordura, 4,9% de sais minerais e 0,9% de umidade.

Stoliar (2009) realizou a caracterização do permeado em base seca e obteve os seguintes percentuais: 68-85% de carboidratos, 3-8% de proteínas, 1,5% de lipídeos, 8-20% de sais minerais. Smithers (2008) obteve em seus experimentos 89% de carboidratos, 2% de proteínas e 9% de sais minerais também para amostra em pó. Burlani (2014) apresentou a caracterização do permeado de soro de queijo fluído com

0,85% de proteínas, 0,36% de gordura, 93% de umidade, sendo que o pó reconsistituído apresentou pH de 6,11. Escobar, Souza e Lehn (2014) trazem o permeado fluído com a seguinte composição: 5% de lactose, 0,85% de proteínas, 0,53% de sais minerais, 0,36% de gordura e 93% de água.

A análise de DQO e DBO permitiu quantificar o permeado com 206300 mg L⁻¹ e 198000 mg L⁻¹, respectivamente. Esse valor encontra-se acima do relatado por Andrade, Martins (2002), Baldasso *et al.*, (2009), Prazeres *et al.* (2012) e Andrade (2015), de 50000 a 102000 e 30000 a 50000 mg L⁻¹ para DQO e DBO.

A caracterização do material permitiu identificar os componentes presentes e o seu potencial para utilização na geração de um produto de valor agregado. Devido a presença de lactose, esse resíduo é poluente e necessita de um tratamento prévio ao despejo no meio ambiente. Entretanto, a presença deste carboidrato pode ser utilizada pelo microrganismo para geração de energia, sendo empregado como substrato em processos fermentativos.

6.2 Experimentos do planejamento delineamento composto central rotacional DCCR.

A Tabela 6 apresenta os resultados de atividade enzimática em U_{ONPG} g_{cél}⁻¹ obtidos durante as 8 horas de fermentação do permeado de soro de leite, conforme o planejamento exposto nas Tabelas 3 e 4 do item 4.3. A Tabela 7 em anexo mostra os mesmos resultados porém em U mL⁻¹.

Tabela 6 - Atividade enzimática da β-galactosidase expressa por U_{ONPG} g_{cél}⁻¹ obtida durante 8 horas de fermentação em batelada do permeado de soro de leite com *Kluyveromyces marxianus* a partir do planejamento DCCR.

Ensaio	Atividade enzimática (U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹)							
	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
Controle	16,312	16,268	15,880	15,791	15,354	15,318	15,291	15,240
1	17,635	17,606	17,354	17,310	17,192	17,115	16,909	16,530
2	19,103	19,010	18,929	18,731	18,420	17,798	17,019	16,766
3	20,726	20,700	20,626	20,514	20,484	20,471	20,443	20,388
4	18,230	18,055	17,639	17,466	17,360	16,750	16,470	16,281
5	19,886	20,771	20,694	19,950	19,684	19,459	19,070	18,980
6	17,282	17,336	17,461	17,201	16,985	16,850	16,668	16,561
7	19,314	19,167	19,032	18,893	18,359	17,202	16,901	16,867

8	15,033	14,927	14,857	14,815	14,737	14,649	14,397	14,347
9	18,817	18,953	18,878	18,823	18,767	18,531	18,426	18,047
10	17,369	17,720	17,307	17,192	17,029	16,929	16,391	16,257
11	20,890	20,884	20,776	20,714	20,675	20,645	20,590	20,513
12	19,766	18,880	18,585	18,313	18,255	18,186	17,332	17,087
13	17,483	16,434	15,735	15,494	16,212	15,271	13,900	12,780
14	16,303	16,317	16,120	15,967	15,914	15,791	15,715	15,568
15	16,685	16,257	15,781	15,491	15,457	15,040	14,672	14,619
16	20,879	20,831	20,687	20,638	20,610	20,567	20,539	20,445
17	19,279	19,011	18,643	18,513	18,284	18,128	17,799	17,763

*Os Valores em negrito correspondem aos valores máximos de AE identificados por cultivo.

Pela análise da Tabela 6 pode-se verificar que apesar de alguns ensaios apresentarem valores de atividade enzimática superiores a outros, apresentou-se uma constância dos resultados ao longo de 8 horas. Isso indica que as condições do meio de cultivo são propícias para a atividade hidrolítica da enzima para a lactose.

A Tabela 6 mostra que para o ensaio controle, após 1 hora da inoculação da levedura atingiu-se o pico máximo de atividade enzimática ($16,312 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$). Deste modo, acompanhou-se por 8 horas os ensaios com o objetivo de verificar diferentes comportamentos de acordo com as condições do planejamento.

Os ensaios que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática, em ordem decrescente foram os ensaios 11, 16, 5 e 3. O ponto central do planejamento foi representado pelos experimentos 3, 11 e 16, a 40°C , 150 RPM e 10 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de sulfato de amônio, 5 g L^{-1} de fosfato de potássio dibásico e $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado. Esses experimentos alcançaram seus melhores resultados com 1 hora de fermentação, com atividades de $20,726$, $20,890$ e $20,879 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$, respectivamente (correspondente a $10,285$, $10,245$ e $10,240 \text{ U mL}^{-1}$). O ensaio 5 na condição de 40°C , 180 RPM e 10 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de sulfato de amônio, 5 g L^{-1} de fosfato de potássio dibásico e $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado obteve $20,771 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$ ($10,208 \text{ U mL}^{-1}$) após duas horas de inoculação.

Os resultados obtidos para atividade enzimática mostraram-se constantes e variam entre 16 e $20 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$ ($7 - 10 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ mL}_{\text{cél}}^{-1}$). Esses valores mostram-se próximos aos de Manera (2008) – $10,7$ e $10,6 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ mL}_{\text{cél}}^{-1}$, e Perini (2013) – $9,8 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ mL}_{\text{cél}}^{-1}$, porém inferiores aos de Manera (2011) – $1733,7$ e $1718,5 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$ e Rech (1998) – $458,5$ e $441,8 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$, conforme a Tabela 2 do item 3.8. Entretanto, deve-se considerar as diferentes origens e composição do substrato

utilizado (lote do produto e fornecedor), a concentração de lactose, o tipo de cepa, controle de pH do meio, os métodos utilizados para determinação da atividade enzimática, a existência de métodos de extração prévios e o tempo de acompanhamento da fermentação, que foi superior a 12 horas para os trabalhos citados. A Tabela 8 mostra a viabilidade celular após 1 e 8 horas de fermentação.

Tabela 8 - Viabilidade celular de *Kluyveromyces marxianus* após 1 e 8 horas de fermentação do permeado de soro de leite em batelada.

Ensaio	Controle		1		2	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	43,546	45,115	60,700	54,760	51,620	51,862
Ensaio	3		4		5	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	49,418	51,413	53,946	52,935	59,674	58,003
Ensaio	6		7		8	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	52,895	55,495	52,257	54,666	48,954	54,987
Ensaio	9		10		11	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	53,474	54,873	53,274	55,959	54,570	56,187
Ensaio	12		13		14	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	52,895	54,160	45,208	46,353	52,786	54,549
Ensaio	15		16		17	
	1h	8h	1h	8h	1h	8h
Viabilidade celular (%)	49,647	49,030	57,280	58,873	50,881	52,915

A Tabela 8 mostra que a viabilidade celular do cultivo manteve-se entre 43 e 59%. A concentração celular média obtida a partir das curvas de crescimento celular da Figura 9 e 10 após 8 horas apresentou-se entre 0,45 e 0,5 g_{cél} L⁻¹, visto que o cultivo iniciou com uma concentração de 2 g L⁻¹. Isso indica uma difícil adaptação da levedura ao meio, o que significa uma alta taxa de morte celular e dessa forma, o meio de cultivo não propiciou condições adequadas para o crescimento celular.

A falta de nutrientes essenciais ao metabolismo da levedura pode ter sido responsável pela baixa viabilidade celular, como citado por Santos (2008). O nitrogênio atua como constituinte de aminoácidos, proteínas, enzimas, purinas, piridinas e vitaminas, e a sua má absorção pode acarretar no decréscimo da

concentração celular. As fontes de nitrogênio utilizadas, extrato de levedura e sulfato de amônio podem não ter sido assimiladas de forma eficaz pela levedura, de modo que outras fontes devem ser testadas.

Como suplementação de nitrogênio sugere-se a amônia inorgânica na forma de uréia ou a água de maceração de milho, uma fonte orgânica. Yadav *et al.* (2014) estudou a fermentação do soro de leite com *K. marxianus* e verificou que a falta de fontes de nitrogênio facilmente assimiláveis foi a responsável pela baixa concentração celular do cultivo ($1,27 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$). Para contornar esse problema, os autores testaram diferentes concentrações de uréia e verificaram que a adição de uréia 0,22% (p/v) otimizou em 10% o rendimento de biomassa. Aliado à suplementação incorreta, os autores retomam que a diminuição do rendimento de biomassa também é causada pelo emprego de condições de alta temperatura (acima de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e baixo pH (inferior a 3,5). Altas temperaturas combinadas com pH ácido requerem maior energia para manutenção, desviando maior quantidade de energia para o catabolismo.

Já a água de maceração de milho (AMM) foi a suplementação utilizada por Manera, *et al.* (2011) na produção de β -galactosidase por *K. marxianus* CCT 7082. Os autores obtiveram o maior resultado de atividade enzimática de $1400 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$ com 70 g L^{-1} de lactose, 65 g L^{-1} de AMM, 4 g L^{-1} de extrato de levedura e pH 5, a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 RPM e 10% (v v^{-1}) de inóculo. A AMM é um co-produto da indústria de extração do milho e portanto a sua utilização em substituição do extrato de levedura reduz custos e propicia aumento da atividade enzimática (FARIAS, 2015).

Santos (2008) e Chavéz (2008) explicam que vitaminas também são importantes em um cultivo celular, como tiamina, ácido pantotênico e vitaminas do complexo B (riboflavina, ácido fólico, biotina e niacina, por exemplo). Além disso, os micronutrientes agem como cofatores enzimáticos (enxofre, magnésio, manganês, zinco, entre outros) e desempenham função estrutural (potássio e manganês, por exemplo).

Borges *et al.* (2009) avaliaram o efeito da suplementação de casaminoácidos (aminoácidos e peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína) (0,1%) sobre o crescimento celular de *K. lactis* em soro de leite ultrafiltrado. Os autores verificaram maior crescimento celular no meio suplementado, com um incremento na velocidade específica de $0,32 \text{ h}^{-1}$ para $0,38 \text{ h}^{-1}$, com uma fase exponencial de 10 a 16 horas de cultivo. A atividade enzimática para β -galactosidase também sofreu acréscimo, sendo a máxima obtida de $116,2 \text{ U mL}^{-1}$ com 16 horas contra aproximadamente 85 U mL^{-1}

para o meio sem suplementação.

No presente estudo a fonte de vitaminas utilizada foi o extrato de levedura, porém não realizou-se uma quantificação das vitaminas bem como teores presentes. Lopes (1989) explica que as formas de nitrogênio mais facilmente assimiladas pelas leveduras são os aminoácidos, como o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a leucina e a fenilalanina. Dessa forma, sugere-se a análise das vitaminas necessárias para o metabolismo de β -galactosidase em *K. marxianus* e a adição das mesmas em meio de cultivo.

Os sais utilizados, fosfato de potássio, sulfato de amônio e sulfato de magnésio heptahidratado também afetaram o rendimento celular. O fósforo é responsável pela constituição do ATP, ADP, AMP, síntese de ácidos nucleicos do DNA e RNA e de fosfolípidios da membrana plasmática e o enxofre está presente na síntese das proteínas e como constituinte de coenzimas (NICOLAU, 2014). O magnésio atua como ativador de enzimas que transferem fosfatos, o nitrogênio é utilizado na constituição protoplasmática e de nucleotídeos e o potássio auxilia no controle de leveduras e bactérias contaminantes (AMORIM, 1977).

Entretanto, concentrações elevadas de sais podem ser causar morte celular, pois compostos inorgânicos podem tornar-se tóxicos para os microrganismos, inibindo o crescimento microbiano ou afetando vias metabólicas essenciais. Dubois (1976) explica que o íon amônio pode inibir a permease responsável pelo transporte de aminoácidos no plasma e Surdin *et al.* (1965) constataram que o íon amônio inibe a absorção de aminoácidos e em sua forma comercial inibe a utilização de alguns aminoácidos do meio. Burkholder *et al.* (1944) explica que a mistura de aminoácidos é uma fonte de nitrogênio mais eficiente do que o sais de amônio, sendo que o consumo do nitrogênio amínico é 50% mais rápido que o nitrogênio da amônia. Para evitar esse problema, sugere-se a análise isolada da influência de cada composto inorgânico na fermentação para produção de β -galactosidase, afim de determinar-se as concentrações tóxicas e a partir disso obter-se uma suplementação ideal para a levedura.

Nobre (2005) explica que substâncias tóxicas presentes no meio ou produzidas pelos próprios microrganismos podem ser as responsáveis pela morte celular e/ou baixo desenvolvimento do cultivo. A contaminação do meio por outras leveduras pode levar à uma competição pelo substrato, que também reduz a viabilidade celular. Leveduras que têm seu metabolismo direcionado para a produção de etanol podem

ter seu crescimento inibido quando este não é produzido, além de que a presença de ácidos orgânicos no substrato também reduz a utilização dos carboidratos e aumenta a acidez, como apontado por Vignaga (2017), que relatou a presença de 2,21% de ácido cítrico, 0,93% de ácido lático, 0,61% de ácido málico e níveis inferiores a 0,10% para o ácido glutâmico e ácido carboxílico pirolidona.

Outro fator importante diz respeito ao inóculo. Apesar da análise de viabilidade celular satisfatória, a célula pode ter sido incorporada no meio de cultivo fora da fase exponencial, que compreende o estado do microrganismo em crescimento celular (BASTOS, 2015).

Souza *et al.* (2018) realizaram a suplementação do soro de queijo com sulfato de amônio para crescimento celular. Os autores verificaram as quatro fases de crescimento do microrganismo, compreendendo a fase *lag* as primeiras 4 horas, a fase exponencial da 4^a a 10^o hora, a fase exponencial da 4^a a 10^a hora, a fase estacionária da 10^a a 12^a hora e a fase de declínio ou morte celular após a 12^a hora.

Devido a drástica redução da concentração celular e posterior manutenção ao longo de 7 horas, acredita-se que a célula encontrava-se no final dessa etapa, próxima da fase de declínio ou morte celular. Para contornar esse problema, deve-se avaliar o inóculo quanto as características de crescimento celular afim de identificar a fase exponencial e realizar a inoculação neste instante.

O pH do meio também pode ter afetado a atividade enzimática, visto que causa a desnaturação protéica da enzima. O pH não foi controlado para os ensaios em *shaker*, de modo que após a suplementação e tratamento térmico em autoclave este encontrava-se em torno de 4,5-5. Freitas (2017) explica que β -galactosidases apresentam um pH ótimo próximo do neutro, Falleiros (2016) obteve uma atividade específica máxima para a cepa ATCC 46537 de 35,535 U mg_{proteína}⁻¹ para pH 7,0 e Al-Jazairi (2015) demonstrou que a máxima atividade enzimática foi obtida em pH 3,0 para a cepa DIYSI 11. Isso mostra que a estabilidade da enzima frente ao pH depende não só das condições de cultivo, mas também da cepa.

Outro fator que deve ser considerado é a possível inibição de reações essenciais do metabolismo. Inicialmente, a levedura necessita realizar a hidrólise da molécula de lactose para que esta possa ser incorporada no metabolismo celular e ser convertida em energia química. Portanto, a célula utiliza a energia existente para a produção de β -galactosidase, que realizará a conversão de lactose em glicose e galactose. Neste instante, há grande quantidade dos dois monossacarídeos

disponível no meio, que deve ser convertida a etanol. Entretanto, a célula precisa manter-se e multiplicar-se. Essas atividades dependem exclusivamente da via glicolítica, que é altamente regulada.

A hexoquinase, enzima responsável pela fosforilação da glicose sofre inibição alostérica (liga-se a enzima em um local diferente do sítio ativo) pelo produto, a glicose-6-fosfato, que também é um produto do metabolismo de galactose pela via de Leilor (BRITO, 2015). Desse modo, a enzima para de funcionar quando há uma quantidade significativa desse componente e permanece inativa até que o nível dessa molécula se reduza (NELSON, COX, 2014).

Outro ponto de regulação importante da via ocorre na conversão de frutose-6-fosfato para frutose-1,6-bifosfato, catalisada pela fosfofrutoquinase-1. Essa enzima requer magnésio como cofator, e sua atividade pode ser aumentada ou reduzida de acordo com a quantidade desse íon no meio. Além disso, a atividade é estimulada pela presença de ADP e inibida quando há excesso de ATP, citrato e isocitrato, metabólitos do Ciclo de Krebs (em caso de altos níveis de AcetilCoA). A presença de AMP, ADP e frutose-6-fosfato estimulam a enzima, enquanto a alta relação ATP/ADP (aerobiose) causa inibição (NELSON, COX, 2014).

A piruvatoquinase, enzima responsável pela conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato também sofre inibição alostérica. Em altas concentrações de ATP a afinidade da enzima pelo substrato é reduzida e pode ser inibida pela presença de acetilCoA e ácidos graxos de cadeia longa. Desse modo, sempre que a célula dispõe de uma concentração de ATP alta, a glicólise é inibida pela ação da fosfofrutoquinase ou da piruvatoquinase (NELSON, COX, 2014).

Assim, como no início da fermentação a taxa de conversão de lactose em glicose e galactose é alta, pode ocorrer o acúmulo dos metabólitos intermediários. Com a inibição, a célula não consegue energia suficiente para seu crescimento e manutenção, o que leva a morte celular. Os níveis mantem-se após drástica redução, de modo que a célula consegue novamente reatar as funções normais do metabolismo. Nessa situação, a fermentação deve se estender por mais tempo, de modo a permitir que o microrganismo possa se restabelecer e consumir os produtos da via glicolítica, gerando ATP para as atividades seguintes.

A disponibilidade de oxigênio também afeta o metabolismo da levedura. A *K. marxianus* é uma levedura aeróbia estrita, ou seja, não cresce na presença de glicose e ausência de oxigênio, sendo que todo o piruvato é destinado ao ciclo do ácido

tricarboxílico (Ciclo de Krebs). Entretanto, o excesso de lactose pode inibir a respiração, pois esta encontra-se saturada, e esse fenômeno é chamado de *Crabtree*. Esse fenômeno apresenta-se em dois efeitos, o *short-term* também conhecido como efeito negativo e o *long-term*, efeito positivo, e são decorrentes da baixa eficiência respiratória em metabolizar o piruvato, efeito de ácidos orgânicos no desacoplamento da cadeia respiratória e capacidade limitada da acetil-CoA sintetase (DINIZ, 2009; PEREIRA, et al., 2014).

A *K. marxianus* apresenta o efeito negativo, ou seja, ocorre a produção de etanol por um curto período de tempo em aerobiose (início do processo fermentativo com restrição de oxigênio). Dessa forma, a célula necessita hidrolisar a molécula de lactose e então produz a β -galactosidase paralela à produção de etanol na presença de oxigênio. Isso explica a atividade enzimática constante nas primeiras 8 horas de fermentação e a baixa concentração celular, pois a célula direciona o metabolismo para produção β -galactosidase e etanol e não para crescimento celular (DINIZ, 2009; PEREIRA, et al., 2014).

Além dos fatores já citados, a temperatura também afeta o desempenho do microrganismo, sabendo que sua condição ótima está em torno de 40° C. De acordo com Vargas (2017), o emprego de uma temperatura acima da ótima pode causar a redução da velocidade de crescimento das leveduras, e conseqüentemente a morte celular. Quando existe a produção de etanol o aumento da temperatura é proporcional ao aumento do efeito inibitório dessa substância, pois a velocidade de produção deste metabólito é mais alta que a velocidade de difusão deste produto através da membrana das células. Apesar do tempo de cultivo ter sido curto, pequenas concentrações de etanol produzidas podem ter causado a inibição de células no cultivo.

Burlani et al. (2014) avaliou a produção de etanol a partir do permeado de soro de queijo *in natura* utilizando diferentes linhagens da levedura *Kluyveromyces spp.* A caracterização do permeado permitiu identificar 0,82% de proteínas, 0% de lipídios, 0,32% de cinzas, 94,62% de umidade, 65,98 g L⁻¹ de lactose e pH 6,11. O autor verificou que nas 5 primeiras horas da fermentação do permeado de soro de queijo em pó reconsistuído em água e autoclavado a 37 °C, 150 RPM, pH entre 4,5 e 4,8 e com 10% (v v⁻¹) de inóculo o crescimento celular para as cepas de *K. marxianus* ATCC 46537 e ATCC 12424, foi em torno de 0,5 g_{cél} L⁻¹ produzindo 12,6 g L⁻¹ de etanol (para 32 horas) e para ATCC 16045 10,4 g L⁻¹ de etanol (para 24 horas) finalizando o cultivo

após 52 horas com $3,55 \text{ g L}^{-1}$. O autor não avaliou a produção de β -galactosidase mas a concentração celular alcançada no cultivo em 5 horas é coerente com a deste trabalho, além de que a produção de etanol indica que durante o processo fermentativo houve produção enzimática para conversão da lactose em glicose e posterior fermentação a etanol.

Já as cepas ATCC 16045 e ATCC CBS 6556 alcançaram aproximadamente $0,2 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$, e após 52 horas de fermentação não atingiram uma produção de etanol de 1 g L^{-1} . Entretanto, a cepa ATCC 16045 alcançou $3,91 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$ e a ATCC 24176 $3,4 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$ com 52 horas, porém não produziu etanol. O autor explica que a produção da biomassa pode estar relacionada com a utilização dos nutrientes do meio para o crescimento celular, e não para produção de etanol. Considerando isso e a baixa concentração de lactose ($86,4 \text{ g L}^{-1}$), para os experimentos realizados neste trabalho a levedura pode ter direcionado energia para produção de β -galactosidase e não para crescimento celular, o que explica a baixa viabilidade celular.

Falleiros (2016) trabalhou com a produção e caracterização de β -galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 em permeado de soro de leite suplementado com extração por vortex e ultrassom. A autora verificou um maior crescimento celular em meio contendo altas concentrações de lactose proveniente do permeado de soro em pó, de 100 a 150 g L^{-1} , extrato de levedura inferior a $6,26 \text{ g L}^{-1}$ e entre 2 e 8 g L^{-1} de sulfato de amônio, com aproximadamente $35 \text{ U mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ iniciando com $1 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 120 RPM , 24 horas e $\text{pH } 7$. A análise estatística mostrou que o aumento da concentração de lactose apresentou influencia positiva no aumento da atividade enzimática, enquanto o aumento das concentrações de extrato de levedura e sulfato de amônio implicou em menores resultados.

Santiago *et al.* (2004) estudou a produção de β -galactosidase na fermentação do soro de queijo com *K. marxianus*. O maior valor de atividade enzimática alcançado foi de 28 UGI mL^{-1} (μmol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática) e $5,3 \text{ g}_{\text{cél}} \text{ L}^{-1}$ com fermentação do soro de queijo em pó reconstituído com 50 g L^{-1} de lactose, 12 g L^{-1} de extrato de levedura, 6 g L^{-1} de sulfato de amônio, 5 g L^{-1} de fosfato de potássio dihidratado e $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 RPM , $\text{pH } 5,5$, 12 horas de fermentação e concentração inicial de células de 10^7 células mL^{-1} .

Alves (2018) avaliou a produção de β -galactosidase e etanol por diferentes cepas de *K. marxianus* CCT 3172 em soro de queijo. A autora realizou a

permeabilização das células com etanol para determinação da atividade enzimática pelo método ONPG e verificou que a condição mais propícia para a produção enzimática foi a 30°C, 100 RPM e 150 g L⁻¹ de lactose, com uma atividade enzimática de 1100 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹, resultado superior ao obtido neste trabalho porém trabalhando com uma concentração maior de lactose. Já no meio contendo soro de queijo desproteínizado a maior atividade enzimática foi verificada nas células cultivadas a 30°, 35° e 40°C, com respectivamente, 510; 430 e 540 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹. Como a autora trabalhou com a permeabilização das células isso influenciou positivamente na determinação da atividade enzimática, pois permitiu a modificação da estrutura da parede celular da levedura e aumentou a permeabilidade a entrada do ONPG, possibilitando maior contato entre o indicador e a enzima (CORTEZ, 2010).

Manera (2011) realizou um planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimizar a produção de β-galactosidase por *K. marxianus* CCT 7082 em soro de queijo suplementado. O autor variou a concentração de lactose, água de maceração de milho (AMM), Prodex-lac (extrato de levedura) e pH trabalhando a 30°C, 180 RPM e 10% de inóculo (v/v). O soro de queijo empregado passou por um tratamento ácido e aquecimento a 90 °C por 15 minutos para desproteínização. As células foram rompidas pelo uso das pérolas de vidro e ondas ultrassônicas para determinação da atividade enzimática.

As concentrações de AMM entre 60 e 100 g L⁻¹, lactose entre 70 e 90 g L⁻¹, extrato de levedura 4 g L⁻¹ e pH 5 conduziram a valores de atividade enzimática superiores a 1400 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹. A AMM, o diferencial empregado pelos autores, como fonte de nitrogênio é um subproduto da produção do amido de milho, sendo rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato. Dessa forma, esta suplementação contribui para o crescimento da levedura e atende suas necessidades metabólicas, sendo uma alternativa mais viável economicamente quando comparada ao extrato de levedura (SILVA, 2006).

Manera (2008) analisou a produção de β-galactosidase com *Kluyveromyces marxianus* com diversas linhagens em meio sintético. A composição do meio contava com 10 g L⁻¹ de lactose, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio dihidratado, 1,2 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 0,4 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado e 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, a 30 °C e 180 RPM durante 72 h. As células foram rompidas por ultrassom e adicionou-se pérolas de vidro seguido de determinação da atividade enzimática usando o ONPG.

Verificou-se atividade máxima da β -galactosidase após 50 h de cultivo para *K. marxianus* CCT 7082, atingindo valores superiores a 2,8 U_{ONPG} mL⁻¹. As linhagens CCT 7080 e CCT 7081 atingiram a atividade máxima em 6h de fermentação com valores obtidos para atividade enzimática de 0,9 e 1,5 U_{ONPG} mL⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos por Manera (2008) foram inferiores ao deste trabalho (aproximadamente 10 U_{ONPG} mL⁻¹), possivelmente devido a linhagem da cepa e uso do meio sintético, com baixa concentração de lactose, retomando novamente a importância da alta concentração de lactose no meio.

Após a verificação da cepa que apresentou o melhor resultado, os autores avaliaram a influência de diferentes concentrações do componente do meio de cultivo. As condições ideais estabelecidas para a produção de β -galactosidase apresentaram concentração de lactose de 28,2 g L⁻¹, concentração de extrato de levedura de 17,0 g L⁻¹, concentração de sulfato de amônio de 8,8 g L⁻¹ e pH 6,0. Sob essas condições, a atividade enzimática foi de 10,6 U_{ONPG} mL⁻¹. Este resultado mostra-se similar ao obtido neste trabalho e seu aumento em relação ao experimento citado anteriormente pode ser resultado do aumento da concentração de lactose, extrato de levedura e sulfato de amônio, sendo ambos últimos superiores aos empregados no planejamento DCCR item 4.3. O fato do autor ter realizado o rompimento celular anterior à determinação enzimática pode ter propiciado maiores resultados devido à liberação do extrato enzimático, de modo que propicia o maior contato do indicador com as enzimas que estão livres, sem a barreira plasmática.

Falleiros, *et al.*, (2014) utilizaram a cepa *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 para fermentação submersa do permeado de soro de leite. O meio foi composto por extrato de levedura 6,0 g L⁻¹, sulfato de amônio 6,0 g L⁻¹, fosfato de potássio 5,0 g L⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado 0,6 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ permeado de soro de leite em pó. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória a 180 RPM, 30 °C por 48 horas, iniciando com uma concentração de células de 1 g L⁻¹.

As células passaram por um processo de extração para a liberação da enzima e posterior determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose. Os métodos testados proporcionaram as respectivas atividades enzimáticas: autólise por clorofórmio 8,125 UGI mL⁻¹, ruptura em agitador tipo vortex 7,184 UGI mL⁻¹, ruptura em sonicador 5,670 UGI mL⁻¹, rompimento ultrassônico 7,24 UGI mL⁻¹, sendo UGI mL⁻¹ definida como μ mol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática, à temperatura de 30°C, pH 6,5, com

uma concentração inicial de lactose de 50 g L⁻¹.

Contudo, a utilização de métodos químicos é inviável pois a enzima β -galactosidase possui aplicação na indústria de alimentos, e resíduos de contaminantes encarecem o processo de purificação. Dessa forma, o ideal são os métodos mecânicos e físicos de ruptura celular, sendo possível avaliar a influência do tempo de ruptura na atividade enzimática.

Al-Jazairi (2015) realizou a fermentação em meio sintético YPL (extrato de levedura, peptona, lactose e cloranfenicol) com *K. marxianus* DIYSI 11 e a atividade enzimática foi determinada pelo método do ONPG conforme Moeini, *et al.* (2004). Entretanto, o autor realizou a permeabilização das células com um tampão, seguido da adição de SDS e clorofórmio e o tempo de reação após a adição do ONPG foi deixado ocorrer até a solução apresentar coloração amarela. O autor verificou que a condição que propiciou a melhor atividade enzimática específica considerando as variáveis testadas foi a 20 °C, 250 RPM, 64 horas de incubação, pH 3 e concentração inicial de açúcar de 10%, atingindo 4997 U mL⁻¹ min⁻¹, seguido da condição a 25 °C, 200 RPM, 52 horas de incubação, pH 4 e concentração inicial de açúcar de 8% com 4892 U mL⁻¹ min⁻¹.

O diferencial na metodologia deste autor foi o tempo de reação do ONPG com a amostra, o que influencia diretamente na atividade enzimática. Isso por que quanto maior o tempo de contato entre reagente e amostra maior o consumo de ONPG. Al-Jazairi (2015) também verificou que altos níveis de pH eram desfavoráveis na produção da enzima para a cepa testada. Segundo o autor, isso pode ter ocorrido devido à origem do levedura isolada, sendo de um material muito ácido – o Labneh, um tipo de iogurte. O autor apresenta também a velocidade ótima de agitação como 250 RPM, o que permitiu um bom contato entre o substrato e as células de levedura.

Alves (2008) estudou as condições de produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e a caracterização parcial da enzima livre e imobilizada. O meio utilizado continha 10 g L⁻¹ de lactose, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio, 1,2 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 0,4 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura com pH ajustado para 5,5 e a fermentação ocorreu a 30°C. Previamente à realização da atividade enzimática o material passou por um processo de extração por ondas ultrassônicas e abrasão por pérolas de vidro para liberação do extrato enzimático. O autor verificou que a agitação e a aeração exerceram influência na produção da enzima, obtendo valores de

atividade enzimática entre 3,2 a 14,7 U mL_{cél}⁻¹, sendo a condição mais favorável a 500 rpm e 1,5 vvm, atingindo uma produtividade de 1,2 U_{ONPG} mL⁻¹ h⁻¹, uma atividade enzimática de 17 U mL_{cél}⁻¹, com concentração celular de 11 mg mL⁻¹ após 14 horas de cultivo.

Perini (2013) utilizou um planejamento DCCR para avaliar a produção de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em soro de queijo. O meio foi suplementado com milhocina e realizou-se o rompimento das células por centrifugação para determinação da atividade enzimática. Os resultados obtidos indicaram que a condição mais favorável à produção da enzima foi a 31°C, 820 mL L⁻¹ de soro de queijo (39,43 g L⁻¹ de lactose) e 14,36 g L⁻¹ de milhocina, apresentando uma atividade enzimática de 9,8 U mL_{cél}⁻¹ com 14 horas de cultivo.

Os resultados da literatura mostram que as diferentes formas de suplementação podem interferir diretamente na atividade enzimática. As fontes de nitrogênio propostas como o extrato de levedura, água de maceração de milho e composição de sais são essenciais para atender as necessidades nutricionais da levedura, entretanto, as concentrações empregadas não necessariamente apresentam um efeito positivo ao longo do cultivo.

Quanto as condições operacionais de temperatura e agitação, verificou-se que os processos fermentativos citados anteriormente ocorreram em uma faixa de 30 – 40 °C e 150 – 180 RPM. Como a *K. marxianus* é uma levedura termotolerante, ela consegue manter-se a temperaturas elevadas, como 45 – 50 °C. Entretanto, isso não significa que a atividade enzimática da β-galactosidase seja mantida a altas temperaturas, uma vez que essa variável afeta significativamente a estabilidade da enzima, causando desnaturação proteica.

6.3 Tratamento estatístico dos resultados obtidos para a atividade enzimática da β-galactosidase na fermentação do permeado de soro de leite.

Para a determinação das variáveis significativas trabalhou-se com o tratamento dos dados no *software* STATISTICA 8.0 considerando o valor de atividade enzimática após 8 horas. A análise de variância (ANOVA) foi empregada na atividade enzimática apresentada na Tabela 6. A ANOVA consiste em classificar os resultados estatísticos e testar se as médias de uma classificação especificada diferem significativamente.

Isso foi realizado usando o teste estatístico de Fisher para a análise de variância. O valor F é a razão entre o quadrado médio devido à regressão e o quadrado médio devido a erro e indica a influência (significância) de cada fator controlado no modelo testado (MANERA, *et al.*, 2008).

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise de variância para o modelo linear/quadrático com 90% de confiança, o qual inclui os efeitos principais lineares (L) e quadráticos (Q), além dos efeitos de interação entre as variáveis, obtidos para a resposta atividade enzimática.

Tabela 9 - Análise do modelo de regressão linear/quadrático por meio da ANOVA ($R^2=0,85$), obtido para a resposta Atividade Enzimática ($U_{ONPG} g_{cél}^{-1}$) após 8 horas. Em negrito estão os valores com $p < 0,1$.

Fator	Efeito	F	p-valor
Média/Intercepto	20,487	-	-
(1) Temperatura ($^{\circ}C$) (L)	0,402	0,683	0,435
Temperatura ($^{\circ}C$) (Q)	-2,952	45,417	0,000
(2) Agitação (RPM) (L)	0,446	0,839	0,389
Agitação (RPM) (Q)	-1,007	5,290	0,054
(3) Sais (gL^{-1}) (L)	0,979	3,443	0,106
Sais (gL^{-1})(Q)	-3,942	41,944	0,000
1L by 2L	0,078	0,013	0,912
1L by 3L	0,553	0,646	0,447
2L by 3L	-0,701	1,039	0,341

Fonte: Autor (2019).

Analisando a Tabela 9 considerou-se as variáveis significativas com p-valor $< 0,1$, ou seja, a um nível de 10% de confiança. Verificou-se que, para a resposta atividade enzimática, o modelo em questão apresenta como significativos, os termos quadráticos das variáveis temperatura, agitação e adição sais. Os efeitos testados mostraram efeitos quadráticos negativos na produção de β -galactosidase, o que indica que a atividade enzimática aumenta conforme o nível desses fatores aumenta, porém diminui à medida que o nível desses parâmetros aumenta acima de certos valores. Quanto a interação entre as variáveis, nenhuma se mostrou significativa pois p-valor $> 0,1$.

Manera (2011) verificou que as variáveis concentração de lactose e de AMM que é uma fonte de nitrogênio e o pH apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança. Esse efeito caracteriza-se como positivo, ou seja, o aumento da concentração proporcionou incremento na atividade enzimática. Já o pH apresentou

efeito negativo, houve diminuição da atividade enzimática com seu aumento.

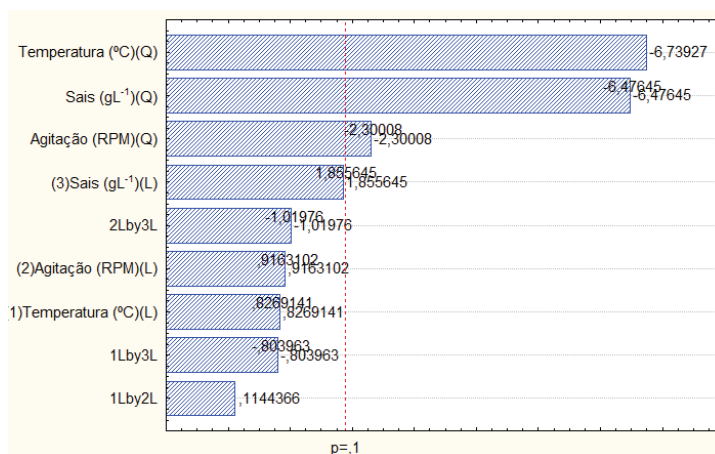
Scholz (2011) verificou que para a produção de β -galactosidase a temperatura apresentou efeito positivo, pois a permeação da membrana é mais efetiva a altas temperaturas (40 - 45 °C), o que facilita o transporte do substrato para a enzima no interior da célula. Outros autores trabalharam com temperaturas mais amenas, como Rech *et al.* (1998) avaliou a temperatura com 37 °C, empregando *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e 6556, Rajoka *et al.* (2003), com *K. marxianus* NIBGE Y-1, 54 utilizaram a temperatura de 35 °C; Furlan *et al.* (2001) utilizaram a temperatura de 30 °C, para *Kluyveromyces marxianus* CDB 002. Assim como Manera *et al.* (2011), utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, Marquez *et al.* (2005) e Santiago *et al.* (2004), a partir da *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, que também utilizaram a temperatura de 30 °C. Como discutido anteriormente, o tipo de cepa empregado afeta diretamente a atividade enzimática, e altas temperaturas também podem causar a desnaturação da enzima, que reduz a atividade enzimática do cultivo.

De acordo com Haaland (1989), o valor R^2 representa a medida da variabilidade dos valores da resposta que podem ser explicados pelas variáveis independentes e a interação entre elas. Para este autor, um modelo considerável bom (valores acima de 0.9) explica a maior variação na resposta. Quanto mais próximo este valor 1,00, mais forte é o modelo e o melhor a predição da resposta.

O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,85, o que indica que 85% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta (FALLEIROS, 2016).

Para melhor visualização das variáveis significativas, obteve-se o gráfico de Pareto, conforme mostra a Figura 11.

Figura 11 - Gráfico de Pareto obtido para a atividade enzimática.

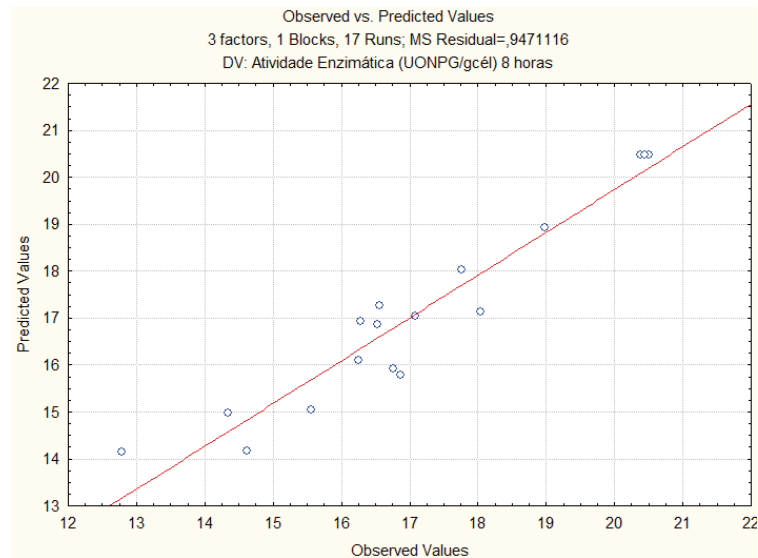


Fonte: Autor (2019).

O gráfico da Figura 11 mostra como variáveis significativas, a temperatura, a agitação e a adição de sais. Destas, a temperatura e os sais são as que apresentam maior influencia na resposta enzimática. Também é possível observar que o aumento destas variáveis bem como da concentração de sais no meio reduz a atividade enzimática, ou seja, influencia negativamente a variável resposta.

A Figura 12 apresenta o gráfico de Valores preditos *versus* Valores observados.

Figura 12 - Demonstração da relação dos valores preditos versus observados para a atividade enzimática.



Fonte: Autor (2019).

Verifica-se que a distribuição das respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pelas equações propostas pelo modelo. Isso reforça a eficiência do modelo, uma vez que os valores observados são próximos dos preditos. Desse modo, os resultados obtidos se ajustaram de modo satisfatório ao modelo.

A partir do tratamento estatístico obteve-se os valores críticos para a obtenção da atividade enzimática máxima, expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores mínimos, críticos e máximos observados para a obtenção do melhor resultado de atividade enzimática.

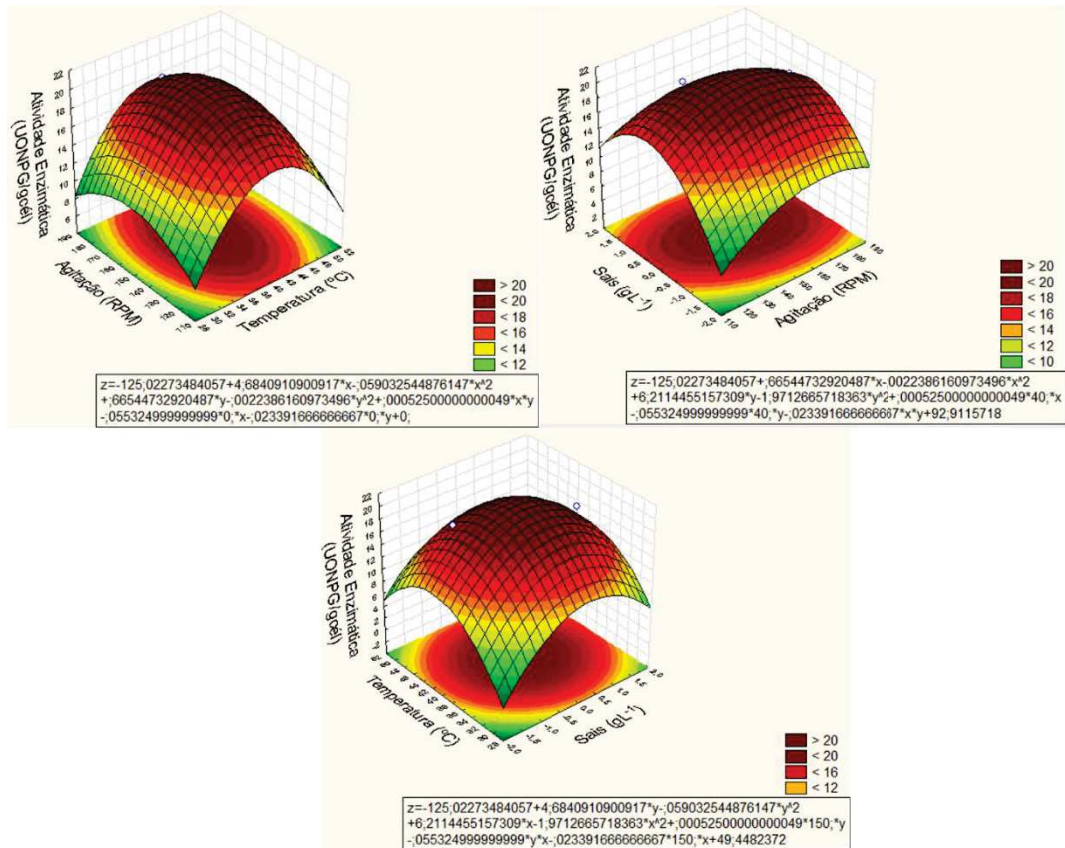
Fator	Minímos	Valores críticos	Máximos
Temperatura (°C)	30,000	40,305	50,000
Agitação (RPM)	120,000	152,816	180,000
Nível de sais	-1,673	0,103	+1,673

Fonte: Autor (2019).

A Tabela 10 mostra que os resultados obtidos indicam as condições extremas e central do planejamento como críticas para obtenção dos resultados. A determinação dos valores críticos tem como objetivo otimizar a obtenção da variável resposta. De acordo com os resultados, a condição central testada para os experimentos apresenta-se como ótima para obtenção da máxima atividade enzimática.

As superfícies de respostas temperatura *versus* agitação, temperatura *versus* sais e agitação *versus* sais foram plotadas considerando as condições de máxima atividade enzimática (40°C, 150 RPM e 10 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio dihidratado e 0,6 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado) e são mostradas na Figura 13.

Figura 13 - Superfície de resposta para atividade enzimática.

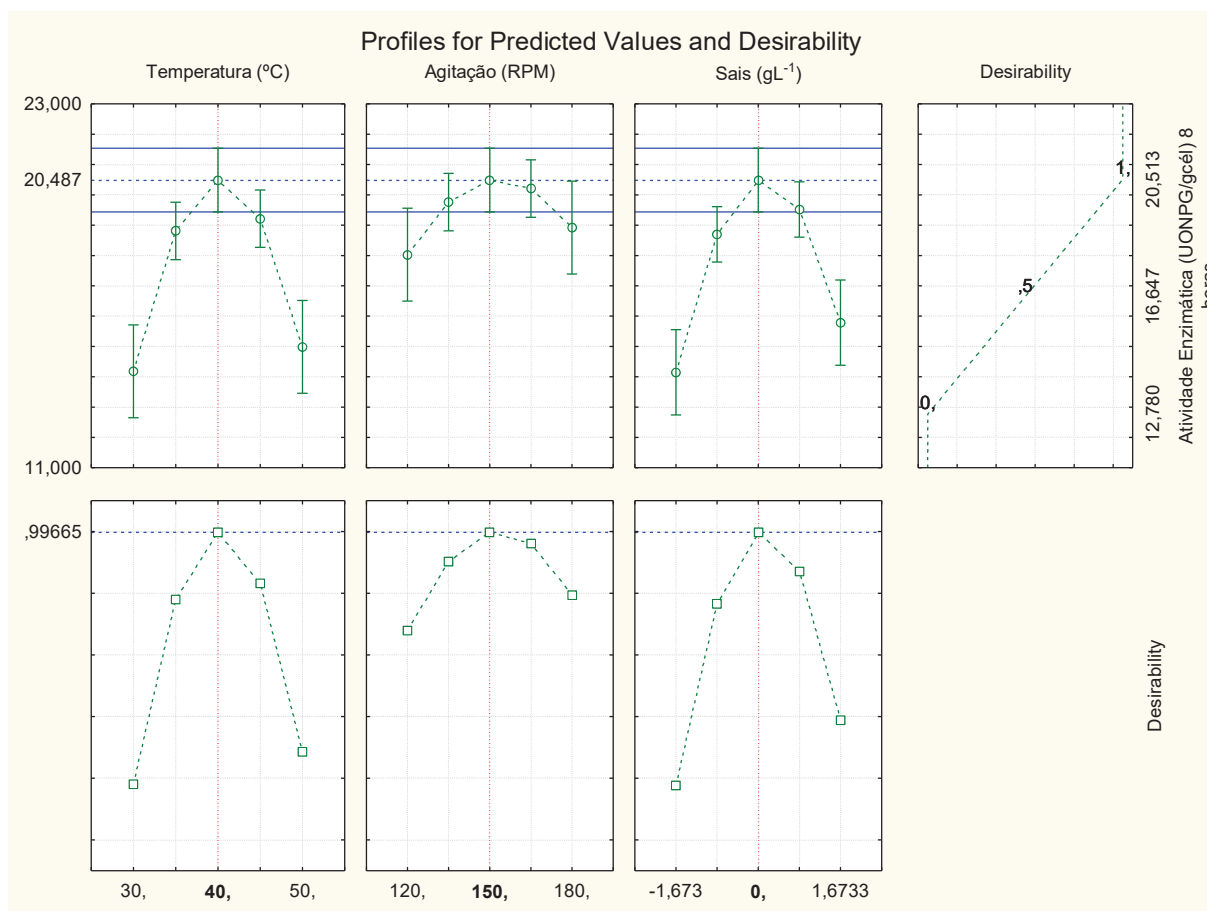


Fonte: Autor (2019).

A análise das superfícies resposta mostra que a curvatura mostra-se sob as condições de ponto central nas três correlações propostas. No que diz respeito a relação entre temperatura e agitação, uma combinação ideal ocorre entre 36 - 44 °C e de 140 a 180 RPM. Para adição de sais e agitação uma condição que corresponde ao nível -0,5 e +0,5 de sais aliada a 140 – 160 RPM alcança resultados de atividade enzimática superiores, assim como para temperatura e sais, de 35 a 42 °C.

A Figura 14 mostra o gráfico de desejabilidade, onde é possível relacionar todas as variáveis avaliadas e verificar em um mesmo painel quais as condições que fornecem os melhores resultados.

Figura 14 - Relação dos valores previstos e desejabilidade para Atividade Enzimática.



Fonte: Autor (2019).

As superfícies respostas e o gráfico de desejabilidade mostram que as condições que propiciaram os maiores resultados de atividade enzimática referem-se ao ponto central para as três variáveis estudadas. A faixa de temperatura entre 35 – 45 °C combinada com agitação acima de 150 RPM e nível central de sais.

Após o tratamento estatístico pode-se obter os valores ótimos propostos pelo planejamento para a avaliação da atividade enzimática de β -galactosidase produzida por *K. marxianus* ATCC 39607 e testar essas condições em biorreator, para verificar a influência do aumento de meio de cultivo, controle de pH e oxigênio dissolvido no meio.

6.4 Fermentação no biorreator

Após a determinação da condição ideal proposta pelo planejamento DCCR pela análise estatística empregou-se tais parâmetros para a fermentação do permeado de

soro de leite em biorreator, com 3,5 L de meio de cultivo. A Tabela 11 mostra os valores de °Brix, pH, viabilidade, concentração celular e atividade enzimática obtidos em 5 horas de acompanhamento do processo fermentativo.

Tabela 11 - Resultados obtidos a partir da fermentação do permeado de soro de leite em biorreator em batelada a 40 °C, 150 RPM, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 5 g L⁻¹ de fosfato de potássio e 0,6 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado.

Tempo (h)	°Brix	pH	Viabilidade celular (%)	Concentração celular g L ⁻¹	AE (U _{ONPG} g _{cél} ⁻¹)	AE (U _{ONPG} mL ⁻¹)
0	17,00	7,00	98,24	2,82	-	-
1	15,50	7,01	41,30	0,49	20,409	10,059
2	15,30	6,98	40,78	0,49	20,962	10,356
3	15,30	7,00	41,67	0,49	19,841	9,819
4	15,00	6,95	54,26	0,50	19,498	9,683
5	14,50	6,97	54,90	0,50	19,256	9,630

Fonte: Autor (2019).

O cultivo iniciou com 17,00 °Brix e seu decréscimo em 5 horas de fermentação para 14,50 °Brix indica o consumo dos sólidos (carboidratos e sais) pela levedura. O pH foi controlado e portanto não verificou-se nenhuma variação significativa no tempo monitorado.

A viabilidade celular mostrou o mesmo comportamento que os ensaios em *shaker*, partindo de um inóculo com viabilidade de 98% e reduzindo para cerca de 40% já na primeira hora de fermentação. Entretanto, na 4ª hora verificou-se um aumento da viabilidade celular, ou seja, crescimento celular, possivelmente consequência da adequação da levedura ao meio. Porém, a atividade enzimática continuou a reduzir, e portanto, não acompanhou-se a fermentação por mais tempo, visto que o objetivo foi de verificar o ponto com máxima atividade. A atividade também mostrou-se coerente com o verificado em *shaker*, mantendo uma constância em relação aos valores, iniciando em 20,409 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹ e após 5 horas alcançando 19,256 U_{ONPG} g_{cél}⁻¹.

Neste ensaio não se realizou o controle de oxigênio, de modo que manteve-se por 12 horas o sistema de saturação de oxigênio dissolvido no meio e depois disso não houve fornecimento do gás. Alves (2008) obteve os melhores resultados de atividade enzimática (11,4 e 14,7 U_{ONPG} mL_{cél}⁻¹) com agitação de 500 RPM, alcançando aproximadamente 10,5 mg mL⁻¹ de células. Silva-Santisteban, Maugeri

(2005) e Schneider *et al.* (2001) verificaram que apesar da transferência de oxigênio, houve uma redução brusca na concentração celular com o aumento na velocidade de agitação. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito de cisalhamento sofrido pelas células.

Para otimizar os resultados de atividade enzimática procurou-se trabalhar com o aumento da agitação no meio de cultivo, pois com o aumento do volume fermentativo a agitação de 150 RPM não foi tão eficaz na dispersão dos nutrientes, tal fato verificado visualmente durante o procedimento. Entretanto, verificou-se uma grande formação de espuma e uso demasiado de anti-espumante. Dessa forma, procedeu-se com a condição de 150 RPM.

De acordo com Feng *et al.* (2003), quando a agitação é insuficiente ou baixa ocorre a redução da disponibilidade de oxigênio no meio. Isso prejudica o desenvolvimento do microrganismo bem como a produção da enzima. Ao contrário disso, uma agitação vigorosa proporciona maior quantidade de oxigênio dissolvido bem como a dispersão dos nutrientes no meio de cultura. Porém, deve-se ater às condições de agitação que não causem o cisalhamento das células. Portanto, uma sugestão seria avaliar a influência da agitação paralela a injeção de oxigênio dissolvido no cultivo em biorreator.

Schneider *et al.* (2001) explicam que a concentração de oxigênio dissolvido no meio é um fator limitante para culturas de *Kluyveromyces marxianus*. As leveduras deixam de produzir a enzima β -galactosidase e passam a produzir etanol, paralelamente à produção de biomassa. Esse subproduto do metabolismo pode atingir concentrações tóxicas ao microrganismo (~10%), inibindo seu crescimento e reduzindo a produção da enzima.

Pereira, *et al.* (2014) avaliaram a influência da aeração na produção da β -galactosidase. Os autores utilizaram o microrganismo *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite a 30 °C, 200 RPM por 24 horas e 1 vvm, suplementado com 1 g L⁻¹ de extrato de levedura. A maior atividade enzimática foi verificada com 5 horas de cultivo, sendo de 1,009 U mL⁻¹ após rompimento das células com pérolas de vidro. Para este ensaio em biorreator, a atividade enzimática que corresponde a 5 horas de cultivo foi de 9,63 U mL⁻¹, de modo que apesar da ausência de injeção de oxigênio os resultados obtidos mostram-se superiores aos de Pereira, *et al.* (2014).

Manera, *et al.* (2008) avaliou a influência da agitação e da aeração na produção da enzima por cultivo submerso em biorreator. As condições estudadas foram 200 RPM e 1,33 vvm e 400 RPM e 2,67 vvm, sendo a segunda a condição mais favorável,

atingindo uma atividade enzimática de $6,59 \pm 0,20 \text{ U mL}^{-1}$. O maior valor para atividade enzimática específica, $1606,20 \text{ U}_{\text{ONPG}} \text{ g}_{\text{cél}}^{-1}$, foi obtido com 550 mL L^{-1} de soro de queijo (equivalente a $26,44 \text{ gL}^{-1}$ de lactose) e 18 gL^{-1} de milhocina, a 35°C . O autor cita que o aumento da atividade de β -galactosidase pode estar 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 fatores fisiológicos, como o estresse nutricional e aos produtos do metabolismo primário, como etanol.

No presente trabalho, não foi possível realizar ensaios em *shaker* em condições acima de 180 RPM, devido à limitações do equipamento (até 180 RPM). Portanto, considerando o relatado pela literatura, verifica-se a necessidade de realizar um planejamento avaliando a influência da agitação e do fornecimento de oxigênio no biorreator, pois para Alves (2008) para obter-se altas atividades enzimáticas ($12 - 14 \text{ U mL}^{-1}$) e produtividades ($0,8 - 1,0 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) deve-se trabalhar com elevadas velocidade de agitação (500 rpm) e com taxas de aeração acima de 1,25 vvm.

Após o processo fermentativo realizou-se a análise de DQO e DBO conforme o item 4.1.2.8. A DQO e DBO do permeado de soro de leite fermentado foram determinadas como $121,5 \text{ g L}^{-1}$ e $71,375 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. A fermentação de 5 horas proporcionou uma redução de 41,105 e 63,95%. Burlani *et al.* (2014) verificou que após 24 horas da fermentação do permeado com *K. marxianus* e *K. lactis* houve uma redução de DQO de $133,8 \text{ g L}^{-1}$ para $49,5 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a 63%.

A resolução CONAMA 430/2011 estabelece as condições para lançamento de efluentes nas redes coletoras como $180 \text{ mg L}_{\text{O}_2}^{-1}$ para DQO (ou redução de 70% da carga orgânica) e $60 \text{ mg L}_{\text{O}_2}^{-1}$ para DBO, conforme a FIEMG (Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais) e a FEAM (Fundação Estadual de Meio Ambiente) (TORRES FILHO, *et al.*, 2014). Isso indica que o material fermentado em 5 horas neste estudo não estaria apto a disposição em redes coletoras, de modo que seria necessário avaliar mais tempo do cultivo.

7. CONCLUSÃO

A caracterização do permeado permitiu identificar que o subproduto apresenta potencial fermentativo devido a presença da lactose, um dissacarídeo que pode ser assimilado pela levedura *K. marxianus*. Entretanto, o meio não oferece fontes nitrogenadas e co-fatores essenciais ao desenvolvimento da levedura, sendo requisitado fontes de suplementação. Deste modo, a avaliação das variáveis temperatura, agitação e composição de sais demonstrou-se significativa porém com um efeito negativo, sendo que o aumento dos parâmetros contribuiu para o aumento da atividade enzimática até determinado limite. Os resultados de atividade enzimática obtidos não apresentaram variação significativa sendo que as condições de ponto central forneceram os melhores resultados. A realização do ensaio em biorreator permitiu verificar a necessidade do estudo da agitação e fornecimento de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo, afim de otimizar-se os resultados. A redução da DQO e DBO mostram que o processo fermentativo do permeado de soro de leite apresenta-se como uma alternativa viável não só para a possível produção de β -galactosidase como também para tratamento do resíduo lácteo.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-BANAT, et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Tokiwadai - Japão, v. 85, n. 1, p. 861-867, out. 2010.

ALBIERO, A. **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas**. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Universidade Federal do Paraná, Palotina - Paraná, 2013.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1996.

AL-JAZAIRI, M. et al. Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. **International Food Research Journal**. Damascus - Siria, v. 22, n. 4, p.1361-1367, jan. 2015.

ALVES, E. de P. **Avaliação da produção de etanol e β -galactosidase por diferentes cepas de levedura cultivada em soro de queijo**. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade do Oeste do Paraná, Londrina, Paraná, 2018.

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e *American Family Physician***, v. 65, n. 9, p. 1845-1850, 2008.

AMORIM, H. V. Nutrição mineral da levedura: aspectos teóricos e práticos. **Semana da fermentação alcoólica “Jaime Rocha de Almeida”**. ESALQ, Universidade São Paulo, 1985,

ANDRADE, A. C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais, 2005.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - São Paulo, v. 22, n. 3, p. 249-253, set. – dez. 2002.

ANDRADE, R. S. et al. Valorização biotecnológica de soro de leite por fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Ilhéus - Bahia, v. 11, n. 2, p. 82-91, fev. 2015.

ASSIS, M. O. et al. Leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região equatorial brasileira. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo - São Paulo, v. 71, n. 4, p. 718-22, nov. 2012.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, Canada – Estados Unidos, v. 26, p. 89-105, set. 2008.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e fracionamento das proteínas do Soro Lácteo através da tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2008.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, set. 2011.

BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; RUYER, G. S. **Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise**. In: Seminário do programa de pós-graduação em Engenharia Química, 2009, Porto Alegre – RS. Anais VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.

BALLER, L. D.; DA SILVA, G. M. C.; BOMBARDELLI, C., 2015. Estudo da Hidrólise da Lactose do Permeado de Soro de Leite pela Enzima β -Galactosidase seguido da fermentação alcoólica. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, Ceará: Brasil, Set. 2015.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scaleup on oxygen transfer coefficient, KLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 216-228, 2006.

BANSAL, S. et al. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. **Indian Journal Of Microbiology**. Ludhiana – India, v. 48, n. 3, p. 337-341, set. 2008.

BARALE, S. B. **Contribuição ao estudo da fermentação de soro de leite por *Lactobacillus bulgaricus* em processo descontínuo**. Tese (Doutorado) – Curso de pós-graduação em Microbiologia e Imunologia – Escola Paulista de Medicina, São Paulo – São Paulo, 1985.

BARBOSA, A. S., et al. Estudo cinético da fermentação do soro de queijo de coalho para a produção de aguardente. **Revista Verde**, Mossoró –Rio Grande do Norte, v.35, n. 3, p. 237-254, jul. - set. 2010.

BARBOSA, M. R.; ARAÚJO, E. H. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v.1, n.1, p. 1-22, 2007.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. EdUFSCar, São Carlos, 2010.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: An alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Londres – Inglaterra, v. 38, n. 7, p. 656-698, set.1998.

BELLAVER, L. H., et al. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excesso. **FEMS Yeast Research**, Braga – Portugal, v. 4, n. 7, p. 691-698, fev. 2004.

BELLOCH, C., et. al. Inter-and intraspecific chromosome pattern variation in the

yeast genus *Kluyveromyces*. **Yeast**, Valencia – Espanha, v. 14, n. 15, p. 1341-1354, nov. 1998.

BEUCLER, J.; DRAKE, M.; FOEGEDING, A. E. Design of a beverage from whey permeate. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. 277-285, abr. 2005.

BLEOANCA, I. et al. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Japão, v. 116, n. 6, p. 697-705, dez. 2013.

BLIGH, E. G; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology**, Canadá, v. 37, n. 8, p. 911-917, ago. 1959.

BOBBIO, P. A.; ORSATTI, **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2ª Ed., 1992.

BORGES, L. A.; SOUZA, H. F. de; JESUS, W. S. de; DIAS, H. M. V.; BARROS, F. S.; BRANDI, I. V. Avaliação do efeito da suplementação de casaminoácidos sobre o crescimento celular e atividade de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* em soro de leite ultrafiltrado. **IV Jornada de Engenharia de Alimentos**, Diamantina – MG, 2019.

BRASIL, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Diário Oficial da União, Brasília, 2013.

BRITO, A. F. **Resposta ao estresse por etanol em *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735: uma análise da expressão gênica e do perfil metabólico**. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais, 2015.

BROUNS, F.; VERMMER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 1, p. 22-33 2000.

BURKHOLDER, P. R.; MCVEIGH, I.; MOYER, D. Studies on some growth factors of yeasts. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 48, p. 385-391, 1944.

BURLANI, E. L. **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces* spp. para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol**. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Univates, Lajeado - Rio Grande do Sul, 2014.

CAMARGO, D. **Produção biotecnológica de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino**. 133 f. Tese (Doutorado) – Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – Paraná, 2016.

CAMPBELL, A. K.; WAUD, J. P.; MATTHEWS, S. B. The molecular basis of lactose. **Science Progress**, v. 88, n. 3, p. 157-202, 2005.

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

2000.

CHÁVEZ, J. D. R. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** Dissertação, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena – SP, 2008.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Manual de Métodos Analíticos: Controle Químico da Fermentação.** 71 p. Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba – SP. 2005.

CORTEZ, D. V. **Permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol.** Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, São Paulo, 2010.

DEINA, L. E. **Avaliação da produção biotecnológica de etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, a partir do permeado de soro de leite.** 100 f. Dissertação em andamento (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo - Paraná, 2018. Comunicação pessoal.

DICKEY, A. N.; YIM, W. S.; FALLER, R. Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. **The Journal of Physical Chemistry B**, California – Estados Unidos, v. 113, n. 8, p. 2388-2397, out. 2010.

DICKSON, R. C.; SHEETZ, R. M.; LACY, L. R. Genetic regulation: yeast mutants constitutive for β -galactosidase activity have an increased level of β -galactosidase Messenger ribonucleic acid. **Molecular and Cellular Biology**, Kentucky – Estados Unidos, v. 1, n. 11, p. 1048-1056, nov. 1981.

DINIZ, R. H. S, et al. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Viçosa – Minas Gerais, v. 3, n. 2, p. 111-117, set. 2014.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6.** 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method from Determination of Sugars and Related Substances. **Natura**, v. 28, n. 3, p. 350 – 356, 1956.

FALLEIROS, L. N. S. S. **Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537.** Tese, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2016.

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação do permeado de soro de leite com *Kluyveromyces marxianus*. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis – SC, 2014.

FARIAS, F. O. **Produção de etanol de segunda geração a partir de soro de leite e água de maceração de milho.** Dissertação, Universidade Estadual de Ponta

Grossa, Ponta Grossa – PR, 2015.

FAOSTAT, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Indicator of Livestock Processed – Dry Whey, 2017.

FENG, Y.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; NG, W. J. Optimization of agitation, aeration and temperature conditions for maximum β -mannanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 282-289, 2003.

FIEDUREK, J.; SZCZODRAK, J. Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Acta Microbiologica Polonica**. v. 43, n. 1, p. 57-65, 1994.

FLORENCIO, I. M et al. Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande - Paraíba, v. 17, n. 10, p. 1088-1022, jul. 2013.

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

FREITAS, M. de F. M. **Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana**. Dissertação, Universidade Federal do Ceará, 2013.

FREITAS, A. P. B. e. **Estudo comparativo dos processos produtivos, propriedades e aplicações de β -galactosidase obtida de diferentes fontes**. Monografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2017.

FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* a retrospective. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, Orsay – França, v.6, p. 323-324, nov. 2005.

FURLAN S.A., SCHNEIDER, A.L.S., MARKLE, R., CARVALHO, M.F, JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D - galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium. **Acta Biotechnologica** 21: 57-64, 2001.

GABARDO, S. **Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol**. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2015.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 1-12, 1985.

GHALY, A. E.; KAMAL, L.; AVERY, A. Influence of temperature rise on kinetic

parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Reino Unido, v. 19, n. 7, p. 741-749, abr. 2003.

GHALY, A. E.; SINGH, R. K. Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 181-203, 1989.

GODOY, G. G. de. **Estudo da produção de lactase por fungos filamentosos**. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Bioquímica, Universidade de São Paulo, Lorena – São Paulo, 2016.

GOMES, A. L. **Análise técnica e econômica de filtro anaeróbico utilizado para tratamento de efluentes líquidos de uma indústria de laticínios – Estudo de caso**. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2006.

GOODHUE, C. ROSAZZA, J. P.; PERUZZOTTI, G. P. Methods for transformation of organic compounds. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Eds. A. L. Demain, N. A. Solomn, Amer. Soc. for Microbiology, Washington, 1986.

GUPTA, A.M., NAIR, J.S. B-galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **Journal of Scientific & Industrial Research** 69:855-859, 2010.

HAALAND, P.D., 1989. **Experimental design in biotechnology**. Marcel Dekker inc, New York.

HEIN, K. D. **Suplementação de permeado de soro de leite para produção de etanol**. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo - Paraná, 2015.

HEISING, M., et al. 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, dez. 1994.

HERNALSTEENS, S.; **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**. Tese (Doutorado) – Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas – São Paulo, 2006.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, A. E. Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. **Food Technology**, Filadélfia – Pensilvânia, v. 45, n. 1, p. 93-95, 1991.

HSU, C. A.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 197-206, out. 2005.

HUSAIN, Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.30, n. 1, p. 41-62, mar. 2010.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. p. 1020, São Paulo, 4 ed. 2008.

JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium. **Acta Biotechnologica**, vol. 21, no. 1, p. 57-64, fev. 2001.

JÚNIOR, C. G. de. **Aplicação de células recombinantes da levedura *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo**. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2004.

KIENDL, P. D. World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**, 2005.

KREGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Ed. 3, 1082 p., Elsevier Science Publishers, B. V. Amsterdam, 1984.

KURTZMANN, C. P.; FEEL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Ed. 4, 1076 p., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

LACHANCE, M. A. Current status of *Kluyveromyces* systematics. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 5, p.642-645, ago. 2007.

LANE, M. M., et al. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Irlanda, v. 100, n. 4, p. 507-519, nov. 2011.

LEI, J.; ZHAO, X.; GE, X.; BAI, F. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. **Journal of Biotechnology**, v.131, n. 3, p. 270-275, jul. 2007.

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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 35–40, 2004.

LOPES, J. J. C. **Balço de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica**. Dissertação, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology** , v. 87 n. 3, p. 829-845, 2010.

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

MANERA, A. P et al. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology And Biotechnology**, Rio Grande - Rio Grande do Sul, v. 1, n. 46, 13 jul. 2008.

MANERA, A. P. et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá – Paraná, v. 33, n. 2, p. 155-162, abr. 2011.

MARIANO, P. de L. S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica**. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Biologia Buco-dental, Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP, 2006.

MARTINS, D. B. G. **produção de β -galactosidase e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* sob diferentes condições de cultivo**. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife - Pernambuco, 2005.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J.F., Review: whey pollution problem and potential utilization. **Internation Journal Food Science Technology**, v. 23, p. 323-336, 1988.

MATHÍUS, L. A., et al. Aspectos atuais da intolerância a lactose. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 1, p. 46-52, 2016.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v. 47, n. 3, p. 195-203, 1994.

MEDEIROS, J.F. **Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp**. Tese (Doutorado) – Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo, 1999.

MENA, L. P. **Obtenção e conservação da enzima β -galactosidase a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082**. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa, Bagé - Rio Grande do Sul, 2015.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 2, p. 47 – 54, 2006.

MOEINI, H., NAHVI, I., TAVASSOLI, M. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. **Electronic Journal of Biotechnology** 7: 1-7, 2004.

MOLINARO, E. C.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Volume 2. Editora EPSJV, IOC, Rio de Janeiro 2010.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul: Artmed, 2014.

NICOLAU, P. B. **Microorganismos e crescimento microbiano**. Universidade Aberta do Brasil, 2014.

NOBRE, T. de P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 2005.

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

OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Elsevier Science**, v. 15, p. 517-522, 1997.

PASCHOS, T.; XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 15, p. 1-12, mar. 2015.

PASSOS, J. H. dos. **Produção de etanol por meio da fermentação alcoólica do permeado de soro de leite com *Saccharomyces cerevisiae***. Trabalho de Conclusão de Curso do Curso Superior de Tecnologia de Processos Químicos da Coordenação de Processos Químicos. Toledo, Paraná – Brasil. 2015.

PATRA, M. et al. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**. Finlândia, v. 90, n. 4, p. 1121-1135, fev. 2006.

PEREIRA, M. P. B.; SOUZA, T. C. de; LEMOS, C. M. G. de; LEMOS, J. A. M.; GONÇALVES, L. R. B. Influência da transferência de oxigênio na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 utilizando soro de queijo. **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação Científica**, v. 1, n. 1, Vassouras – Rio de Janeiro, 2014.

PEREZ-ORTIN, J. E.; MATAALLANA, E.; FRANCO, L. Chromatin structure of yeast genes. **Yeast**, Burjassot – Espanha, v. 5, p. 219-238, mar.1989.

PERINI, B. L. B. **Produção de β -galactosidase com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de soro de queijo**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville - Santa Catarina, 2013.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the *Crabtree* effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**. [s.l.], v. 1, n. 17, p. 1-6, out. 2014.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. G. Commercially available oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 313, n. 6, p. 10-22, 1996.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. E; CASTRO GOMES, R. J. H. **Soro de leite – Obtenção, características e aproveitamento: revisão**. Seminário Cia. Agr., Londrina, v. 13, n. 1, p. 92-96, 1992.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre -

Rio Grande do Sul, 1998.

REGHELIM, M.; RIGHI, E. Reaproveitamento de resíduo: alternativas para o soro de queijo. **6º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente**, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, 2018.

RICHMOND, M.I.; GRAY, J.i.; STINE, C. M. β -Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal Of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p. 1759-1771, set. 1981.

RILEY, M. I.; DICKSON, R. C. Genetic and biochemical characterization of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 158, p. 705-712, mai. 1984.

ROBINSON D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 530 p., 1991.

RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, suppl., p. 109-115, 2008.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 567-572, out-dez. 2004.

SANTOS, A. M. dos. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. Dissertação, Universidade Federal de Alagoas, Macéio – AL, 2008.

SCARCELLI, F. A evolução do mercado de queijos em 2014 e suas perspectivas. *Revista Leite e Derivados*, Ed. 152, p. 20-22. 2015.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K. D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, Alemanha, v.30, n. 3, p. 173-90, ago. 2000.

SCHNEIDER, A. L. dos S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. de F.; JONAS, R.; FURLAN, S. A. Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 547–550, 2001.

SCHOLZ, E. B. **Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β galactosidase**. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville - Univille, Joinville – Santa Catarina, 2011.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B. S.; HARTL, L.; KUBICEK, C. P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, Wien – Austria, v. 21, p. 42-48, fev. 2007.

SHAIKH, S. A.; KHINE, J. M.; KHAN, M. I. Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor sp.* **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 239-245, 1997.

SHUKLA, S.; MISHRA, K. P.; TRIPATHI, P. β -galactosidase" A Novel Enzyme For Treating Dairy Waste "An Environment Friendly Approach": A Review. **Indian Research Journal of Genetics & Biotechnology**, v.5, p. 151-159, 2013.

SILVA, C. R. da. **Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2.** Tese (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2006.

SILVA, M. E da; FRANCO, T. T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. **Revista de Microbiologia**, Campinas – São Paulo, v. 30, n. 4, p. 324-331, nov. 1999.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MONTOVANI, F. M. L.; PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UHV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Thechnology**, v. 36, n. 7, p. 930-936, 2005.

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

SOUZA, H. F. de; BORGES, L. A.; SOARES, S. B.; BRANDI, I. V. **Uso do soro de leite suplementado para o cultivo de leveduras do gênero *Kluyveromyces*.** FEPEG 2018. Unimontes, Montes Claros – MG, 2017.

SURDIN, Y.; SLY, W.; SIRE, J.; BORDES, A. M. SZULMAJSTER, H. R. **Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochimica et Biophysica ACTA, Amsteram, 1965.

STOLIAR, M. **Whey ingredients in bakery products.** U.S. Dairy Export Council (USDEC Monography). Arlington, U.S.A, 2009.

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. SYRIOPOULOS, et al. Transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* physiology in the context of galactose assimilation perturbations. **Molecular BioSystems**, v. 4, n. 9, p. 937-949, out. 2008.

SZILAGYI, A. Review article: lactose – a potential prebiotic. **Alimentary Pharmacology Ther**, v.16, p. 1591-1602, out. 2002.

SZILAGYI, A. Review article: lactose – a potential prebiotic. **Alimentary Pharmacology Ther**, v. 16, p. 1591 – 1602, out. 2002.

TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentivo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica.** 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade

Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, 2017.

TEIXEIRA, S. M. B. **Elaboração de bebida láctea fermentada utilizando soro de ricota**. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais, 2002.

TORRES FILHO, A.; TONACO, A. S.; PAULA, B. A. de; MOREIRA, C. Q. **Guia técnico ambiental da indústria de laticínios**. Editoria Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais (FIEMG) e Fundação Estadual de Meio Ambiente (FEAM), 2014.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul: 967 p., Artmed, 2012.

VARGAS, N. S. de. **Produção de etanol empregando leveduras convencionais e termotolerantes**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo, 2017.

VAN DIJKEN, J. P.; WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 3, p. 343-352, 1993.

VANEGAS, J. M., et al. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 3, p. 507-516, fev. 2012.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza: Embrapa, 2013.

VIGNAGA, I. R. L. **Obtenção de etanol a partir da fermentação do permeado de soro de queijo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo – PR, 2017.

VUORISALO, T. et al. High lactose tolerance in north europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. **Perspectives in Biology and Medicine**, Baltimore, v. 55, n. 2, p. 163-174, 2012.

WAINWRIGHT M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: 240 p., Editorial Acribia, 1995.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons Ltd. England, 362 p., abr. 1998.

YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; ELHARCHE, S.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.1017-1029, 2 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6>.

ZACARCHENCO, P. B., et al. Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite & Derivados**, v. 23, n. 131, p. 48-55, 2012.

ANEXOS

1. Preparo de caldo YM (Extrato de levedura e malte)

Para preparo de 1000 mL de meio pesou-se:

- Extrato de malte: 3 g;
- Extrato de levedura: 3 g;
- Peptona: 5 g;
- Glicose: 10 g;
- Água destilada q.s.p. 1000 mL.

Dissolveu-se as substâncias em 600 mL de água e completou-se o volume até 1000 mL de solução. Dispensou-se em tubos com tampa de rosca e autoclavou-se (15 minutos a 121°C).

2. Preparo do Tampão K pH 7,6

- Fosfato de potássio monobásico 1,65 g L⁻¹;
- Fosfato de potássio dibásico dihidratado 11,58 g L⁻¹;
- Cloreto de magnésio hexahidratado 0,215 g L⁻¹;
- β-mercaptoetanol 3,67 g L⁻¹;

Ajustou-se o pH com hidróxido de potássio 0,1 M.

Tabela 7 - Atividade enzimática da β -galactosidase expressa por U_{ONPG} mL⁻¹ obtida durante 8 horas de fermentação em batelada do permeado de soro de leite com *Kluyveromyces marxianus* a partir do planejamento DCCR.

Ensaio	Atividade Enzimática (h)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	7,599	7,583	7,406	7,368	7,168	7,156	7,143	7,122
1	8,654	8,640	8,523	8,509	8,454	8,416	8,320	8,135
2	9,416	9,387	9,358	9,271	9,119	8,822	8,447	8,327
3	10,285	10,277	10,247	10,197	10,188	10,184	10,174	10,152
4	8,961	8,881	8,679	8,604	8,559	8,261	8,130	8,044
5	9,770	10,208	10,179	9,821	9,696	9,591	9,405	9,366
6	8,486	8,520	8,586	8,461	8,357	8,298	8,203	8,160
7	9,484	9,414	9,353	9,290	9,033	8,466	8,323	8,309
8	7,379	7,329	7,297	7,283	7,249	7,207	7,086	7,061
9	9,280	9,328	9,294	9,273	9,248	9,137	9,090	8,902
10	8,554	8,729	8,531	8,479	8,404	8,359	8,098	8,032
11	10,245	10,245	10,195	10,174	10,158	10,149	10,131	10,099
12	9,691	9,262	9,122	8,992	8,969	8,940	8,525	8,407
13	8,602	8,091	7,749	7,642	8,000	7,536	6,864	6,313
14	7,903	7,912	7,864	7,826	7,814	7,783	7,763	7,696
15	7,935	7,746	7,526	7,386	7,372	7,170	6,995	6,971
16	10,240	10,222	10,158	10,136	10,125	10,108	10,097	10,050
17	9,455	9,326	9,151	9,090	8,983	8,911	8,752	8,740

*Os Valores em negrito correspondem aos valores máximos de AE identificados por cultivo.

Fonte: Autor (2019).