



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALESSANDRA BOSSO

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E
PERMEABILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE
SACCHAROMYCES FRAGILIS PARA A PRODUÇÃO DE β -
GALACTOSIDASE VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE
UM PRODUTO PARA INTOLERANTES À LACTOSE**

ALESSANDRA BOSSO

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E
PERMEABILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE
SACCHAROMYCES FRAGILIS PARA A PRODUÇÃO DE β -
GALACTOSIDASE VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE
UM PRODUTO PARA INTOLERANTES À LACTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B745d Bosso, Alessandra.
Determinação das condições de cultivo e permeabilização das células de *Saccharomyces fragilis* para a produção de B-galactosidase visando o desenvolvimento de um produto para intolerantes à lactose / Alessandra Bosso. – Londrina, 2016.
118 f. : il.

Orientador: Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas - Aplicações industriais – Teses. 2. *Saccharomyces* – Teses. 3. Superfícies de resposta – Teses. I. Castro-Gómez, Raúl Jorge Hernan . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:577.15

ALESSANDRA BOSSO

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E
PERMEABILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES
FRAGILIS* PARA A PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO PARA INTOLERANTES À
LACTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro
Gómez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de dezembro de 2016.

*Aos meus pais Antonio e Jacira, minhas
irmãs Andréia e Adriana e meus sobrinhos
Miguel e Pedro, pelo amor, confiança, e
carinho incondicional transmitidos por toda
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me acompanha em todos os momentos da minha vida e pela graça de mais esta conquista.

Ao Professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez, pela estimada orientação, pela confiança e pelos ensinamentos, meu imenso respeito e admiração.

À minha irmã Adriana, pelo apoio e pela ajuda no desenvolvimento dessa tese, sem sua presença esse sonho não seria possível.

Ao amigo Lucas Caldeirão, pelo privilégio de tê-lo conhecido, agradeço pela amizade, companheirismo, paciência e pela ajuda em todos os momentos, minha eterna gratidão.

Aos amigos Mariah Ramos Benine, Leonardo Fonseca Maciel e Marli Busanello, agradeço por todos os momentos vividos, para sempre hei de carregá-los no coração.

Aos amigos que o doutorado me apresentou, Marsilvio Lima de Moraes Filho, Karla Bigetti Guergoletto, Naiara Ramos, Flávia Ruzon, Fernanda Farinazzo, Natália Niguma, Maria Thereza Fernandes, Sabrina Penteado, Raíssa Curti, minha profunda gratidão.

Aos amigos Mayara Armani, Flávia Fornaciari, Alcieli Reinauer, Daniele Horcesi, Giancarlo Silva e Rafaela Bassani, que apesar da distância foram de extrema importância para a realização desse doutoramento.

À amiga Isamélia Constâncio, pelo carinho, pelas palavras de incentivo, por acreditar que seria possível, pela amizade sincera, deixo registrada a minha profunda gratidão.

Aos meus cunhados Willian e Fernando, agradeço pela amizade.

À Professora Dra. Maria Inês Rezende por ter concedido o uso do Laboratório de Bioquímica para a realização de parte da tese.

À Professora Dra. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus, por ter concedido o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise e ao técnico Osvaldo Capelo pelo auxílio na execução da análise de microscopia.

Ao professor Hélio H. Sugimoto pelas primeiras orientações e por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa e pela docência.

Aos funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos.

À chefia, coordenação e docentes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e colaboração.

À CAPES pela concessão de bolsa de pós-graduação.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

BOSSO, Alessandra. **Determinação das Condições de Cultivo e Permeabilização das Células de *Saccharomyces fragilis* para a Produção de β -galactosidase Visando o Desenvolvimento de um Produto para Intolerantes à Lactose.** 2016. 118 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A enzima β -galactosidase hidrolisa a lactose presente no leite e derivados lácteos, aos seus monômeros. A ausência dessa enzima no organismo faz com que a lactose ingerida não seja hidrolisada causando uma síndrome denominada de intolerância à lactose. Diante desse contexto o objetivo do trabalho foi estudar e otimizar a produção de β -galactosidase de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 utilizando fontes de carbono, nitrogênio e sais, bem como o efeito da temperatura, pH e concentração do inóculo sobre a produção enzimática, além de otimizar a permeabilização celular utilizando diferentes solventes orgânicos objetivando a máxima hidrólise da lactose. A fim de estudar e otimizar o meio de fermentação na produção da enzima, um Planejamento Fatorial seguido de um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) foi realizado para avaliar as diferentes fontes de carbono (sacarose, soro de leite, lactose e glicose), nitrogênio (extrato de levedura e peptona) e sais ($MgSO_4$ e K_2HPO_4). Por meio da Metodologia de Superfície de Resposta foi possível concluir que a máxima atividade obtida (54,20 U/mL) foi alcançada com as concentrações de 14 g/L de sacarose, 17,7 g/L de soro de leite, 5,14 g/L de extrato de levedura e 8,85 g/L de peptona nas condições de 30°C, 180 rpm e 72 horas de fermentação. Também foi realizado um DCCR para a otimização dos parâmetros temperatura, pH e concentração do inóculo no processo de produção enzimática. Através da Metodologia de Superfície de Resposta em conjunto com os valores preditos concluiu-se que nas condições de 33°C, pH 6,3 e concentração do inóculo de 20% a atividade prevista pelo modelo foi 60,24U/mL. A validação do modelo foi realizada e uma atividade de 59,85 U/mL foi atingida sendo este valor correspondente a 99,4% do valor predito. Do mesmo modo um DCCR foi realizado para o estudo da otimização da permeabilização das células de *S. fragilis*. Os solventes utilizados foram etanol, acetona e clorofórmio e as variáveis estudadas concentração do solvente, temperatura e tempo, tendo a hidrólise da lactose como resposta. As melhores condições de permeabilização para os solventes etanol e acetona foram: 30%, 35°C e 40 minutos de tratamento, atingindo uma hidrólise da lactose de 73,53%. E 40% de solvente, temperatura de 39,05°C e 76,18 minutos de reação para alcançar uma hidrólise de 79,23% respectivamente. Para o clorofórmio as condições estabelecidas foram 4% do solvente, 25°C e 20 minutos de tratamento para uma hidrólise da lactose de 81,03%.

Palavras-chave: Intolerância à lactose. Lactase. Otimização. Superfície de resposta.

BOSSO, Alessandra. **Determination of the Cultivation of Conditions and Permeabilization of *Saccharomyces fragilis* Cells for the Production of β -galactosidase Aiming the Development of a Product for Lactose Intolerant.** 2016. 118 p. Doctoral Thesis Project (Doctor's degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The enzyme β -galactosidase hydrolyzes the lactose, present in milk and dairy products, to its monomers. The absence of this enzyme in organism make that ingested lactose does not be hydrolyzed, causing syndrome denominate lactose intolerance. The objective of this work was to study and optimize the β -galactosidase production from *Saccharomyces fragilis* IZ 275 using carbon sources, nitrogen and salts, as well as the effect of temperature, pH and inoculum concentration on enzymatic production, in addition to optimize the cell permeabilization using different organic solvents, aiming at the maximum lactose hydrolysis. In order to study and optimize the fermentation media for enzyme production, a Factorial Planning followed by a Central Composite Rotatable Design (CCRD) was performed to evaluate the different sources of carbon (sucrose, whey, lactose and glucose), nitrogen (Yeast extract and peptone) and salts (MgSO₄ and K₂HPO₄). Using the Response Surface Methodology, it was possible to conclude that the maximum activity obtained (54.20 U/mL) was achieved with the concentrations of 14 g/L of sucrose, 17.7 g/L of whey, 5.14 g/L yeast extract and 8.85 g/L peptone under the conditions of 30°C, 180 rpm and 72 hours of fermentation. A CCRD was also performed to optimize temperature, pH and inoculum concentration in the enzymatic production process. Using the Response Surface Methodology (RSM) and the predicted values, it was concluded that under conditions of 33°C, pH 6.3 and inoculum concentration of 20%, the activity predicted by the model was 60.24 U/mL. The model validation was performed and an activity of 59.85 U/mL was reached, corresponding to 99.4% of the predicted value. In the same way, a CCRD was performed to study the permeabilization of *S. fragilis* cells optimization. The solvents used were ethanol, acetone or chloroform, and the variables studied were solvent concentration (%), temperature (°C) and time (min), with lactose hydrolysis as response. The best conditions of cells permeabilization for the ethanol or acetone solvents were: 30% of ethanol, 35°C and 40 minutes of treatment, reaching a lactose hydrolysis of 73.53% and 40% of acetone, temperature of 39,05°C and 76,18 minutes of reaction to achieve a hydrolysis of 79,23%, for every experiment using the respective solvents. For chloroform the conditions were 4% solvent, 25°C and 20 minutes of treatment which conditions resulted in 81.03% of lactose hydrolysis.

Key words: Lactose intolerance. Lactase. Optimization. Response surface methodology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Lactose e seus monômeros, galactose e glicose.....23
- Figura 2.** Intolerância à lactose (digestão e má digestão da lactose).....25
- Figura 3.** Prevalência mundial de intolerância à lactose em populações27

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Superfície de Resposta para a atividade da β -galactosidase em função das concentrações de soro de leite e sacarose (A), sacarose e extrato de levedura (B), peptona e sacarose (C), extrato de levedura e soro de leite (D), soro de leite e peptona (E) peptona e extrato de levedura (F)61
- Figura 2.** Perfil de valor predito e perfil de Desejabilidade para a atividade da β -galactosidase em função das concentrações de sacarose, soro de leite, extrato de levedura e peptona.....63

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Reação de hidrólise enzimática da lactose através do uso da β -galactosidase73
- Figura 2.** Superfícies de Resposta para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).....84

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Superfícies de Resposta para DCCR utilizando etanol como solvente permeabilizante.....106
- Figura 2.** Superfícies de Resposta para DCCR utilizando acetona como solvente permeabilizante.....107
- Figura 3.** Perfil de valor predito e perfil de Desejabilidade para a hidrólise da lactose em função da concentração de etanol, temperatura e tempo108
- Figura 4.** Perfil de valor predito e perfil de Desejabilidade para a hidrólise da lactose em função da concentração da acetona, temperatura e tempo.....109

Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de células de *S. fragilis* IZ 275 sem permeabilização (A) e permeabilizadas com etanol (B), acetona (C) e clorofórmio (D)111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Características bioquímicas de β -galactosidases produzidas por microrganismos.....	31
------------------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Níveis codificados e decodificados das variáveis aplicadas no planejamento fatorial.....	50
Tabela 2.	Matriz do planejamento de máxima inclinação ascendente e máxima inclinação descendente	52
Tabela 3.	Variáveis independentes e seus níveis de variação no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 24 com dois pontos centrais e 8 pontos axiais, para ortogonalidade.....	53
Tabela 4.	Matriz decodificada do planejamento fatorial 24 com 3 pontos centrais e como variável resposta a atividade enzimática (U/mL)	55
Tabela 5.	Efeitos principais das variáveis independentes sobre a atividade enzimática	56
Tabela 6.	Matriz do DCCR codificada e decodificada em que X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7 e X8 são respectivamente, sacarose (g/L), soro de leite (g/L), extrato de levedura (g/L), peptona (g/L), lactose (g/L), glicose (g/L), MgSO ₄ (g/L) e K ₂ HPO ₄ (g/L) tendo a atividade enzimática como resposta (U/mL)	58
Tabela 7.	Análise de variância (ANOVA) para os termos da equação do modelo empírico para a atividade da β -galactosidase ($p \leq 0,05$).....	60
Tabela 8.	Validação do modelo empírico e teste t Student ($p > 0,05$).....	64

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Variáveis independentes e seus níveis de variação no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 23 com três pontos centrais e seis pontos axiais.....	79
Tabela 2.	Matriz do DCCR 23 para os níveis codificados dos parâmetros de temperatura (X1), pH (X2) e concentração de inóculo (X3)	79

Tabela 3.	Matriz do DCCR 23 decodificada para as variáveis independentes temperatura (X1), pH (X2) e concentração do inóculo (X3) tendo a atividade enzimática como resposta (U/mL)	81
Tabela 4.	Estimativa dos efeitos para a atividade da β -galactosidase utilizando DCCR.....	82
Tabela 5.	Análise de variância (ANOVA) para o modelo	83
Tabela 6.	Valores preditos da variável dependente	86
Tabela 7.	Teste t Student para a validação do modelo empírico ($p > 0,05$).....	87

CAPÍTULO 4

Tabela 1.	Variáveis independentes e níveis de variação no DCCR.....	101
Tabela 2:	Matriz do planejamento com as variáveis codificadas para o estudo de otimização da permeabilização celular de <i>Saccharomyces fragilis</i> IZ 275 tendo a hidrólise da lactose como resposta.....	103
Tabela 3.	Coeficientes e estatística F para modelos gerados a partir do planejamento experimental	105
Tabela 4.	Teste t Student para a validação do modelo empírico para o etanol ($p > 05$).....	109
Tabela 5.	Teste t Student para a validação do modelo empírico para a acetona ($p > 0,05$).....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Ágar batata dextrose
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association oficial analytical chemistis
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
GOS	Galactooligossacarídeo
GRAS	Generally Recognized As Safe
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ONPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotação por minuto
RSM	Response Surface Methodology
YM	Extrato de malte e levedura

SUMÁRIO

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVO.....	19
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	19
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	19
3.	REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		23
1.1	<i>Lactose</i>	23
1.2	<i>Hidrólise da lactose</i>	24
1.3	<i>Hidrólise Ácida</i>	26
1.4	<i>Hidrólise Enzimática</i>	26
1.5	<i>Intolerância à lactose</i>	26
1.6	<i>Classificação da Intolerância à lactose</i>	28
1.7	<i>Diagnóstico de intolerância à lactose</i>	28
1.8	<i>Tratamento da Intolerância à lactose</i>	29
1.9	<i>A Enzima β-galactosidase</i>	30
1.10	<i>Aplicações da β-galactosidase</i>	32
1.11	<i>Fontes de nutrientes e soro de leite</i>	33
1.12	<i>Cultivo Submerso</i>	34
1.13	<i>Permeabilização celular</i>	34
1.14	<i>Referência Bibliográfica</i>	35
CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE CULTIVO DE SACCHAROMYCES FRAGILIS UTILIZANDO SORO DE LEITE SUPLEMENTADO PARA A PRODUÇÃO DE B- GALACTOSIDASE¹		46
2.1	<i>INTRODUÇÃO</i>	47
2.1.1	<i>Intolerância à lactose</i>	47
2.1.2	<i>A enzima β-galactosidase</i>	47
2.1.3	<i>Microrganismos produtores de β-galactosidase</i>	48
2.1.4	<i>A importância comercial da enzima β-galactosidase</i>	48
2.1.5	<i>Meio de fermentação</i>	49
2.2	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	49
2.2.1	<i>Microrganismo e inóculo</i>	49
2.2.2	<i>Definição dos ingredientes do meio de produção</i>	50
2.2.3	<i>Planejamento de máxima inclinação ascendente e máxima inclinação descendente</i>	51

2.2.4	Determinação das melhores concentrações dos ingredientes e condições de cultivo para a maior produção da β -galactosidase utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	52
2.2.5	Extração da β -galactosidase	53
2.2.6	Determinação da atividade de β -galactosidase.....	54
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.3.1	Delineamento fatorial	54
2.3.2	Planejamento de máxima inclinação ascendente (<i>steepest ascent</i>) e máxima inclinação descendente (<i>steepest descent</i>).....	57
2.3.3	Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	57
2.3.4	Perfil de desejabilidade	62
2.3.5	Validação do modelo empírico	64
2.4	CONCLUSÃO	64
2.5	REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE UTILIZANDO A LEVEDURA SACCHAROMYCES FRAGILIS IZ 275²..... 72

3.1	INTRODUÇÃO	73
2.2.1	Lactose	73
2.2.2	Intolerância à lactose	73
2.2.3	A enzima β -galactosidase	74
2.2.4	Importância e aplicações da β -galactosidase	75
2.2.5	Influência do pH, temperatura e concentração do inóculo na produção da enzima lactase	76
2.2.6	Desenho experimental	77
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	77
3.2.1	Microrganismo e inóculo	77
3.2.2	Meio de produção	78
3.2.3	Determinação do pH, temperatura e concentração do inóculo	78
3.2.4	Desenho experimental	78
3.2.5	Extração da β -galactosidase	80
3.2.6	Determinação da atividade de β -galactosidase.....	80
3.2.7	Análise estatística	80
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1	Valores preditos	85
3.3.2	Validação do modelo	86
3.4	CONCLUSÃO	87
3.5	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	87

CAPÍTULO IV - ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA PERMEABILIZAÇÃO CELULAR DE SACCHAROMYCES FRAGILIS IZ 275 UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS³..... 97

4.1	INTRODUÇÃO	98
-----	-------------------------	----

4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	100
4.2.1	Microrganismo e inóculo.....	100
4.2.2	Meio de fermentação.....	100
4.2.3	Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) na Permeabilização celular	100
4.2.4	Permeabilização de células de levedura de <i>Saccharomyces fragilis</i> IZ 275	101
4.2.5	Determinação da hidrólise da lactose com células permeabilizadas	102
4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura	102
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.3.1	Perfil de desejabilidade	108
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	110
4.3.3	Estudo para o desenvolvimento de um produto para intolerantes à lactose	111
4.4	CONCLUSÃO.....	112
4.5	REFERÊNCIAS.....	113
	CONCLUSÃO GERAL	118

1. INTRODUÇÃO

A lactose é o principal carboidrato presente no leite. Sendo este um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e outra de galactose, unidas por uma ligação beta entre o carbono 1 da galactose e o carbono 4 da glicose (CAMPBELL, 2000). A quantidade de lactose no leite varia de acordo com a espécie, representando 5% do leite de vaca e 7% do leite humano (MORAES-FILHO, 2008; NAIM; STERCHI; LENTZE, 1987).

A lactose possui várias aplicações na indústria alimentar, estas aplicações estão relacionadas com algumas das suas propriedades, como os níveis baixos de doçura, sua tendência à cristalização, sua capacidade de acentuar sabor, seus atributos nutricionais, sua capacidade de participar da reação de Maillard e na hidrólise da lactose (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A hidrólise desse dissacarídeo, que é realizada pela enzima β -galactosidase, é um processo que possibilita o desenvolvimento de produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985).

A intolerância ocorre quando o organismo é incapaz de produzir a enzima β -galactosidase, necessária para quebrar a lactose em seus monossacarídeos, que será posteriormente metabolizada pelo organismo (ADHIKARI *et al.*, 2010).

Quando há a falta de enzima no organismo, a lactose, que é fonte de energia para os microrganismos do cólon, é fermentada à ácido láctico, metano (CH_4) e gás hidrogênio (H_2). Os gases produzidos criam uma sensação de desconforto por distensão intestinal, causando flatulência (WOOTEN, 2010). O ácido láctico produzido pelos microrganismos é osmoticamente ativo e trai a água para o intestino, assim como a lactose não digerida, resultando em diarreia (BERNE, 2004). A quantidade de lactose que irá causar sintomas pode variar para cada indivíduo, dependendo da dose, o grau de deficiência da enzima e a forma do alimento consumido (HEYMAN, 2006).

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, é classificada como hidrolase e catalisa a reação de hidrólise da lactose (BLANCH; CLARK, 1997).

As β -galactosidases estão distribuídas na natureza como, vegetais, órgãos de animais e microrganismos. As bactérias, leveduras e fungos filamentosos são exemplos de outras fontes de lactases obtidas por microrganismos produtores de lactase (ALMEIDA; PASTORE, 2001; SANTIAGO *et al.*, 2004).

O uso de β -galactosidase para produção de leite e derivados com teor reduzido de lactose, tem aumentado a cada ano, estimulado pela grande quantidade de indivíduos intolerantes à lactose que buscam esses produtos e também pela necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de leite (MAHONEY, 1997).

As β -galactosidases apresentam diferenças em suas propriedades. As enzimas provenientes de fungos filamentosos atuam em pH mais ácidos (pH 3,0 a 5,5) e temperaturas elevadas (50 a 60°C), já as lactases oriundas de leveduras atuam em faixa de pH mais neutro (pH 6,0 a 7,5) e temperaturas amenas (30 a 37°C) (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005). Para produção de β -galactosidase é necessário avaliar o meio de fermentação em que esta enzima será produzida. Os meios nutricionais devem conter uma fonte de carbono, como exemplo, soro de leite, lactose e sacarose entre outras. A literatura relata, que associada à fonte de carbono, utiliza-se também fontes de nitrogênio e de sais (MARIOTTI *et al.*, 2008).

A enzima β -galactosidase é caracterizada como uma enzima intracelular, desta forma a utilização de células de leveduras íntegras é dificultada pela baixa permeabilidade da membrana celular (ABRAHAM; BHAT, 2008). Uma alternativa para solucionar essa questão consiste em utilizar células de leveduras íntegras com uma permeabilidade aumentada através do processo de permeabilização que é a técnica de modificação da membrana celular (VENKATESHWARAN *et al.*, 1999). Nesse processo a estrutura da membrana é alterada sob influências de fatores de permeabilização como temperatura, tempo e concentração de solvente, de tal modo que são formados poros na membrana, o que permite a passagem de substratos e a difusão de produtos nestas células (BERLOWSKA *et al.*, 2006; PANESAR, 2008).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- Determinar as melhores condições de produção e permeabilização da enzima β -galactosidase utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar as condições de produção da enzima β -galactosidase a partir da levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275 empregando soro de leite suplementado com outras fontes de carbono, nitrogênio e sais;
- Otimizar o meio nutricional com a finalidade de alcançar a máxima atividade enzimática;
- Estudar e otimizar a produção enzimática da β -galactosidase em relação aos parâmetros: temperatura, pH e concentração do inóculo tendo como resposta a máxima atividade enzimática;
- Determinar as melhores condições de otimização para a permeabilização das células da levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275, utilizando os solventes orgânicos etanol, acetona e clorofórmio para obtenção da máxima hidrólise da lactose.

3. REFERÊNCIAS

ABRAHAM J.; BHAT S. G. Permeabilization of baker's yeast with N-lauroylsarcosine. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 35, p. 799-804, 2008.

ADHIKARI, K.; DOOLEY, L. M.; CHAMBERS, E.; BHUMIRATANA, N. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n.1, p.113–118, 2010.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: Produção e Efeitos Benéficos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: SBTCA, v. 35, p. 12-19, 2001.

BERLOWSKA, J.; KREGIEL, D.; KLIMEK, L.; ORZESZYNA, B.; AMBROZIAK, W. Novel yeast cell dehydrogenase activity assay in situ. *Polish J Microbiol*, v. 55, p. 127-131, 2006.

BERNE, R. M.; *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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

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

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. *Química de Alimentos de Fennema*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GEKAS, V. E.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of Lactose – A Literature Review. *Process Biochemistry*, v.20, p.2–12. 1985.

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

HEYMAN, M. B.; Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, v. 118, n. 3, p. 1279-1286. 2006.

MAHONEY, R. R. Lactose: enzymatic modification. In P. F. Fox (Eds.), *Lactose, water, salts and vitamins (Advanced Dairy Chemistry, v. 3, p. 77-125)*. New York: Springer, 1997.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAÚJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized. *Brazilian Archives of Biology and Technology na International Journal*, v. 51, n. 6, p. 1223 – 1240, 2008.

MORAES-FILHO, J. *Tratado das enfermidades gastrintestinais e pancreáticas*. São Paulo: Roca, 2008.

NAIM, H., STERCHI, E.; LENTZE, M. Biosynthesis and a maturation of lactase phlorizin hydrolase in the humans small intestinal epithelial cells. *Biochem J.*, v. 241. p. 427-434, 1987.

PANESAR, P. S.; Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. *Biochem Eng J.*, v. 39, p. 91-96, 2008.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, 2004.

VENKATESHWARAN, G.; SOMASHEKAR, D.; PRAKASH, M. H.; AGRAWAL, R.; BASAPPA, S. C.; JOSEPH, R. Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*, v. 34, p. 187- 191, 1999.

WOOTEN, W. J.; Lactose Intolerance and Ethnic Prevalence. In: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Lactose Intolerance and Health, Kensington: National Institutes of Health, p. 49- 52, 2010.

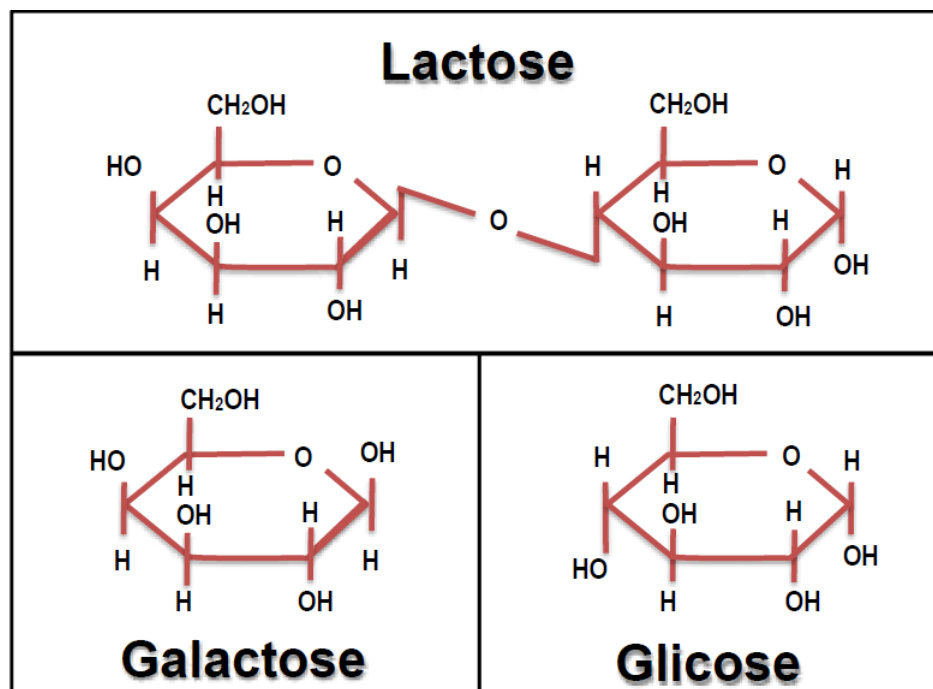
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lactose

A lactose ou β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucose é um carboidrato encontrado naturalmente no leite, no soro de leite e em outros produtos lácteos, está presente no organismo de mamíferos e é formada nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue (CAMPBELL, 2000; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). A lactose que tem fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ é constituída pelos monossacarídeos glicose e galactose ligadas covalentemente por uma ligação O-glicosídica (Figura 1) (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; NELSON; COX, 2013; SANTOS, 2011).

A lactose é o componente majoritário do extrato seco do leite de vaca, aproximadamente 40 a 50% e no soro de leite em torno de 70 a 80%. A concentração de lactose no leite varia entre os mamíferos de 2,0 a 8,5%. E no leite humano é encontrada na proporção de 7% (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

Figura 1 - Lactose e seus monômeros, galactose e glicose.



Fonte: WATTIAUX (2006).

Esse dissacarídeo está presente no leite e em outros produtos lácteos não fermentados. Já produtos como iogurtes e queijos, alimentos lácteos que sofreram algum tipo de fermentação, oferecem menor teor de lactose, pois parte é convertido em ácido láctico ou outros compostos (PARIZZI, 2015).

A lactose apresenta propriedades físicas e químicas que podem ser desejáveis ou indesejáveis para a indústria de alimentos (ZADOW, 1984). Como características desejáveis pode-se citar o aumento da produção benéfica de ácido láctico no intestino, realce do sabor em alguns produtos, a ocorrência da reação de Maillard, o que é desejável para produtos de panificação e a baixa higroscopicidade (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Já como características indesejáveis pode-se enumerar o seu baixo poder adoçante quando comparado com outros açúcares, baixa solubilidade o que pode ocasionar problemas de cristalização da lactose, baixa digestibilidade para alguns indivíduos e necessidade de hidrólise para sua absorção (ADAM *et al.*, 2004; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

A lactose é utilizada no metabolismo dos mamíferos logo depois sua hidrólise, sob ação da enzima β -galactosidase que hidrolisa a ligação β 1-4 (CAMPBELL, 2000). É no intestino delgado, no nível do jejuno, que é segregada a β -galactosidase. Esta desdobra a lactose em glicose e galactose fazendo com que a absorção intestinal seja possível (SANTIAGO; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, GARCÍA-JUNCEDA 2000).

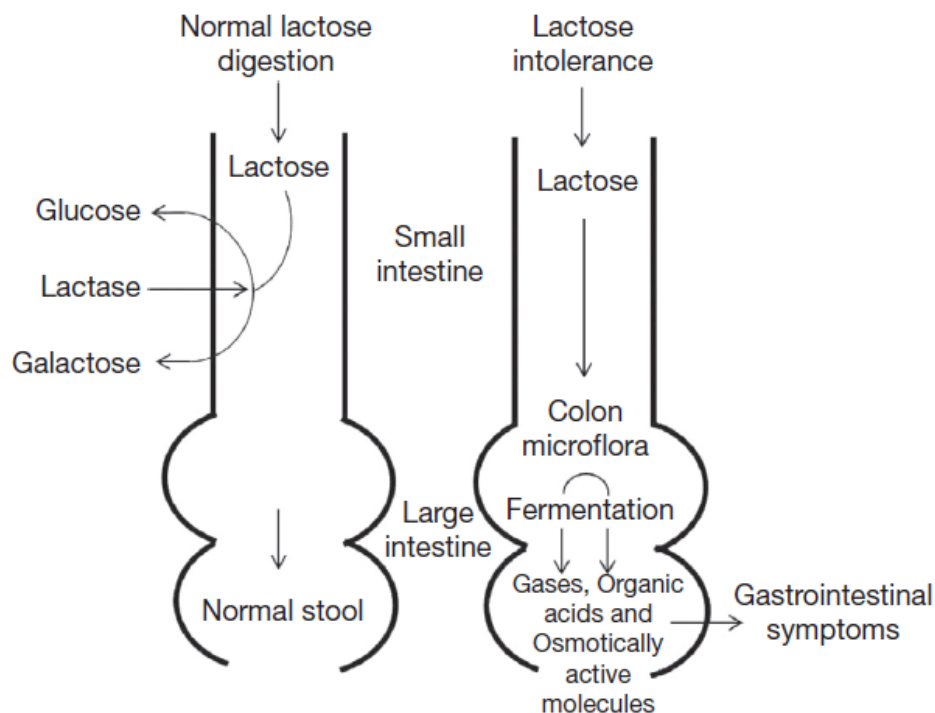
1.2 Hidrólise da lactose

Indivíduos que possuem capacidade de atividade lactásica muito baixa ou ausente desenvolvem sintomatologia digestiva após a ingestão de leite e derivados, pois a lactose não é desdobrada no intestino delgado, não sendo absorvida (FAEDO, 2013; HUSAIN, 2010)

Dessa forma, a pressão osmótica do intestino aumenta, e quantidade considerável de água é retirada dos tecidos vizinhos. Então, a lactose passa para o intestino grosso, onde é fermentada por grupos microbianos produtores de gases e água, ou é hidrolisada por bactérias em ácidos orgânicos de cadeia curta (FERREIRA, 1997) (Figura 2). Os gases que não são absorvidos causam inchaço e os ácidos produzidos irritam a parede intestinal aumentando a

motilidade, que combinada com a água secretada no intestino resulta em diarreia (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011; FERREIRA, 1997; LONGO, 2006).

Figura 2- Intolerância à lactose (digestão e má digestão da lactose)



Fonte: LULE *et al.* (2016)

A β -galactosidase, ao contrário de outras dissacaridases, como sacarase e maltase, não é uma enzima adaptativa, ou seja, seus níveis não variam de acordo com a quantidade de carboidrato ingerido (LOPEZ, 2009).

Uma das alternativas para ampliar a utilização desse carboidrato é hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos constituintes glicose e galactose, com finalidade de produzir um açúcar mais doce, mais facilmente fermentável e mais solúvel, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose. É importante também do ponto de vista nutricional, possibilitando um leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digerível para indivíduos com problemas relacionados a intolerância à lactose (LONGO, 2006; MAHONEY, 1998). A hidrólise da lactose pode ocorrer de duas maneiras

principais: via ácida ou enzimática (ADAM; RUBIO-TEXEIRA; POLAINA, 2004; HUSAIN, 2010).

1.3 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, em condições operacionais severas de pH e temperatura ($1 < \text{pH} < 2$; $100^{\circ}\text{C} < \text{temperatura} < 150^{\circ}\text{C}$) (SANTIAGO, 2002). Devido a essas características, a hidrólise ácida tem a aplicação comercial restrita na indústria alimentícia, devido ao uso de catalisadores ácidos que acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, produção de subprodutos indesejáveis e desnaturação de proteínas (ÖZBEK; SENER; APAR, 2006).

1.4 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é realizada em condições operacionais mais brandas de pH e temperaturas ($3,5 < \text{pH} < 8,0$; $5^{\circ}\text{C} < \text{temperatura} < 60^{\circ}\text{C}$) (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985). Possibilita a redução de alterações de compostos sensíveis ao calor, as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e também a formação de subprodutos indesejáveis (AL-MUFTA; ABU-REESH, 2005; BAILEY; OLLIS, 1986).

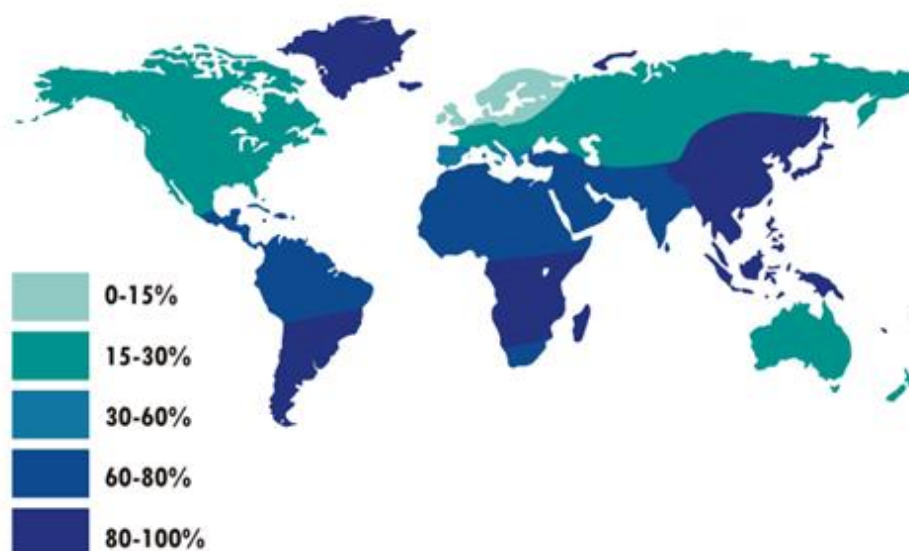
Dessa forma a hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos, apresentando diversos benefícios e vantagens principalmente nas áreas de tecnologia de alimentos, meio-ambiente e saúde, possibilitando a hidrólise da lactose presente no leite e seus derivados, possibilitando assim indivíduos as intolerantes a este açúcar (JURADO *et al.*, 2002; RAMÍREZ; RIVAS, 2003).

1.5 Intolerância à lactose

O termo intolerância à lactose se refere a uma síndrome clínica que se caracteriza pela incapacidade do indivíduo de absorver a lactose presente no leite e em seus derivados, motivada pela falta ou deficiência da enzima β -

galactosidase no sistema digestivo (BACELAR JÚNIOR; KASHIWABARA; DA SILVA, 2013; SILVA; LOPES, 2015). A intolerância é composta por um ou mais sintomas como: dor abdominal, diarreia, náusea, flatulência (SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002). Quando sistêmicos, podem oferecer outros sintomas, secundários, que se caracterizam por dores de cabeça, dificuldades de concentração e redução de memória, dores musculares, arritmia cardíaca, úlceras bucais e reações alérgicas, como rinites, eczemas, sinusite e asma (DIEKMANN; PFEIFFER; NAIM, 2015). A quantidade de lactose ingerida para que se desencadeiem os sintomas varia para cada indivíduo, e depende também do grau de intolerância e da composição nutricional do alimento no qual a lactose está inserida (TUMAS; CARDOSO, 2008). Relata-se que em torno de 75% da população mundial apresenta intolerância à lactose (Figura 3). Torres (2004) afirma que aproximadamente 70% dos descendentes de africanos, 95% dos asiáticos e 53% dos hispânicos são intolerantes à lactose, enquanto apenas 10% dos americanos brancos possuem a patologia. No Brasil cerca de 57% da população branca apresenta intolerância, mas o número é maior entre os brasileiros negros (80%) e de origem japonesa que chega quase a totalidade (GASPARIN; TELES; ARAÚJO, 2010).

Figura 3 - Prevalência mundial de intolerância à lactose em populações



Fonte: FOOD INTOLERANCE NETWORK (2016)

1.6 Classificação da Intolerância à lactose

Existem três classes de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos. A deficiência congênita, deficiência primária ou ontogenética e intolerância secundária oriunda de doenças intestinais; (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006).

Deficiência congênita: É uma patologia genética rara e manifesta-se em recém-nascidos, logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. A quantidade enzima β -galactosidase nesses neonatos é muito baixa ou ausente (WOOTEN, 2010). Se não diagnosticada o recém-nascido pode vir a óbito (GASPARIN; TELES; ARAÚJO, 2010).

Intolerância primária ou ontogenética: É uma condição permanente. Esta condição é determinada geneticamente e tem origem na redução da atividade da lactase. Desenvolve-se naturalmente, ao longo do tempo, com a diminuição da produção de β -galactosidase desde a infância até a idade adulta, sendo essa classe de intolerância a que predomina na população mundial (MATTAR; MAZO, 2010; TÉO, 2002).

Intolerância secundária: É uma condição temporária. A atividade da lactase é reduzida devido a doenças ou lesões que prejudicam a mucosa intestinal como por exemplo doença celíaca não tratada, doença de Chron, e gastroenterite. Nesse caso quando a doença ou a lesão se cura, a atividade da β -galactosidase é recuperada (LABAYEN *et al.*, 2001; TURSI *et al.*, 2006).

1.7 Diagnóstico de intolerância à lactose

O diagnóstico da intolerância à lactose não é simples, pois a sintomatologia é inespecífica (TULLA, 2000). O diagnóstico baseia-se em anamnese com o paciente e também com os seguintes exames:

pH fecal e pesquisa de substâncias redutoras nas fezes: o exame é realizado verificando-se o pH fecal do indivíduo. Considera-se sugestivo para intolerância à lactose achados de $\text{pH} \leq 5$ e substância redutora $\geq 0,5\text{g}\%$ (BARBIERI; KODA, 1986).

Teste de absorção de lactose pela sobrecarga oral: o teste consiste na ingestão de uma determinada quantidade de lactose e posterior registro do aumento da glicemia através do exame sanguíneo.

Teste do H₂ expirado com sobrecarga oral de lactose: Atualmente o teste de escolha por ser sensível e específico, de fácil execução e não invasivo. Cerca de 20% do H₂ formado durante a fermentação bacteriana no nível do cólon é absorvido e eliminado pelos pulmões, podendo, portanto, ser medido por cromatografia gasosa. A elevação dos níveis de H₂ no ar expirado indica um defeito na digestão ou absorção de carboidratos (HERCOWITZ, 1996).

Teste genético: Exame mais recente para diagnosticar a intolerância à lactose. É rápido, não invasivo, não requer jejum e ingestão de lactose. Necessita apenas de uma pequena amostra de sangue e seu DNA é estudado para verificar se há mutação em relação à produção da enzima lactase/florizina-hidrolase (BULHÕES *et al.*, 2007).

1.8 Tratamento da Intolerância à lactose

Até o momento não há relatos de cura para a intolerância à lactose, contudo pode-se atenuar os sintomas (PACHECO, 2010). Alternativas alimentares são importantes, pois para pessoas com má absorção de lactose, normalmente, a única escolha é abster-se desse dissacarídeo para evitar os sintomas (SHAW; DAVIES, 1999).

Para a maioria dos indivíduos intolerantes, um copo de leite é suficiente para desencadear os sinais, embora os que possuem alta sensibilidade possam desencadear os sintomas com baixíssimas doses de lactose, como as presentes em remédios por exemplo (HEYMAN, 2006).

Portanto, para indivíduos portadores dessa patologia recomenda-se evitar o consumo de leite e seus derivados ou fazer uso de leite e derivados com lactose reduzida ou ausente (CUNHA *et al.*, 2007; SILVEIRA; PRETTO, 2003).

Outra alternativa para minimizar os efeitos causados pela intolerância é a administração de enzimas β -galactosidases em diferentes formas

farmacêuticas, afim de complementar o trato gastrointestinal do indivíduo capacitando-o a receber doses de lactose (SAAD, 2006).

1.9 A Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase [β -D-galatosídeo, galactohidrolase E.C. 3.2.1.23], comumente conhecida como lactase, pertence ao grupo das enzimas conversoras de sacarídeos da família das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$) dando origem a uma mistura equimolecular de glicose e galactose (GROSOVA; ROSENBERG; REBROS, 2008; JURADO *et al.*, 2002).

A β -galactosidase pode ser obtida a partir de uma grande variedade de fontes, como microrganismos, plantas ou células animais (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Em plantas particularmente em amêndoas, pêsego, damasco, maçã, em órgãos de animais tais como intestino, cérebro, testículos, placenta. Também são produzidas por uma grande quantidade de microrganismos tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos filamentosos as fontes preferidas para aplicações comerciais (RUBIO-TEIXEIRA, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2004).

A legislação brasileira específica, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase, utilizada na indústria de alimentos, deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2006). Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias.

β -galactosidases originadas de microrganismos são as mais interessantes do ponto de vista tecnológico, apresentando amplas vantagens como fácil manuseio e elevada produção (MARTINS; BURKERT, 2009).

As propriedades das β -galactosidases dependem de diversos fatores que variam de acordo com sua origem e microrganismo produtor (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; SANTOS; LADERO; GARCIA-OCHOA, 1998). O peso molecular, comprimento da cadeia de aminoácidos, posição do sítio ativo, pH

ótimo e termoestabilidade são características significativamente influenciadas pela fonte microbiana produtora da enzima (NATH *et al.*, 2014).

De acordo com a fonte utilizada suas características cinéticas em função da temperatura e pH podem variar (Tabela 1). São fatores que influenciam na velocidade de reação da catálise enzimática (RODRIGUEZ-NOGALES, DELGADILLO-LÓPEZ, 2005).

Tabela 1 - Características bioquímicas de β -galactosidases produzidas por microrganismos

Fontes	pH ótimo	Temperatur a ótima (°C)	Massa molar (kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50 – 55	90
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	201
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,0 – 7,6	35	135
<i>Echerichia coli</i>	7,2	40	540
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60 – 65	-----
<i>Bacillus SP</i>	6,8	65	-----
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7,0	42 – 45	-----
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 – 57	530
<i>Streptococcus thermophilus</i>	65 - 75	55	500 – 600
<i>Mucor pusillus</i>	4,5 – 6,0	60	-----
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 – 5,5	80	570

Fonte: GEKAS, LÓPEZ-LEIVAS (1985)

Quando existe um aumento da temperatura, espera-se um aumento na atividade da enzima, devido às colisões entre enzima/substrato. No entanto, quando a temperatura é demasiadamente alta, a atividade enzimática é prejudicada e pode haver a sua desnaturação, pois as colisões se tornam desfavoráveis à enzima (FAEDO, 2013). Outro fator a considerar é que a

temperatura ótima de operação da β -galactosidase depende de sua origem. As enzimas lactases provenientes de fungos filamentosos possuem maior atividade e maior estabilidade em temperaturas elevadas (50 – 60°C) quando comparadas às β -galactosidases oriundas de leveduras que são favorecidas por temperaturas brandas (30 -37°C) (RECH *et al.*, 1999; WHITAKER, 1994).

O pH operacional é uma característica que define a aplicação de uma dada β -galactosidase. As de fungos filamentosos possuem pH de atuação entre 3,0 e 5,0. Já as β -galactosidases de leveduras possuem pH ótimo próximo a neutralidade (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA 1985; HOLSINGER; KLIGERMAN, 1991).

Entre os vários microrganismos produtores de β -galactosidase, as leveduras são uma importante fonte, possui pH adequado para hidrólise da lactose de leite e também no soro de leite e alto rendimento (HUSAIN, 2010; KONDO *et al.*, 2000).

1.10 Aplicações da β -galactosidase

A utilização de microrganismos na produção da enzima β -galactosidase tem atraído as indústrias (ALVES *et al.*, 2010). A lactase é uma das enzimas mais promissoras empregadas em processos industriais, e tem diversas aplicações nas indústrias de alimentos, de fermentações e em laticínios (KAUR *et al.*, 2009; PANESAR, 2008; TREVISAN, 2008). Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em dois monossacarídeos glicose e galactose, obtendo alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes (SANTIAGO *et al.*, 2004). Além deste aspecto, o emprego da enzima na fabricação de doce de leite, sorvetes e leite condensado proporciona melhora da textura do produto por de se evitar a cristalização da lactose (KLEIN, 2010). Já na indústria farmacêutica o emprego da enzima está no desenvolvimento de produtos contendo β -galactosidase, capazes de garantir a reposição da enzima para suprir a deficiência dos organismos em produzir a enzima (MONTALTO *et al.*, 2006). Além da aplicação para hidrolisar a lactose, a lactase pode agir sob outra via química de modo a transgalactosar a galactose, gerando galactooligossacarídeos – GOS

(KLEIN *et al.*, 2012). Os GOS são formados por lactose e unidades de galactose e são compostos não digestíveis e não degradados pelas enzimas digestivas humanas (MARTINS ; BURKERT, 2009).

1.11 Fontes de nutrientes e soro de leite

Devido ao alto custo para a obtenção da enzima β -galactosidase, é preciso utilizar meios de fermentação mais acessíveis para sua produção. Diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais são usadas para essa finalidade (MADDIPATI *et al.*, 2011).

A manutenção e o transporte dos nutrientes do meio de fermentação para o interior da célula influenciam no crescimento celular e nos produtos resultantes (DINIZ, 2009; MAO *et al.*, 2005). A produção da enzima β -galactosidase necessita de substratos para o processo fermentativo quando realizado por leveduras. No entanto o meio de produção pode ter um alto custo (SCHOLZ, 2011).

Diante de diferentes fontes de nutrientes para produção de β -galactosidase, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas com diferentes fontes de carbono, nitrogênio, sais e suas interações para a produção enzimática da lactase. (BRAGA; GOMES; KALIL, 2012; MANERA *et al.*, 2011).

O soro de leite é um subproduto do processo produtivo de queijo e representa aproximadamente 90% do volume do leite (PEDRO; GUIMARÃES; TEIXEIRA, 2010), esse coproduto pode criar um grave problema ambiental em função da grande carga orgânica remanescente, pois apresentam elevados valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). A hidrólise da lactose agrega valor ao soro de leite, resolvendo parte dos problemas causados pela lactose (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

O soro é uma abundante fonte de carbono, pois a lactose é seu principal componente, assim o produto pode ser utilizado para a produção da enzima β -galactosidase. Além da lactose, o soro possui constituintes como vitaminas, minerais e proteínas (KOSSEVA *et al.*, 2009). O estudo das melhores condições em processos fermentativos aeróbios para produção da enzima β -galactosidase vêm sendo considerada uma alternativa viável para a destinação

final do soro de queijo (MANERA *et al.*, 2011; SCHOLZ, 2011; BRAGA; GOMES; KALIL, 2012).

1.12 Cultivo Submerso

A produção de enzimas se faz majoritariamente por meio de fermentação submersa, embora também haja a utilização de fermentação em estado sólido, mas em menor escala. Na produção enzimática o cultivo submerso é o mais adequado (LIMA, 2012).

As fermentações requerem inicialmente um substrato ou nutrientes, que podem ser utilizados puros ou parte da composição de misturas complexas (AKTAS *et al.*, 2006). O uso de subprodutos proporciona um valor de nutrientes potencialmente mais econômicos que o uso de substratos puros (WAINWRIGHT, 1995).

Muitos autores citam subprodutos potencialmente fornecedores de nutrientes, entre eles: soro de leite, melaço de cana, água de maceração de milho, entre outros. O uso dessas matérias pode reduzir o custo na produção enzimática (FURLAN; SCHNEIDER.; MER 2000; SANTIAGO *et al.*, 2004).

1.13 Permeabilização celular

Cada microrganismo possui suas próprias características em relação à localização das enzimas produzidas. Essas enzimas podem estar localizadas no citoplasma, periplasma ou no interior de alguma organela celular. Diante disso cada microrganismo pode necessitar de uma forma de extração distinta (ANSEJO; ANDREWS; HUANG, 1991; SANTIAGO *et al.*, 2004). A β -galactosidase produzida por leveduras tem como característica ser uma enzima intracelular, o que a torna limitada em aplicações industriais (PANESAR, 2008). Para a obtenção de células livres é necessário que haja a ruptura dessas células, mas esse processo pode causar a inativação da enzima. Uma alternativa para essa condição é a permeabilização das células para que assim o estudo das reações enzimáticas intracelulares possa ser realizado (ALAMÄE; JÄRVISTE, 1995). Na técnica de permeabilização celular a estrutura da célula é modificada para torná-la mais porosa e assim permitir que pequenas

moléculas como os substratos ou os produtos atravessassem livremente (SOMKUTI; STEINBERG, 1994). O processo de permeabilização é rápido, relativamente simples e permite que os ensaios de enzimas sejam realizados em condições semelhantes ao processo *in vivo*. As células permeabilizadas podem ser consideradas fontes de enzimas insolúveis que poderiam ter uso semelhante às enzimas imobilizadas por metodologias tradicionais (WANG; HETTWER, 1986).

1.14 Referência Bibliográfica

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

ALAMAE, T; JARVISTE, A. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study. *Journal of Microbiological Methods*, v. 22, p. 193-205, 1995.

AL-MUFTAH, A. E., ABU-REESH, I. M. Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, n.2, p.139–153, 2005.

ALVES, F. G.; FILHO, F. M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Maximization of β -galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Applied Biochemical Biotechnological*, v. 160, p. 1528–1539, 2010.

AKTAS, N.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M.; TANYOLAC, A. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM) 504, *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2252-59, 2006.

ANSEJO, J. A.; ANDREWS, B. A.; HUANG, R. B. Differential product release (DPR) of proteins from yeast a new technique for selective product recovery. *Biotechnology. Bioengineering.* v. 38, p. 977, 1991.

BACELAR JÚNIOR, A. J.; KASHIWABARA, T. G. B.; DA SILVA, V. Y. N. E. Intolerância a lactose -Revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.4, n.4, p.38-42, 2013.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. New York, 1986.

BARBIERI, D.; KODA, Y. K. L. Diarreia crônica: procedimentos diagnósticos. In Barbieri D, Koda YKL. *Diarreia crônica na infância. Monografias médicas – Série Pediatria. VXXVIII.* São Paulo: Sarvier, p 41-73, 1986.

BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 4, n. 1, p. 81-86, 2011.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. G.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food Bioprocess Technology*, v. 5, p. 1653-1663, 2012.

BRASIL, M. D. S. Resolução RDC nº. 205. *Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.* Brasília, 2006.

BULHÕES, A. C.; GOLDANI, H.; MATTE. U.; SILVEIRA, T. R.; Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A – 22018 mutations of the lactase – phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult type hypolactasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40, p.1441-1446, 2007.

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

CUNHA, L. R. da. SOARES, N. F. F.; ASSIS, F. C.C.; MELO, N. R.; PEREIRA, A. F.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 23-26, 2007.

DIEKMANN, L.; PFEIFFER, K.; NAIM, H. Y. Congenital lactose intolerance is triggered by severe mutations on both alleles of the lactase gene. *BMC gastroenterology*, v. 15, 2015.

DINIZ, R. H. S. Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, MG – Brasil, 2009.

FAEDO, R., Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. *Revista CIATEC – UPF*, v.3, n. 1, p. 44-54. 2013.

FARIAS, F. F.; FAGUNDES-NETO, U. Intolerância aos carboidratos. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition, and Liver Diseases*, v. 8, n. 4, 2004.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. *Química de Alimentos de Fennema*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, C. L. L. F. Capítulo 1: Valor Nutritivo e Bioterapêutico de Leites Fermentados. IN: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. *Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado*, Campinas: ITAL, p. 1-7,1997.

FOOD INTOLERANCE NETWORK. Disponível em: <http://www.food-intolerance-network.com/food-intolerances/lactose-intolerance/ethnic-distribution-and-prevalence.html>. Acesso em: 28/11/2016.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. S.; MER. Formulation of a lactose-free,

low-cost culture medium for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 589 - 593, 2000.

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

GASPARIN, F. S. R.; TELES, J. M.; ARAÚJO, S. C. Alergia a Proteína do Leite de Vaca Versus Intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.3, n.1, p. 107-117, 2010.

GEKAS, V. E.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of Lactose – A Literature Review. *Process Biochemistry*, v. 20, p. 2–12. 1985.

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised beta-galactosidase in food industry - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

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

HERCOWITZ, L. H. Provas de absorção de hidratos de carbono. In: Barbieri, D.; Koda Y. K. L. *Doenças gastroenterológicas em pediatria*. São Paulo: Atheneu, p.513-8, 1996.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, v. 118, n. 3, p. 1279-1286. 2006.

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

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, p. 41-62, 2010.

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

KAUR, G.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KUMAR, H. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 32, n. 1, p. 63-67, 2009.

KLEIN, M. P. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS – Brasil, 2010.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of beta-Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 8, p. 2456-2464, 2012.

KONDO, A.; LIU, Y.; FURUTA, M.; FUJITA, Y.; MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 806-811, 2000.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, p. 437-47, 2009.

LABAYEN, I.; FORGA, L.; GONZALEZ, A.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; NUTR, R.; MARTINEZ, J. A. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. v. 5, p. 543-549, 2001.

LIMA, A. F. Imobilização de uma β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2012.

LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurte. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOPEZ, F. A. Os dilemas da intolerância à lactose. *Ades atualiza*, n. 2, 2009.

LULE, V. K.; GARG, S.; TOMAR, S. K.; KHEDKAR, C. D.; NALAGE, D. N. *Food Intolerance: Lactose Intolerance*. Elsevier, 2016.

MADDIPATI, P.; ATIVIEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by *Clostridium* P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource technology*, v. 102, p. 6494 – 6501, 2011.

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

MANERA, A. P.; ORES, J. da C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Acta Scientiarum Technology*, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2011.

MAO, X.; EKSRIWONG, T.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG, J. J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivations of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1667–1672, 2005.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATTAR, R., MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. Revista. Associação. Medica Brasileira. v. 56, p. 230-236, 2010.

MONTALTO, M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; VASTOLA, M.; CAMMAROTA, G.; MANNA, R.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. Management and treatment of lactose malabsorption. World Journal of Gastroenterology, v. 12, n. 2, p. 187-191, 2006.

NATH, A.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v.9, n.3, p. 330-48, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman, 2013.

ÖZBEK, B.; SENER, N.; APAR, D.K. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β - galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*. v. 41, p. 1493–1500, 2006.

PACHECO, S. Contorne a intolerância. Zero Hora. Porto Alegre, p.8, 2010.

PANESAR, P. S. Application of response surface methodology for maximal lactose hydrolysis in whole milk using permeabilized yeast cells. *Acta Alimentaria*, v. 37, n. 2, p. 191- 203, 2008.

PARIZZI, P. C.; Imobilização de b- galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise da lactose. Dissertação. Ciência e tecnologia de LIMENTOS. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2015.

PEDRO, M. R.; GUIMARÃES, J.A.; TEIXEIRA, L.D. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey, *Biotechnology Advances*, Braga, v. 28, p. 375-384, 2010.

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

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

RAMÍREZ, M. A. L.; RIVAS, N. Producción y caracterización parcial de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 53, n.2, p.194-201, 2003.

RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A. and AYUB, M.A.Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 91-96, 1999.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M.; DELGADILLO-LÓPEZ, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by dehydration-hydration method. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 33, p. 15-21, 2005

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

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n.1, p. 1- 16, 2006.

SANTIAGO, P. A. Contribuição ao estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2002.

Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, 2004.

SANTIAGO, R.D., FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A., GARCÍA-JUNCEDA, E.: Enzymatic synthesis of disaccharides by β -galactosidase-catalyzed glycosylation of a glycocluster. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 11, p. 71–79, 2000.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 7, p. 558-67, 1998.

SANTOS, W.O. Participação de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliácrlato de sódio. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

SCHOLZ, E. B. Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC – Brasil, 2011.

SHAW, A. D.; DAVIES, G. J. - Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 28, n. 3, p. 208-16, 1999.

SILVA, G. G.; LOPES, L. A.; intolerância a lactose e galactosemia: importância dos processos metabólicos. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.11, n. 4, p. 57-62, 2015.

SILVEIRA, T. R.; PRETTO, F. M. Intolerância à lactose: diagnóstico e tratamento. Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul, 2003.

SOMKUTI, G. A.; STEINBERG, D. H.; Permeabilization of *Streptococcus thermophiles* and the expression of β -galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.16, p. 573-576, 1994.

SWAGERTY, D. Z.; WALLING, A. D.; KLEIN, R. M. Lactose Intolerance. *American Family Physician.*, v.65, p. 1845-1850, 2002.

TÉO, C. R. P. A. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, v. 3, n. 6, p. 135- 140, 2002.

TORRES, A. N. Benefício e malefício do uso do leite de vaca na alimentação humana. *Nutrição Brasil*. 2004.

TREVISAN, A. P. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brasil, 2008.

TULLA, H. Lactose Intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 19, n. 2, p. 165S–175S, 2000.

TUMAS, R.; CARDOSO, A. L. Como conceituar, diagnosticar e tratar a intolerância à lactose. *Revista Clínica e Terapêutica*, v.34, n. 1, p. 13-20, 2008

TURSI, A.; BRANDIMARTE, G.; GIORGETTI, G. M.; ELISEI, W. Transient Lactose malabsorption in patients affected by symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 51, p. 461-5, 2006.

ZADOW, J. G. Lactose – Properties and Uses. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p.2654–2679. 1984.

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

WANG, H. Y.; HETTWER, D. J.; Cell immobilization in κ -carrageenan with tricalcium phosphate. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 24, p. 1827–1838, 1982.

WATTIAUX, A. M. *Composição do leite e seu valor nutricional*. 2006. Disponível em: http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/pt/de_19.pt.pdf. Acesso em: Dezembro/2016.

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

WOOTEN, W. J.; Lactose Intolerance and Ethnic Prevalence. In: national institutes of health. *Lactose Intolerance and Health*. Kensington: National Institutes of Health, v. 52, p. 49- 52, 2010.

CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE CULTIVO DE SACCHAROMYCES FRAGILIS UTILIZANDO SORO DE LEITE SUPLEMENTADO PARA A PRODUÇÃO DE β - GALACTOSIDASE¹

Resumo: A β -galactosidase, também denominada de lactase, é uma importante enzima utilizada por indivíduos intolerantes à lactose. O objetivo deste trabalho foi otimizar o meio de fermentação contendo soro de leite suplementado para a produção da enzima lactase utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275. Um Planejamento Fatorial 2⁴ foi realizado para avaliar as variáveis independentes: soro de leite, sacarose, lactose, glicose, extrato de levedura, peptona, MgSO₄, e K₂HPO₄. No processo fermentativo o parâmetro avaliado foi à atividade enzimática (U/mL). As variáveis que mostraram efeitos significativos na resposta foram soro de leite e extrato de levedura, contudo a sacarose a peptona e o MgSO₄ foram adicionadas ao modelo pois exerceram efeito positivo sobre a média. Em seguida um planejamento de máxima inclinação ascendente e descendente foi realizado para mover o experimento mais rapidamente para seus valores ótimos. Assim, um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) foi proposto para estudar as variáveis, soro de leite, sacarose, extrato de levedura e peptona utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. Verificou-se que a composição ideal do meio de fermentação para obtenção da máxima produção da enzima β -galactosidase foi; sacarose (14 g/L), soro de leite (17,7 g/L), extrato de levedura (5,14 g/L) e peptona (8,85 g/L), sob as condições de 30°C, 180 rpm e 72 horas de fermentação. A validação do modelo foi realizada em triplicata e o resultado de atividade enzimática obtido foi de 54,20 U/mL, sendo compatível com o valor predito pelo modelo (54,15 U/mL).

Palavras-chave: delineamento experimental, lactase, otimização de processo, produção enzimática.

¹Situação: Será submetido à LWT- Food Science and Technology. Alessandra Bosso^{a*}, Adriana Aparecida Bosso Tomal^a, Lucas Caldeirão^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^a. ^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina. *Autor correspondente: Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, *Campus* Universitário, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: alessandrabosso@yahoo.com.br

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Intolerância à lactose

A lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) é um dissacarídeo (β -galactosídeo) (CARMINATTI, 2001) encontrado apenas no leite materno, apresentando diferentes concentrações conforme a espécie de mamífero (GASPARIN; TELES; ARAÚJO, 2010; SANTOS *et al.*, 2014). Quando comparada a outros açúcares, fica evidenciado o seu baixo poder adoçante, além de ter como característica a baixa solubilidade em água (LOMER; PARKERS; SANDERSON, 2008).

Para ser absorvida no organismo, a lactose deve ser hidrolisada em seus monossacarídeos, glicose e galactose, e essa reação é realizada pela enzima β -galactosidase (GRAY, 1975; SANTIAGO *et al.*, 2004). A deficiência desta enzima conduz à má-digestão da lactose e consequente a intolerância (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011; FAEDO *et al.*, 2013) podendo causar um conjunto de sintomas como dores abdominais, diarreia, flatulência, náuseas e vômitos (ADHIKARI *et al.*, 2010; BROWN-ESTERS; McNAMARA; SAVAIANO, 2012). A quantidade de lactose que irá causar tais sintomas varia de indivíduo para indivíduo (BACELAR JUNIOR; KASHIWABARA; NAKAOKA, 2013; TÉO, 2002; VUORISALO *et al.*, 2012).

Os métodos de diagnóstico mais comumente utilizados para avaliar a absorção da lactose são: teste de tolerância à lactose, teste respiratório do hidrogênio expirado, biópsia e genético (GASPARIN; TELES; ARAÚJO, 2010).

2.1.2 A enzima β -galactosidase

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma enzima classificada como uma hidrolase com capacidade de transferase para grupos galactosila. Esse grupo de enzimas tem despertado crescente interesse por parte dos pesquisadores e indústrias devido a suas aplicações (BRAGA, GOMES; KALIL, 2012).

A indústria laticinista tem como desafio a oportunidade de desenvolver novos produtos com reduzido teor de lactose, a fim de atender os consumidores portadores de sua má digestão (CASÉ *et al.*, 2005; TREVISAN, 2008). Na indústria de alimentos em geral, as pesquisas estão voltadas para

evitar a cristalização deste dissacarídeo, aumentar o poder adoçante e principalmente para hidrolisar à lactose no leite e produtos lácteos (HUSAIN, 2010; KLEIN, 2014). No campo da medicina a importância da enzima β -galactosidase está voltada no tratamento da intolerância à lactose (KAMRA *et al.*, 2016), sendo que sua aplicação se dá na utilização de coprodutos como por exemplo o soro de leite que pode ser utilizado como substrato para a produção da lactase (SEN, RAY; CHATTOPADHYAY, 2012).

2.1.3 Microrganismos produtores de β -galactosidase

As β -galactosidases são encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, animais e microrganismos, sendo que suas características variam de acordo com a sua origem (ANSARI; HUSAIN, 2012). A lactase pode ser produzida por bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo estas as principais fontes para a aplicação comercial (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008).

A produção de β -galactosidase por leveduras tem sido bastante pesquisada por serem consideradas fontes importantes de produção desta enzima e ter boa produtividade (RAJOKA, KHAN; SHAHID, 2003; SANTIAGO *et al.*, 2004).

2.1.4 A importância comercial da enzima β -galactosidase

O aumento de indivíduos acometidos pela intolerância à lactose aliado a preocupações com a alimentação com efeitos benéficos para a saúde, tem dado suporte para novas pesquisas nas indústrias de alimentos (GOSLING *et al.*, 2010).

Para amenizar os sintomas causados pela intolerância à lactose, os portadores dessa patologia podem fazer a ingestão oral da enzima, visando a remoção da lactose do leite e de seus derivados ingeridos (O'CONNELL; WALSH, 2007; O'CONNELL; WALSH, 2008).

Além da ingestão oral de β -galactosidase, esta enzima vem sendo aplicada na indústria de laticínios (TUMAS; CARDOSO, 2008) na obtenção de produtos com baixo teor de lactose, na produção de galactooligossacarídeos,

na hidrólise da lactose (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006; TOMAL *et al.*, 2010) e na produção de etanol a partir de soro de leite hidrolisado com esta enzima (COLOGNESI *et al.*, 2015).

2.1.5 Meio de fermentação

O estudo de meios de fermentações industriais para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos (ERNANDES, BOSCOLO; CRUZ, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

Entre esses produtos, destaca-se a produção de enzimas, a qual é frequentemente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos (JOO; CHANG, 2005). Existe uma necessidade crescente da otimização dos processos de produção da β -galactosidase, objetivando minimizar custos, tempos de produção, maximização de rendimento e qualidade de produtos (AKTAS *et al.*, 2006; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Dessa forma o objetivo do trabalho foi determinar as melhores condições de cultivo da *Saccharomyces fragilis* na produção da enzima β -galactosidase, tendo como função resposta a máxima da atividade enzimática.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275. A levedura foi mantida a 4°C em tubos contendo Agar Batata Dextrose (ABD). A cultura foi reativada em caldo YM (extrato de malte 2% e extrato de levedura 0,5%) em Erlenmeyer de 100 mL, incubada a 30°C, durante 48 horas, em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE- 421) a 180 rpm de agitação. O inóculo foi padronizado pela contagem de células em câmara de Neubauer (SANTIAGO *et al.*, 2004) e posteriormente transferida (10% v/v) para o meio de fermentação (NOR, *et al.*, 2001).

2.2.2 Definição dos ingredientes do meio de produção

Para definir a composição do meio de produção da enzima β -galactosidase foram utilizadas diferentes fontes de carbono (sacarose, soro de leite, lactose e glicose), nitrogênio (extrato de levedura e peptona) e sais minerais ($MgSO_4$ e K_2HPO_4) (Tabela 1).

A produção da enzima β -galactosidase foi realizada em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio. As condições de cultivo como a temperatura, agitação e tempo de fermentação foram definidas de acordo com a literatura (BRAGA *et al.*, 2013; DAGBAGLI; GOKSUNGUR, 2008; HSU, YU; CHOU, 2005; KUMAR *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2011; MANERA *et al.*, 2011). As fermentações foram conduzidas em incubadora rotatória orbital, com pH inicial de 6,8 temperatura de 30°C, agitação de 180 rpm, durante 72 horas, iniciando a fermentação com uma concentração inicial de células de leveduras de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ log células/mL e tendo como variável resposta a atividade enzimática (U/mL).

Um planejamento fatorial 2^4 com o ponto central em triplicata totalizando 19 ensaios foi utilizado para avaliação das variáveis independentes na composição do meio de fermentação. Os níveis de variação utilizados no planejamento estão apresentados na Tabela 1. Os dados obtidos a partir dos ensaios experimentais foram tratados no software “Statística 7.0” para verificação de efeitos principais das variáveis independentes sobre a resposta.

Tabela 1 - Níveis codificados e decodificados das variáveis aplicadas no Planejamento Fatorial

Variáveis independentes	Nível mínimo (-)	Ponto Central (0)	Nível máximo (+)
Lactose (g/L)	1,0	5,5	10,0
Sacarose (g/L)	1,0	5,5	10,0
Glicose (g/L)	1,0	5,5	10,0
Soro de leite (g/L)	1,0	5,5	10,0
Extrato de levedura (g/L)	0,5	2,75	5,0
Peptona (g/L)	0,5	2,75	5,0
$MgSO_4$ (g/L)	0,5	2,75	5,0
K_2HPO_4 (g/L)	0,5	2,75	5,0

2.2.3 Planejamento de máxima inclinação ascendente e máxima inclinação descendente

A determinação das melhores condições de cultivo foi iniciada com o planejamento fatorial de 1ª ordem, onde as variáveis independentes mais significativas foram novamente estudadas.

Partindo da análise dos resultados obtidos no Planejamento Fatorial (Tabela 4), foi realizado um novo experimento de máximo incremento na resposta pelo método de máxima inclinação ascendente (*steepest ascent*) e descendente (*steepest descent*) para encontrar um mínimo incremento na resposta conforme apresentado na Tabela 2.

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, as variáveis independentes, soro de leite e extrato de levedura apresentaram efeito positivo sobre a média, já as variáveis, sacarose, peptona e $MgSO_4$, não foram significativas, mas exerceram influência no aumento da atividade enzimática. Sendo assim, optou-se por manter todas as variáveis mencionadas acima ao experimento, com aumento e diminuição nos seus valores, para que fosse atingida uma configuração ótima dentro dos intervalos.

Nesse mesmo experimento as variáveis que não exerceram efeito positivo sobre a resposta (lactose, glicose e K_2HPO_4) também foram estudadas em seus níveis máximos, mínimos, central e na ausência dos mesmos.

Tabela 2 - Matriz do planejamento de máxima inclinação ascendente e máxima inclinação descendente.

Ensaio	Sacarose g/L	Soro de leite g/L	Ext. de levedura g/L	Peptona g/L	MgSO ₄ g/L	Lactose g/L	Glicose g/L	K ₂ PO ₄ g/L	Ativ. Enz. U/mL
1	6	6	2	2	2	10	10	5	17,21
2	8	8	4	4	4	10	10	5	34,84
3	12	12	6	6	6	10	10	5	26,98
4	14	14	7	7	7	10	10	5	39,81
5	16	16	8	8	8	10	10	5	27,03
6	6	6	2	2	2	1	1	0,5	1,57
7	8	8	4	4	4	1	1	0,5	13,51
8	12	12	6	6	6	1	1	0,5	19,61
9	14	14	7	7	7	1	1	0,5	23,36
10	16	16	8	8	8	1	1	0,5	20,84
11	6	6	2	2	2	5,5	5,5	2,75	10,67
12	8	8	4	4	4	5,5	5,5	2,75	18,61
13	12	12	6	6	6	5,5	5,5	2,75	16,25
14	14	14	7	7	7	5,5	5,5	2,75	18,61
15	16	16	8	8	8	5,5	5,5	2,75	13,46
16	6	6	2	2	2	aus	aus	aus	2,46
17	8	8	4	4	4	aus	aus	aus	7,09
18	12	12	6	6	6	aus	aus	aus	13,29
19	14	14	7	7	7	aus	aus	aus	14,12
20	16	16	8	8	8	aus	aus	aus	17,39

2.2.4 Determinação das melhores concentrações dos ingredientes e condições de cultivo para a maior produção da β -galactosidase utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

A composição média mais significativa das variáveis independentes obtida no planejamento de máxima e mínima inclinação foi utilizada como ponto central para a determinação da melhor composição do meio. Para isso foi proposto realizar um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) ²⁴ com dois pontos centrais e oito pontos axiais, para ortogonalidade, totalizando

26 ensaios, tendo como resposta a atividade enzimática (U/mL). Nesse estudo, o DCCR de quatro variáveis (sacarose, soro de leite, extrato de levedura e peptona) foi estudado para cinco diferentes níveis (Tabela 3).

Para a avaliação dos resultados obtidos no DCCR foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM – Response Surface Methodology) utilizando o programa “Statística 7.0”.

Tabela 3 - Variáveis independentes e seus níveis de variação no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2^4 com dois pontos centrais e 8 pontos axiais, para ortogonalidade

Variáveis Independentes	NIVEIS DE VARIAÇÃO g/L				
	-1,48	-1,00	0	+1,00	+1,48
Sacarose, X₁	10,29	11,50	14,00	16,50	17,70
Soro de leite, X₂	10,29	11,50	14,00	16,50	17,70
Extrato de levedura, X₃	5,14	5,75	7,00	8,25	8,85
Peptona, X₄	5,14	5,75	7,00	8,25	8,85

2.2.5 Extração da β -galactosidase

A extração da β -galactosidase intracelular das células de *Saccharomyces fragilis*, foi realizada utilizando-se o solvente clorofórmio (PA), conforme procedimento descrito por Nunes, Massauger, Monte Alegre (1993). Amostras de 80 mL de meio fermentado foram centrifugadas em centrífuga Beckman Couter J-25, num campo gravitacional igual a 27.200 g por 5 minutos e o decantado ressuspenso em tampão fosfato (0,1M) pH 6,6, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições.

O precipitado foi solubilizado em 10 mL do mesmo tampão, ao que se adicionou 0,2 mL de clorofórmio PA. Esta mistura foi incubada a 37°C, sob agitação de 150 rpm por 17 horas. Após este tempo, a suspensão foi novamente centrifugada, sendo descartado o precipitado e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática.

2.2.6 Determinação da atividade de β -galactosidase

A atividade enzimática foi determinada usando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato, segundo metodologia descrita por Inchaurredo, Yantorno; Voget (1994). Em tubo de ensaio contendo 2 mL de ONPG 1,25 mM, preparado em tampão KH_2PO_4 50 mM com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM pH 6,6, foram adicionados 50 μL da solução enzimática. A solução foi mantida a 37°C por 5 minutos em banho de agitação, a reação foi paralisada adicionando 0,5 mL de carbonato de sódio 1,0 M, em seguida determinou-se a absorbância a 420 nm, e calculou-se a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como 1 μmol de o-nitrophenol produzido por minuto, sob as condições do ensaio.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do meio de fermentação na definição da melhor condição de produção da enzima β -galactosidase por cultivo submerso é determinante para a obtenção da máxima atividade enzimática (PERINI *et al.*, 2013).

Nesse trabalho diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais foram utilizados para o processo de produção da enzima β -galactosidase por *Saccharomyces fragilis* IZ 275.

A metodologia estatística foi usada para a compreensão das interações entre os nutrientes em concentrações variáveis resultando em uma redução substancial do número total de experimentos a ser realizado.

2.3.1 Delineamento fatorial

As condições experimentais do Delineamento Fatorial 2^4 estão apresentadas na Tabela 4, bem como as respostas para a atividade enzimática de cada ensaio. A maior resposta obtida neste delineamento foi de 28,42 U/mL (ensaio 16) e a menor atividade enzimática registrada no experimento foi de 0,20 U/mL (ensaio 6).

Tabela 4 - Matriz decodificada do planejamento fatorial 2^4 com 3 pontos centrais e como variável resposta a atividade enzimática (U/mL).

Ensaio Nº	Lactose g/L	Sacarose g/L	Glicose g/L	Soro g/L	Ext. lev. g/L	Peptona g/L	MgSO ₄ g/L	K ₂ HPO ₄ g/L	Ativ. Enz. U/mL
1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,80
2	10,0	1,0	1,0	1,0	0,5	5,0	5,0	5,0	1,01
3	1,0	10,0	1,0	1,0	5,0	0,5	5,0	5,0	6,22
4	10,0	10,0	1,0	1,0	5,0	5,0	0,5	0,5	6,49
5	1,0	1,0	10,0	1,0	5,0	5,0	5,0	0,5	10,63
6	10,0	1,0	10,0	1,0	5,0	0,5	0,5	5,0	0,20
7	1,0	10,0	10,0	1,0	0,5	5,0	0,5	5,0	0,71
8	10,0	10,0	10,0	1,0	0,5	0,5	5,0	0,5	2,25
9	1,0	1,0	1,0	10,0	5,0	5,0	0,5	5,0	10,74
10	10,0	1,0	1,0	10,0	5,0	0,5	5,0	0,5	12,51
11	1,0	10,0	1,0	10,0	0,5	5,0	5,50	0,5	8,21
12	10,0	10,0	1,0	10,0	0,5	0,5	0,5	5,0	0,92
13	1,0	1,0	10,0	10,0	0,5	0,5	5,0	5,0	1,19
14	10,0	1,0	10,0	10,0	0,5	5,0	0,5	0,5	0,66
15	1,0	10,0	10,0	10,0	5,0	0,5	0,5	0,5	11,31
16	10,0	10,0	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	28,42
17	5,5	5,5	5,5	5,5	2,75	2,75	2,75	2,75	7,05
18	5,5	5,5	5,5	5,5	2,75	2,75	2,75	2,75	6,89
19	5,5	5,5	5,5	5,5	2,75	2,75	2,75	2,75	6,93

No ensaio onde se obteve a maior atividade enzimática, as variáveis independentes encontravam-se em seus níveis máximos, as concentrações foram: lactose, sacarose, glicose e soro de leite 10 g/L, extrato de levedura, peptona, MgSO₄ e K₂HPO₄ 5,5 g/L. Já ,na menor atividade enzimática observada utilizou-se concentrações de 10 g/L de lactose, 1,0 g/L de sacarose, 10 g/L de glicose 1,0 g/L de soro de leite, 5,5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de peptona, 0,5 g/L de MgSO₄ e 5,5 g/L de K₂HPO₄.

Submetendo os ensaios a análise verificou-se que a curvatura não foi significativa, demonstrando que as variáveis independentes ainda não se encontravam em suas regiões ótimas.

Baseado nos efeitos apresentados na Tabela 5, observa-se que as variáveis independentes, soro de leite e extrato de levedura apresentaram efeito positivo sobre a média da atividade enzimática, já as variáveis, sacarose, peptona e $MgSO_4$, não foram significativas mas tiveram influência no aumento da atividade enzimática. As variáveis lactose, glicose não exerceram efeito significativo e o K_2HPO_4 apresentou um efeito negativo no modelo, mas também foi observado que exerceram influência na variável resposta. Dessa forma foi proposto a realização do planejamento de máxima inclinação ascendente e máxima inclinação descendente para que o experimento fosse movido para os seus valores de otimização.

Tabela 5 - Efeitos principais das variáveis independentes sobre a atividade enzimática

Fator	Efeito	Std. Err.	t (10)	P
Média	6,234	1,039	5,996	0,00013*
Lactose, g/L	0,205	2,266	0,090	0,929391
Sacarose, g/L	3,226	2,266	1,423	0,184909
Glicose g/L	0,936	2,266	0,413	0,688276
Soro de leite, g/L	5,579	2,266	2,462	0,033546*
Ext. lev., g/L	8,723	2,266	3,849	0,003213*
Peptona, g/L	3,809	2,266	1,681	0,123675
Mg SO₄, g/L	4,702	2,266	2,075	0,0647717
K₂HPO₄, g/L	-0,554	2,266	-0,244	0,811738

*significativos ($p \leq 5$)

2.3.2 Planejamento de máxima inclinação ascendente (*steepest ascent*) e máxima inclinação descendente (*steepest descent*).

Após a análise dos resultados do planejamento de máxima inclinação ascendente e descendente (Tabela 2) o ensaio quatro foi o que obteve a máxima atividade enzimática (39,81 U/mL), onde as concentrações das variáveis independentes sacarose e soro de leite foram 14 g/L e de 7 g/L para o extrato de levedura, peptona e MgSO₄, respectivamente. As variáveis não significativas, lactose, glicose e K₂PO₄ nesse ensaio estavam em seus níveis de valores máximos, 10 g/L, 10 g/L e 5 g/L respectivamente.

Quando as variáveis independentes significativas permaneceram nas concentrações acima citadas, mas as variáveis não significativas (lactose, glicose e K₂PO₄) estavam em seus níveis de valores mínimos, ponto central e ausência no experimento, os valores de atividade enzimática observados foram de 23,36 U/mL, 18,61 U/mL e 14,12 U/mL respectivamente.

Esses resultados indicaram que mesmo essas variáveis não sendo significativas no modelo, as mesmas exerceram influência na atividade enzimática da β -galactosidase.

Dessa forma as concentrações do ensaio com a melhor resposta foi admitido como ponto central e um Delineamento Central Composto Rotacional foi realizado.

2.3.3 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Para encontrar os valores de otimização do meio de fermentação proposto, um DCCR com 26 ensaios foi realizado e apresentado na Tabela 6.

Em função dos resultados obtidos em experimentos preliminares, os fatores sacarose, soro de leite, extrato de levedura e peptona foram selecionados para serem estudados no DCCR.

A maior atividade enzimática atingida no DCCR foi de 52,84 U/mL no ensaio 21 e a menor resposta foi observada no ensaio 01 (29,62 U/mL). As variáveis lactose, glicose, MgSO₄ e K₂HPO₄ proporcionaram melhor respostas em seus níveis máximos (+) em todos os ensaios do DCCR.

Tabela 6 - Matriz do DCCR codificada e decodificada em que X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 e X_8 são, respectivamente, sacarose (g/L), soro de leite (g/L), extrato de levedura (g/L), peptona (g/L), lactose (g/L), glicose (g/L), $MgSO_4$ (g/L) e K_2HPO_4 (g/L) tendo a atividade enzimática como resposta (U/mL).

Ensaio	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3 (g/L)	X_4 (g/L)	X_5 (g/L)	X_6 (g/L)	X_7 (g/L)	X_8 (g/L)	A.Enz (U/mL)
1	(-1) 11,5	(-1) 11,5	(-1) 5,75	(-1) 5,75	10	10	7	5	29,62
2	(-1) 11,5	(-1) 11,5	(-1) 5,75	(1) 8,25	10	10	7	5	41,06
3	(-1) 11,5	(-1) 11,5	(1) 8,25	(-1) 5,75	10	10	7	5	33,29
4	(-1) 11,5	(-1) 11,5	(1) 8,25	(1) 8,25	10	10	7	5	35,73
5	(-1) 11,5	(1) 16,5	(-1) 5,75	(-1) 5,75	10	10	7	5	42,89
6	(-1) 11,5	(1) 16,5	(-1) 5,75	(1) 8,25	10	10	7	5	51,97
7	(-1) 11,5	(1) 16,5	(1) 8,25	(-1) 5,75	10	10	7	5	35,47
8	(-1) 11,5	(1) 16,5	(1) 8,25	(1) 8,25	10	10	7	5	35,91
9	(1) 16,5	(-1) 11,5	(-1) 5,75	(-1) 5,75	10	10	7	5	51,09
10	(1) 16,5	(-1) 11,5	(-1) 5,75	(1) 8,25	10	10	7	5	39,92
11	(1) 16,5	(-1) 11,5	(1) 8,25	(-1) 5,75	10	10	7	5	41,23
12	(1) 16,5	(-1) 11,5	(1) 8,25	(1) 8,25	10	10	7	5	42,28
13	(1) 16,5	(1) 16,5	(-1) 5,75	(-1) 5,75	10	10	7	5	49,35
14	(1) 16,5	(1) 16,5	(-1) 5,75	(1) 8,25	10	10	7	5	43,33
15	(1) 16,5	(1) 16,5	(1) 8,25	(-1) 5,75	10	10	7	5	44,02
16	(1) 16,5	(1) 16,5	(1) 8,25	(1) 8,25	10	10	7	5	41,67
17	(-1,48) 10,29	(0)14	(0) 7	(0) 7	10	10	7	5	39,66
18	(1,48) 17,70	(0)14	(0) 7	(0) 7	10	10	7	5	42,19
19	(0) 14	(-1,48) 10,29	(0) 7	(0) 7	10	10	7	5	32,07
20	(0) 14	(1,48) 17,70	(0) 7	(0) 7	10	10	7	5	43,85
21	(0) 14	(0) 14	(-1,48) 5,14	(0) 7	10	10	7	5	52,84
22	(0) 14	(0) 14	(1,48) 8,85	(0) 7	10	10	7	5	45,42
23	(0) 14	(0) 14	0	(1,48) 5,14	10	10	7	5	36,69
24	(0)14	(0) 14	(0)7	(1,48) 8,85	10	10	7	5	50,66
25	(0) 14	(0) 14	(0)7	(0) 7	10	10	7	5	42,19
26	(0) 14	(0) 14	(0)7	(0) 7	10	10	7	5	42,72

Manera e colaboradores (2008), otimizaram o meio de fermentação para produção de β -galactosidase a partir de *K. marxianus* CCT 7082 utilizando

como ingredientes do meio de cultura, lactose, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nas concentrações de 55,0 g/L, 20,0 g/L, 7,0 g/L, respectivamente, tendo a máxima atividade atingida no DCCR em 10,7 U/mL. Já, Lima *et al.* (2011) avaliaram a espécie *K. lactis* Y 1564 para a produção de β -galactosidase, utilizando lactose PA (50 g/L), extrato de levedura e sulfato de amônio e obtiveram atividade enzimática de 3,5 U/mL.

Am-aiam e Khanongnuch (2015) realizaram a produção de β -galactosidase com a levedura *K. marxianus* em meio composto por; lactose (20,0 g/L), extrato de levedura (0,3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10,0 g/L), K_2PO_4 (6,5 g/L) e MgSO_4 (0,1 g/L) e o valor máximo obtido de atividade enzimática foi de 8,92 U/mL.

O resultado da atividade enzimática alcançado neste trabalho mostrou-se em média cinco vezes superior aos resultados obtidos por Manera *et al.* (2008) e Am-aiam; Khanongnuch (2015), e dezesseis vezes maior quando comparado ao trabalho de Lima *et al.* (2011).

O modelo empírico para a atividade da enzima β -galactosidase produzida pela fermentação em função dos termos significativos está representada pela Equação 1. O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo foi 0,76 indicando um bom ajuste dos dados. Este valor de coeficiente de correlação foi considerado satisfatório por este ser um experimento biológico. A única variável da equação do modelo que não apresentou significância foi o termo quadrático da concentração de sacarose (Tabela 7), entretanto, a abstração desde coeficiente do modelo reduz de maneira drástica o valor do coeficiente de correlação.

$\begin{aligned} \text{Atividade Enzimática (U/mL)} = & 43,37 + 2,48\text{Sac} + 2,34\text{Sor} - \\ & 2,48\text{Ext} + 1,25\text{Pep} - 1,41\text{Sac Sor} - 2,61\text{Sac Pep} - \\ & 1,33\text{Sor Ext} - 1,45\text{Sac}^2 - 2,80\text{Sor}^2 + 2,27\text{Ext}^2 \end{aligned}$	(Eq. 1)
--	---------

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os termos da equação do modelo empírico para atividade de β -galactosidase ($p \leq 0,05$).

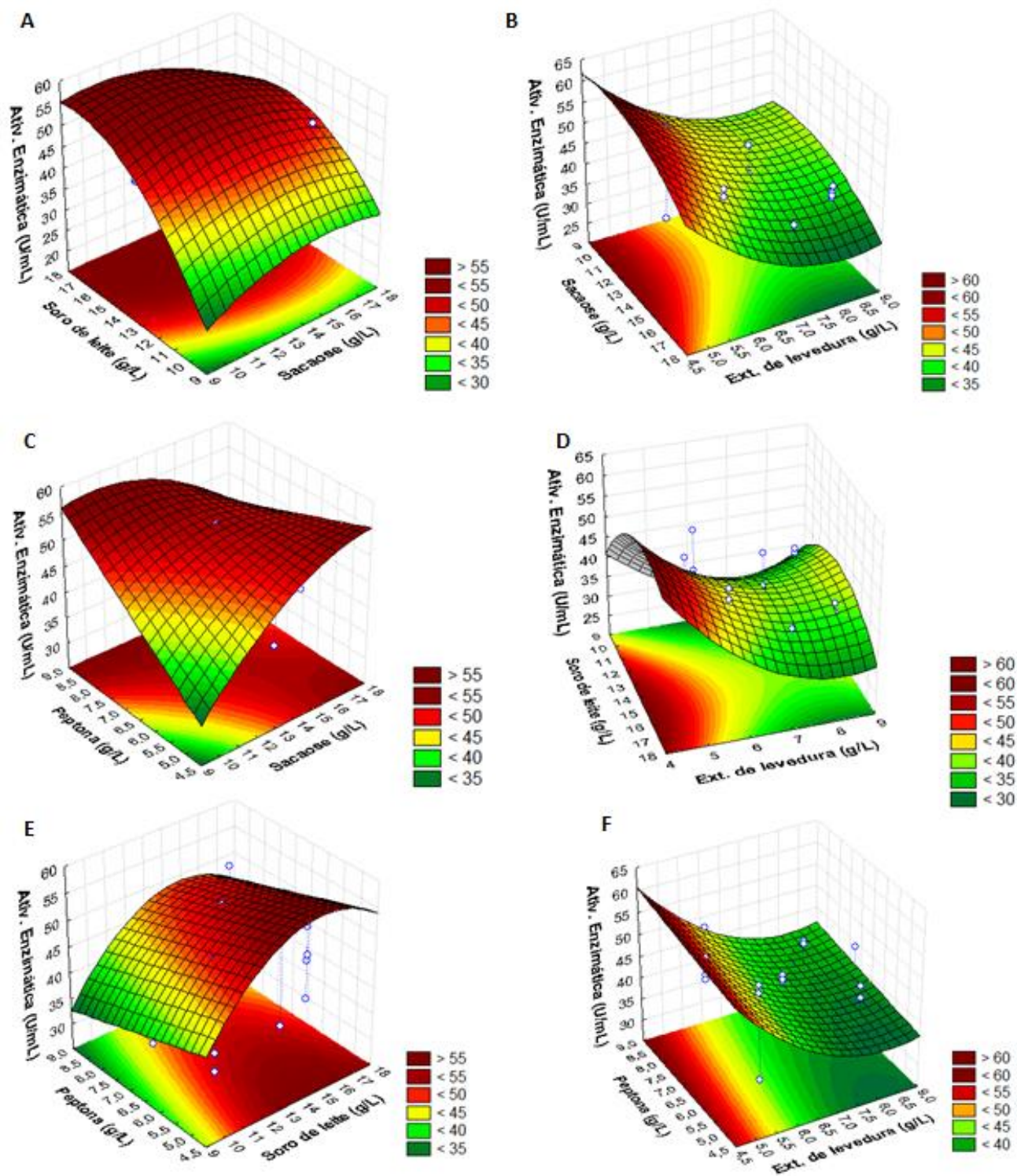
Causa de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	p -valor*
Sacarose (L)	126,058	1	126,058	0,021*
Sacarose (Q)	20,458	1	20,458	0,052
Soro (L)	112,208	1	112,208	0,022*
Soro (Q)	76,029	1	76,029	0,027*
Extrato de levedura (L)	125,635	1	125,635	0,021*
Extrato de levedura (Q)	50,111	1	50,111	0,033*
Peptona (L)	32,106	1	32,106	0,042*
Sacarose (L) Soro (L)	32,181	1	32,181	0,041*
Sacarose (L) Peptona (L)	109,682	1	109,682	0,022*
Soro (L) Ext. Lev. (L)	28,342	1	28,342	0,044*
Falta de Ajuste	223,249	14	15,946	0,073
Erro Puro	0,137	1	0,137	-
Total	936,196	25	-	-

L= termo linear; Q= termo quadrático, *= significativo ($p \leq 0,05$) Coeficiente de regressão (R^2)= 0,76

Dessa forma, o modelo matemático com finalidade preditiva foi utilizado na construção das superfícies de resposta, permitindo a visualização da atividade enzimática, expressa em seus valores máximos em função das variáveis.

A Figura 1A representa a atividade da enzima β -galactosidase em função das concentrações de soro de leite e sacarose. É possível observar que, com o aumento da concentração de soro de leite e a redução da concentração de sacarose ocorreu a maior resposta de atividade enzimática. Por ser rico em lactose, o soro de leite possivelmente induz a levedura a produzir β -galactosidase e por consequência há o aumento da atividade enzimática (ORNELAS, 2001).

Figura 1 - Superfície de Resposta para a atividade da β -galactosidase em função das concentrações de soro de leite e sacarose (A), sacarose e extrato de levedura (B), peptona e sacarose (C), extrato de levedura e soro de leite (D), soro de leite e peptona (E) peptona e extrato de levedura (F).



Quanto ao extrato de levedura e a concentração de sacarose (Figura 1B) a superfície de resposta indica a maior atividade da enzimática na região de menor concentração de extrato de levedura (5,14 g/L) e menor concentração de sacarose (10,29 g/L).

Em relação à dependência da atividade da enzima em função das concentrações de peptona e sacarose (Figura 1C) pode-se observar que há duas regiões de otimização, uma nos valores superiores de peptona e inferior de sacarose e outra no sentido oposto, ou seja, na menor concentração de peptona e maior concentração de sacarose, entretanto, a superfície de resposta e o perfil de desejabilidade indicam que essas regiões de menor concentração poderiam ser exploradas além dos valores estudados a fim de verificar a região de otimização.

A Figura 1D ilustra a dependência da atividade enzimática nas diferentes concentrações de extrato de levedura e soro de leite indicando que a região ótima está na menor concentração de extrato de levedura (5,14 g/L) e uma faixa entre o ponto central e a maior concentração de soro de leite. Os constituintes presentes no soro de leite (proteínas, lipídeos, sais minerais e vitaminas) podem facilitar o metabolismo do soro pelo microrganismo (SCHOLZ, 2011).

A superfície de resposta para as concentrações de soro de leite e peptona (Figura 1E), indicam uma região de otimização entre o ponto central do soro de leite e sua maior concentração (17,7 g/L) enquanto que a concentração de peptona deve estar, também, em sua concentração máxima (8,85 g/L).

Quando se observa a superfície de resposta para as fontes de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) (Figura 1F), nota-se que na menor concentração de extrato de levedura a concentração de peptona é quase irrelevante, levando a um leve aumento na atividade enzimática quando esta última se encontra no valor máximo (8,85 g/L).

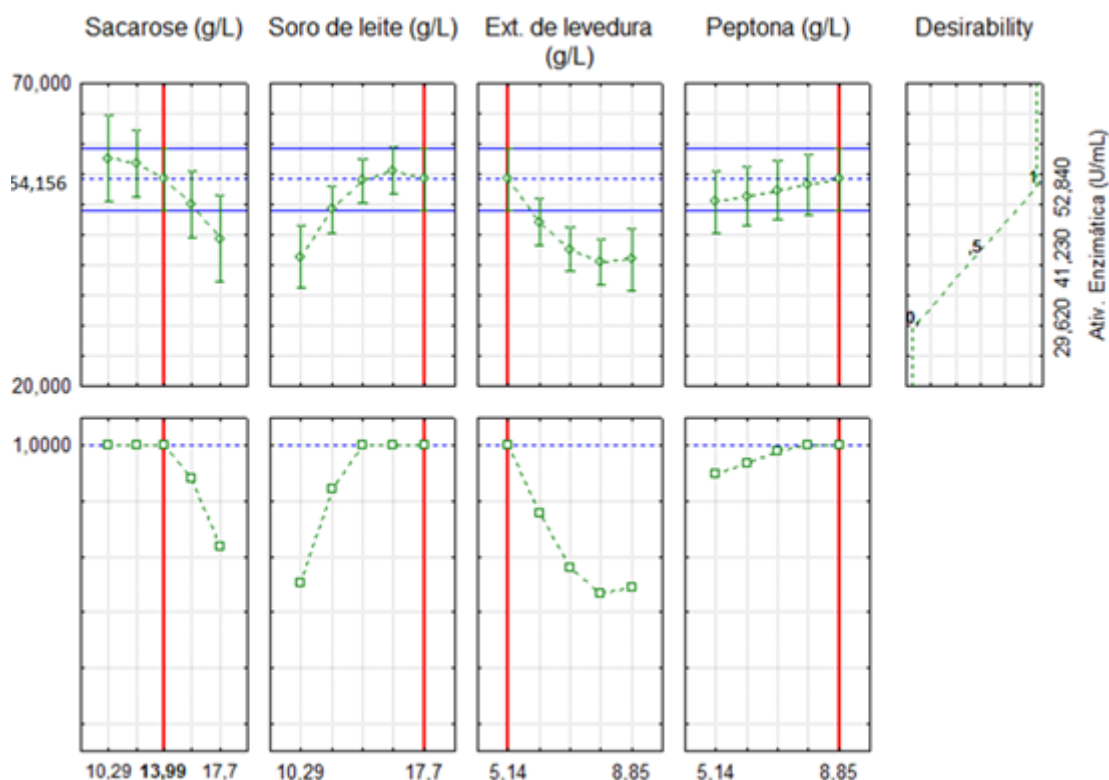
2.3.4 Perfil de desejabilidade

O perfil de desejabilidade é uma técnica que consiste em encontrar os valores das variáveis independentes que otimizem a resposta, ou então, as

mantenha dentro das faixas desejáveis dos valores estabelecidos nos ensaios experimentais (MONTIPÓ, 2012).

A Figura 2 gerada a partir do modelo empírico indica que para que ocorra maior produção enzimática necessita-se de; (14 g/L) de sacarose, (17,7 g/L) para soro de leite, (5,14 g/L) para extrato de levedura e (8,85 g/L) de peptona para a otimização da produção de β -galactosidase. Nestas condições, o valor predito pelo modelo foi de 54,15 U/mL de atividade enzimática e o obtido experimentalmente de 54,20 U/mL.

Figura 2 - Perfil de valor predito e perfil de desejabilidade para a atividade de B-galactosidase em função das concentrações de sacarose, soro de leite, extrato de levedura e peptona.



Perini *et al.* (2013) realizaram a otimização da produção da enzima lactase utilizando a levedura *K. marxianus* CBS 6556, sendo que nas condições estudadas o modelo predito gerado de atividade enzimática foi de 9,26 U/mL, sendo o valor encontrado experimentalmente foi de 8,4 U/mL. Já Braga, Gomes; Kalil (2012) estabeleceram a otimização da enzima utilizando a

levedura *K. marxianus* ATCC 16045 alcançando nas condições estudadas ma atividade de 10,4 U/mL tendo como valor predito 9,7 U/mL.

O modelo predito na otimização realizada por Manera *et al.* (2008) a partir de *K. marxianus* CCT 7082 foi de 10,4 U/mL e o valor alcançado experimentalmente foi de 10,6 U/mL. O valor obtido na otimização realizada por Am-aiam; Khanongnuch (2015) utilizando levedura *K. marxianus* em meio sintético foi de 8,82 U/mL e a atividade predita de β - galactosidase foi de 8,94 U/mL.

Dessa forma observa-se que os valores da atividade enzimática obtido no presente trabalho foram mais expressivos quando comparados aos trabalhos de outros pesquisadores. Cabe ressaltar que as condições de otimização da produção enzimática pode ser influenciada pela estirpe, condições de cultura e composição do meio de crescimento.

2.3.5 Validação do modelo empírico

Três experimentos foram realizados nas condições indicadas pelo modelo a fim de validar a equação. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o valor predito e o observado (Tabela 8), logo, o modelo proposto responde à realidade.

Tabela 8 - Teste t Student para validação do modelo empírico ($p > 0,05$).

	Atividade de β -galactosidase (U/mL)	p -valor
Modelo Empírico	54,15	0,825
Validação	54,20* \pm 0,529	

*Média de três experimentos a um nível de significância de ($p > 0,05$).

2.4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o emprego de Metodologia de Delineamento Experimental e análise de Superfície de Resposta foram eficazes para otimização do meio de fermentação para produção da enzima β galactosidase utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis*. A melhor composição do meio de

cultivo para a máxima produção de β -galactosidase foi sacarose 14 g/L, soro de leite 17,7 g/L, extrato de levedura de 5,14 g/L, e peptona 8,85 g/L, sob as condições de temperatura, agitação e tempo de fermentação, de 30°C, 180 rpm e 72 horas, respectivamente. Nestas condições a atividade enzimática alcançada foi de 54,20 U/mL.

2.5 REFERÊNCIAS

ADHIKARI, K.; DOOLEY, L. M.; CHAMBERS, E.; BHUMIRATANA, N. (2010). Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *Food Science and Technology*, 43, 113–118.

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

AM-AIAM; S.; KHANONGNUCH, C. (2015). . Medium Optimization for β -Galactosidase Production by a Thermotolerant Yeast. *Chiang Mai J. Sci.*, 42, 840-849.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. (2012). Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized β -galactosidase. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 351-359.

BACELAR JÚNIOR, A. J.; KASHIWABARA, T. G. B.; NAKAOKA V. Y. E. S. (2013). Intolerância a lactose – revisão de literatura, *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 4, 38- 42.

BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. (2011). Intolerância à lactose e suas consequência no metabolismo do cálcio. *Revista Saúde e Pesquisa*, 4, 81-86.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A. e KALIL, S. J.(2012). Formulation of culture médium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from

Kluyveromyces marxianus ATCC 16045. Food and Bioprocess Technology. 5, 1653–1663.

BRAGA, A. R. C.; MANERA, A. P.; ORES, J. C.; SALA, L.; MAUGERI FILHO, F.; KALIL, S. J. (2013). Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified beta-Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides. Food Technology and Biotechnology. 51, 45-52

BROWN-ESTERS, O.; McNAMARA, P.; SAVAIANO, D. (2012). Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. International Dairy Journal, 22, 98–103.

CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. (2005). Produção de leite de soja enriquecido com cálcio. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25, 86-91.

COLOGNESI, G. O. S.; dos SANTOS, L. F.; CASTRO - GOMEZ, R. J. H.; ROIG, S. M.; SUGUIMOTO, H. H. (2015). Ethanol production potential of *Saccharomyces fragilis* IZ 275 using cheese whey powder solution. Agrociência, 49, 291-298.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. (2008). Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. Electronic. Journal. Biotechnology, 11, 1-12

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. (2010). Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. Acta Scientiarum Technology, 32, 21 26.

FAEDO, R.; BRIÃO, V. B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. (2013). Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. Revista CIATEC – UPF,3, 44-54.

GASPARIN, F. S. R.; TELES, J. M.; ARAÚJO, S. C. (2010). Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3, 107-114.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 21, 207-18.

GRAY, G. M. (1975). Carbohydrate digestion and absorption. *The New England Journal of Medicine*, 292, 1225-30.

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

HUSAIN, Q. (2010). β -galactosidase and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 41-62.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. (1994). Yeast growth and β galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium. *Process Biochemistry*, 29, 47-54.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40, 1263-1270.

KAMRA, A.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QDER, S. A. U. (2016). Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β - galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 99–103.

KLEIN, M.; P. (2014). 186f. Hidrólise da Lactose e Síntese de Galactooligosacarídeos Utilizando β -galactosidase imobilizada em Suportes à Base de Quitosana. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa

Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC.

KUMAR, M. D. J.; SUDHA, M.; DEVIKA, S.; BALAKUMARAN, M. D.; KUMAR, M. R.; KALAICHELVAN, P. T. (2012). Production and optimization of β -galactosidase by bacillus Sp. MPTK 121. Isolated from Dairy Plant Soil. *Annals of Biological Research*, 4, 1712-1718.

LIMA, A. F.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; CAVALCANTE, K. F.; GONÇALVES, L. R. B. (2011). Seleção de espécies de *Kluyveromyces* para produção de β - galactosidase em soro de leite. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul.

LOMER, M. C., PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. (2008). Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. *Alimentary Pharmacology e Therapeutics*, 27, 93–103.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. (2008). Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 66-72.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F.(2011). Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Acta Scientiarum Technology*, 33, 155–161.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 47 54.

MONTIPÓ, S. (2012). 86f. Produção de ácido láctico a partir da casca de arroz. Dissertação de mestrado. Centro de Tecnologia, Universidade de Santa Maria. Santa Maria, RS.

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

NUNES, M. F. A.; MASSAUGER, S.; MONTE ALEGRE, R. (1993). Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415. *Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 29, 25-30.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. (2007). Purification and properties of a β -galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14, 1-14.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. (2008). Application relevant studies of fungal β galactosidases with potential application in the alleviation of lactose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149, 129-138.

ORNELAS, A. P. R. C. (2001). 64f. Atividade de β -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* na fase de desaceleração do crescimento em soro de queijo ultrafiltrado. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola,). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. MG.

PERINI, B. L. B.; SOUZA, H. C. M.; KERBERT, M.; APATI, G. P.; PEZZIN, A. P. T.; SCHEIDER, A. L. S. (2013) Production of β -galactosidase from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* cbs 6556. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 991-996.

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

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

SANTIAGO, P.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. (2004). Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Ciência e Tecnologia Alimentícia, 24, 567–572.

SANTOS; F. F. P. dos, OLIVEIRA; G. L. de; PIMENTEL; H. G. P.; PINHO; K. D. de; VERAS, H. N. H. (2014). Intolerância à lactose e as consequências no metabolismo do cálcio. Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia. 2.

SCHOLZ, E.; B. (2011). 89f. Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β galactosidase. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC.

SEN, S.; RAY L.; CHATTOPADHYAY P. (2012). Production, Purification, Immobilization, and Characterization of a Thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus alliaceus*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 167, 1938–1953.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S.(2009) Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, 3, 28-41.

TÉO, C. R. P. A. (2002). Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, 6, 135-140.

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. Y.; e SUGUIMOTO, H. H. (2010). Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. Científica, Ciências biológicas e da saúde, 12, 41-49.

TREVISAN, A. P. (2008). 60 f. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactase em leite pasteurizado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFSM, Santa Maria. RS.

TUMAS, R.; CARDOSO, A. L. (2008). Como conceituar, diagnosticar e tratar a intolerância à lactose. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica*, 34, 13-20.

VUORISALO, T.; ARJAMAA, O.; VASEMÄGI, A.; TAAVITSAINEN, J. P.; TOURUNEN, A.; SALONIEMI, I. (2012). High lactose tolerance in North Europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. *Perspectives in Biology and Medicine*, 55, 163–74.

CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE UTILIZANDO A LEVEDURA *SACCHAROMYCES FRAGILIS* IZ 275²

RESUMO: A β -galactosidase é uma enzima que hidrolisa a lactose presente no leite e derivados, em seus monômeros constituintes glicose e galactose. A utilização de β -galactosidase para hidrolisar a lactose tornou-se comum no alívio dos sintomas de intolerância à lactose. Considerando a importância da redução de custos para a produção da enzima, o objetivo do trabalho foi determinar as melhores condições de cultivo de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 para a produção da máxima atividade da enzima da β -galactosidase utilizando um meio de cultivo composto por diferentes fontes de carbono (sacarose (14 g/L) soro de leite (17,7 g/L) lactose e glicose (10 g/L), fontes de nitrogênio peptona (8,85 g/L) e extrato de levedura (5,14 g/L), sais ($MgSO_4$ (7 g/L) e K_2HPO_4 (5 g/L)). Para isto foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2⁴, com 17 experimentos sendo três no nível central da Metodologia de Superfície de Resposta. Os parâmetros de cultivo estudados foram temperatura, pH e concentração do inóculo em 5 (cinco) níveis de variação. Os resultados indicaram que a máxima atividade enzimática obtida foi de 59,85 U/mL nas condições de temperatura de 33°C, pH 6,2 e concentração de inóculo 20% (v/v), agitação de 180 rpm e 72 horas de fermentação.

Palavras chave: atividade enzimática, delineamento experimental, intolerância à lactose, lactase

² Situação: Será submetido à International Journal of Food Microbiology. Alessandra Bosso ^{a*}, Adriana Aparecida Bosso Tomal^a, Lucas Caldeirão^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^a. ^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor correspondente: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, *Campus* Universitário, C. P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: alessandrabosso@yahoo.com.br

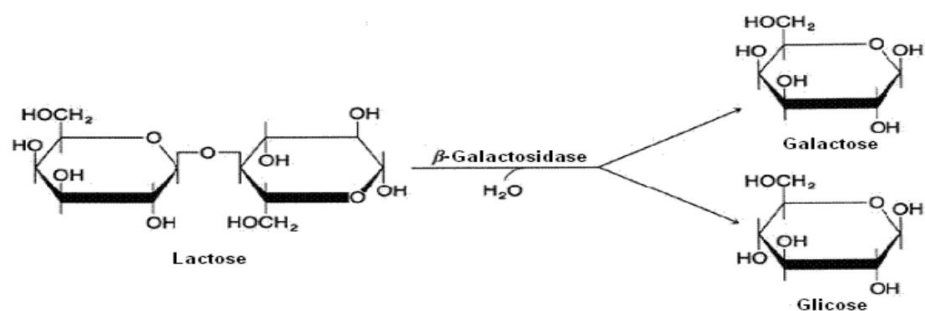
3.1 INTRODUÇÃO

2.2.1 Lactose

A lactose comumente conhecida como açúcar do leite, é encontrada no leite animal e em seus derivados. É o principal dissacarídeo presente no leite, formado por dois açúcares redutores simples, glicose e galactose (MORAIS, 2007; NEU, 2010). Possui um poder adoçante e solubilidade relativamente baixos (ADAM *et al.*, 2004; LADERO *et al.*, 2000).

Este dissacarídeo é hidrolisado pela enzima intestinal β -D-galactosidase ou lactase, liberando seus componentes monossacarídicos, glicose e galactose (Figura 1), para absorção na corrente sanguínea afim de digerir e absorver estes açúcares (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011). A hidrólise da lactose se faz necessária quando o indivíduo é acometido pela intolerância à lactose (BIPASHA *et al.*, 2015).

Figura 1 – Reação de hidrólise enzimática de lactose através do uso de β -galactosidase



Fonte: VIEIRA (2009)

2.2.2 Intolerância à lactose

Intolerância à lactose é a incapacidade parcial ou completa em digerir esse dissacarídeo (TOMAR, 2014). Essa síndrome é caracterizada pela insuficiência ou a não persistência da enzima entérica β -galactosidase no organismo, que resulta na diminuição da atividade da enzima na membrana de borda da mucosa do intestino delgado (JUAJUN *et al.*, 2011). A lactose não

absorvida passa pelo cólon e é fermentada por bactérias, havendo produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e gases, o que resulta em irritação da mucosa intestinal causando desconforto, que vai desde diarreia e dor abdominal à desnutrição grave (MAHAN; STUMP, 2005). A extensão destes sintomas é variável de indivíduo para indivíduo (TOMAR, 2014).

A intolerância à lactose é uma das deficiências enzimáticas mais comuns, acometendo grande parte da população mundial (SWAGERTY *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2014). Estima-se que acometa 70% da população mundial adulta, e o leste asiático tem o maior número de intolerantes, com mais de 90% da população (HUSAIN, 2010). Os sintomas são aliviados pela redução do consumo de alimentos que contenham lactose (JURADO *et al.*, 2002).

Assim, essa intolerância promove a existência de um mercado considerável para produtos sem lactose. A fim de produzir tais produtos é necessário que haja a hidrólise da lactose utilizando a β -galactosidases para o processo (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

2.2.3 A enzima β -galactosidase

As β -galactosidases (galactose hidrolase β -D-galactosideo, EC 3.2.1.23), popularmente conhecidas como lactases, são enzimas hidrolíticas que atuam na hidrólise da lactose, sendo empregadas na obtenção de alimentos destinados a consumidores intolerantes ao dissacarídeo (HEIDTMANN *et al.*, 2012; KAMRAN *et al.*, 2016). A sua principal aplicação tem sido a hidrólise da lactose em leite e derivados (PEREIRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

A enzima β -galactosidase pode ser obtida diversas fontes, como microrganismos, plantas e animais. De acordo com sua fonte, suas propriedades diferem notadamente (PANESAR *et al.*, 2007). No entanto, a fácil manipulação e os rendimentos promissores obtidos com microrganismo, têm favorecido como principal fonte de produção industrial de β -galactosidase (LEE *et al.*, 2003). Dentre os microrganismos mais comuns para a produção da enzima estão os fungos filamentosos e as leveduras (KIM *et al.*, 2004; KLEWICKI, 2007; RECH; AYUB, 2007; RUBIO-TEXEIRA, 2006; TELLO-SOLIS *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, as β -galactosidases possuem grande interesse tecnológico pelas indústrias e as mais utilizadas são as provenientes de *Aspergillus* spp, *Kluyveromyces* spp e *Saccharomyces* spp, pois podem ser obtidas prontamente e com elevado rendimento de culturas destes microrganismos. Adicionalmente, produtos obtidos a partir desses microrganismos são classificados como “GRAS” (Generally Recognized As Safe) pela Food and Drug Administration (FDA), o que demonstra ser um produto seguro para o consumo humano.

O interesse econômico na β -galactosidase está na grande parcela da população mundial que é intolerante a lactose (MARTINS *et al.*, 2002).

Convencionalmente, sua aplicação principal é a hidrólise da lactose de leite e derivados, mas recentemente, têm sido extensivamente estudadas a sua atividade transglicolítica para a produção de alimentos funcionais (NUMANOGLU; SUNGUR, 2004; PIVARNIK *et al.*, 1995).

Outra alternativa para indivíduos acometidos pela intolerância à lactose, é a ingestão da enzima β -galactosidase como suplemento alimentar em preparações farmacêuticas (O’CONNELL; WALSH, 2008).

2.2.4 Importância e aplicações da β -galactosidase

O elevado número de indivíduos com por essa patologia fez aumentar o interesse da indústria de alimentos em aplicar tecnologias capazes de diminuir o teor desse açúcar em produtos lácteos (HARJU *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2012).

Outras aplicações importantes da enzima β -galactosidase tem sido relatadas nas indústrias de laticínios e indústrias farmacêuticas. Na primeira a lactose é utilizada para reduzir o efeito da cristalização de lactose no leite condensado e produtos lácteos congelados (ANSARI; HUSAIN, 2011; ELNASHAR; YASSIN, 2009; GROSOVÁ *et al.*, 2008; HAIDER; HUSAIN, 2008). Já as indústrias farmacêuticas vêm se baseando na terapia de reposição de β -galactosidase para suprir a deficiência do organismo (MONTALTO *et al.*, 2006).

Diante deste contexto, as indústrias vêm buscando alternativas que atendam as pessoas com deficiência da enzima β -galactosidase, seja na linha

de produtos com baixo teor de lactose, seja produzindo formas farmacêuticas de lactase (KLEIN, 2010; MESSIA *et al.*, 2007; TREVISAN, 2008).

2.2.5 Influência do pH, temperatura e concentração do inóculo na produção da enzima lactase

Os parâmetros como temperatura, pH e concentração de inóculo quantificam a reprodução e morte celular na produção enzimática. Assim como os substratos, as condições de produção são informações importantes para a elaboração de estratégias e de controles mais eficientes para a produção da enzima β -galactosidase nas indústrias (SCHIMIDEL, 2001).

O potencial de aplicação para determinada enzima em processos industriais depende de sua atuação catalítica, ou seja, sua atividade e sua estabilidade sob diferentes condições físicas, como pH e temperatura (FURLAN *et al.*, 2001; LEHNINGER, 1997).

Diversos autores vêm desenvolvendo pesquisas visando determinar as melhores condições, tanto do ponto de vista econômico como ambiental, para produção de bioprodutos. Para tanto, observa-se um maior interesse nas variáveis como pH, fonte energética, concentração iônica, temperatura, e condições de cultivo (AKTAS *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2007; JURADO *et al.*, 2004; NOR *et al.*, 2001)

Dentre os fatores que afetam a atividade enzimática, destaca-se a concentração de H^+ (pH), que está associada à estrutura tridimensional da enzima. A partir da diminuição ou aumento do pH no meio reativo, é possível que ocorra alteração na estrutura da enzima, levando-a à desnaturação (KIELING, 2002). Dentre os parâmetros físicos o pH do meio de fermentação desempenha papel importante na produção da enzima, induzindo alterações morfológicas no microrganismo e conseqüentemente na produção enzimática e na estabilidade do produto (GUPTA *et al.*, 1994).

As β -galactosidasas produzidas por bactérias e leveduras possuem pH ótimo em faixa próxima da neutralidade, de 6,0 à 8,0, enquanto que as originadas de fungos filamentosos possuem melhor rendimento em faixa de pH ácido, variando entre 2,5 à 4,5 (KLEIN, 2010; SCHOLZ, 2011).

Um fator de grande relevância na velocidade da maioria das reações químicas é a temperatura, visto que está diretamente relacionada com a agitação das moléculas, de modo que baixas temperaturas desfavorecem, pela falta de energia suficiente, a ocorrência de uma reação química (KIELING, 2002).

Por outro lado, as reações envolvendo enzimas podem apresentar efeito inverso como consequência do aumento da temperatura. Assim, pode-se visualizar a diminuição da velocidade de reação, e dependendo do aumento da temperatura, é possível levar à desnaturação de enzima, fato este que comprova que, maiores resultados na atividade da enzima em virtude do aumento da temperatura, são limitados pela estabilidade da proteína (GUPTA *et al.*, 1994).

2.2.6 Desenho experimental

Para o delineamento experimental e análise dos resultados obtidos, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM - Response Surface Methodology) utilizando o programa "Statistica 7.0". Esta metodologia tem sido usada como importante ferramenta de avaliação dos parâmetros de processos para otimização da produção de bioprodutos (AKTAS *et al.*, 2006; BARROS NETO, *et al.*, 2001; HE; TAN, 2006; LIU *et al.*, 2006).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a influência dos parâmetros de temperatura, pH e concentração do inóculo na otimização da produção da β -galactosidase produzida por *Saccharomyces fragilis* IZ 275.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275. A levedura foi mantida a 4°C em tubos contendo Agar Batata Dextrose (ABD). A cultura foi reativada em caldo YM (extrato de malte 2% e extrato de levedura 0,5% (m/v)) incubada a 30°C, durante 48 horas, em agitador orbital a 180 rpm de agitação. O inóculo foi padronizado pela contagem de células em câmara de

Neubauer (SANTIAGO *et al.*, 2004) e posteriormente transferida (v/v) para o meio de fermentação (NOR, *et al.*, 2001).

3.2.2 Meio de produção

A *Saccharomyces fragilis* IZ 275 foi cultivada em meio de fermentação composto por sacarose (14 g/L), soro de leite (17,7 g/L), glicose (10 g/L), lactose (10 g/L), extrato de levedura (5,14 g/L), peptona (8,85 g/L), MgSO₄ (7 g/L) e K₂HPO₄ (5 g/L), sob condições de agitação de 180 rpm, durante 72 horas. O meio foi conduzido em Erlenmeyers de 250mL de capacidade, contendo 100 mL de meio de fermentação otimizada pelo autor.

3.2.3 Determinação do pH, temperatura e concentração do inóculo

O pH dos meios de fermentações foram ajustados em potenciômetro (Hanna Instruments - modelo HI3221). Após calibração com solução padrão, pH 4,0, 7,0 e 10,0 (AOAC, 2006) conforme desenho experimental. A temperatura foi ajustada em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE-421), o volume da concentração do inóculo (v/v) foi adicionada aos meios de fermentações, também conforme tabela 1. As condições de cultivo como a agitação e tempo de fermentação foram definidas de acordo com a literatura (BRAGA *et al.*, 2013; DAGBAGLI; GOKSUNGUR, 2008; HSU *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2011; MANERA *et al.*, 2011).

Erlenmeyers de 250 mL de capacidade com 100 mL do meio de fermentação foram utilizados para o estudo. As fermentações foram conduzidas em incubadora rotatória orbital, com variação do pH, temperatura e concentração de inóculo. A agitação foi mantida em 180 rpm, durante 72 horas, tendo como resposta a atividade enzimática (U/mL).

3.2.4 Desenho experimental

As variáveis estudadas e seus níveis de variação encontram-se na Tabela 1. Os efeitos das variáveis pH, temperatura e concentrações do inóculo, sobre a produção de β -galactosidase foram estudadas utilizando um

Delineamento Experimental Central Composto Rotacional 2^3 com três repetições no ponto central e seis pontos axiais totalizando 17 experimentos (Tabela 2).

Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis de variação no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2^3 com três pontos centrais e seis pontos axiais

Variáveis Independentes	NÍVEIS DE VARIAÇÃO				
	-1,68	-1,00	0	+1,00	+1,68
Temperatura °C, X_1	26,6	30	35	40	43,4
pH, X_2	4,31	5,0	6,0	7,0	7,68
Concentração do inóculo %, X_3	3,18	10	20	30	36,82

Tabela 2 - Matriz do DCCR 2^3 para os níveis codificados dos parâmetros de temperatura (X_1), pH (X_2) e concentração de inoculo (X_3)

Ensaio	X_1 (Temperatura, °C)	X_2 (pH)	X_3 (Inóculo, %)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.2.5 Extração da β -galactosidase

A extração da β -galactosidase intracelular das células de *Saccharomyces fragilis*, foi realizada utilizando-se o solvente clorofórmio (PA), conforme procedimento descrito por Nunes *et al.* (1993).

3.2.6 Determinação da atividade de β -galactosidase

A atividade enzimática foi determinada usando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato, segundo metodologia descrita por Inchaurredo *et al.* (1994).

3.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos ensaios experimentais foram tratados no software “Statística 7.0” (STATSOFT INC., 2007) para verificação dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta, atividade enzimática, ao nível de significância de 5%.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis independentes estudadas no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) estão apresentadas na Tabela 3.

Os resultados obtidos no DCCR e a resposta (atividade enzimática U/mL) evidenciaram a influência da variação dos níveis dos fatores sobre a produção da enzima β -galactosidase utilizando a levedura de *Saccharomyces fragilis*.

Tabela 3 - Matriz do DCCR 2³ decodificada para as variáveis independentes temperatura (X_1), pH (X_2) e concentração do inóculo (X_3), tendo a atividade enzimática como resposta (U/mL)

Ensaio	X_1 (Temperatura, °C)	X_2 (pH)	X_3 (Inóculo, %)	Atividade enzimática (U/mL)
1	30	5,0	10	29,69
2	30	5,0	30	21,01
3	30	7,0	10	46,50
4	30	7,0	30	44,62
5	40	5,0	10	0,13
6	40	5,0	30	0,11
7	40	7,0	10	0,12
8	40	7,0	30	0,63
9	26,6	6,0	20	11,68
10	43,4	6,0	20	0,10
11	35	4,31	20	0,10
12	35	7,68	20	22,71
13	35	6,0	3,18	0,10
14	35	6,0	36,82	21,93
15	35	6,0	20	58,51
16	35	6,0	20	58,05
17	35	6,0	20	58,11

Na Tabela 4 o modelo mostrou-se significativo para os parâmetros, temperatura linear e quadrática, pH quadrático e concentração do inóculo quadrático. E não significativos para os termos pH linear, concentração do inóculo linear e as interações temperatura vs pH, temperatura vs concentração do inóculo e pH vs concentração do inóculo. No entanto apesar desses termos apresentarem-se como não significativos, optou-se por mantê-los no modelo para preservar o coeficiente de determinação (R^2) em 0,85.

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos para atividade da β -galactosidase utilizando DCCR

Fator	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p
Média	57,5178	0,144102	399,145	0,000006*
Temperatura (L)	-23,4102	0,135362	-172,946	0,000033*
Temperatura (Q)	-32,1458	0,149105	-215,592	0,000022*
pH (L)	11,4484	0,135230	84,658	0,000139
pH (Q)	-27,9547	0,148506	-188,240	0,000028*
Concentração (L)	3,9021	0,135328	28,834	0,001201
Concentração (Q)	-28,3285	0,148955	-190,181	0,000028*
1L X 2L	-9,9775	0,176824	-56,426	0,000314
1L X 3L	2,7625	0,176824	15,623	0,004072
2L X 3L	1,8325	0,176824	10,363	0,009183

L= termo linear; Q= termo quadrático, *significativo ($p \leq 0,05$), Coeficiente de regressão (R^2)=0,85

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,85 mede a proporção da variação total da resposta que é explicada pelo modelo, ou seja, que há 85% de probabilidade dos resultados serem repetidos, mostrando assim uma boa relação entre os parâmetros de processo estudados e a atividade da enzima produzida. Assim sendo, o modelo pode ser utilizado para fins de predição e otimização.

A análise de variância está apresentada na Tabela 5. O modelo de regressão gerado foi significativo ($p \leq 0,05$) porque o $F_{\text{calculado}} = 17604,04$ foi maior que o $F_{\text{tabelado}} = 19,38$. Porém, a falta de ajuste também foi significativa ($F_{\text{calculado}} = 4065,87 > F_{\text{tabelado}} = 19,30$), embora o ideal seria um valor de $F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado} para a falta de ajuste, ou seja, não significativa.

Entretanto, como as médias nos pontos centrais foram muito próximas e o erro puro baixo (razão para o F da falta de ajuste alto), o modelo foi considerado válido para fins preditivos (BARROS NETO *et al.*, 1995; BARROS NETO *et al.*, 2001).

De acordo com Waszczyński e Nelsen (1996), quando o erro experimental da média quadrática assumir valor extremamente baixo, os testes de significância para a falta de ajuste devem ser considerados irrelevantes, o que corrobora com os dados deste trabalho.

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo.

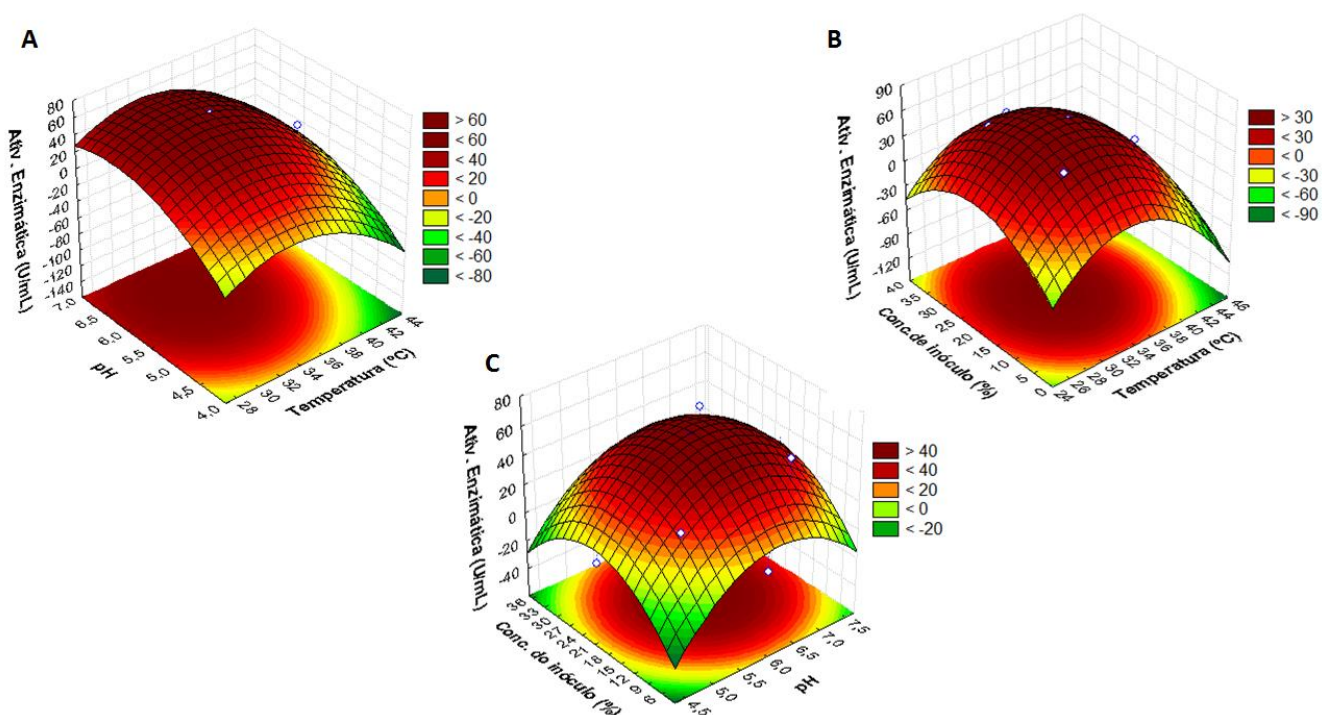
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	9981,49	9	1109,05	17604,04	19,38
Falta de ajuste	1280,77	5	256,15	4065,87	19,30*
Erro puro	0,125	2	0,063		
Total	11262,38	16			

R² = 0,85 * significativo (p ≤ 0,05)

A partir das superfícies de resposta (Figura 2 A, B e C), foi possível observar que as maiores atividades da enzima estão na região do ponto central (média de 58,22 U/mL ± 0,25), nos quais as condições experimentais foram: temperatura 35°C, pH 6,0 e concentração do inóculo 20% (v/v).

Diante das figuras das Superfícies de Respostas foi possível observar também, que as interações entre variáveis estudadas temperatura, pH e concentração do inóculo são dependentes entre si, sendo que o aumento dos níveis aumenta a resposta da atividade enzimática, exceto nas extremidades onde verifica-se queda acentuada da resposta, que pode estar relacionada com a desnaturação enzimática.

Figura 2 - Superfícies de Resposta para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)



Panesar (2008) relatou que temperaturas de cultivo da levedura acima ou abaixo de ponto ótimo do crescimento, faz com que haja problemas de metabolismo celular e conseqüentemente pode afetar a atividade enzimática e implicar em perdas de produtividade. Isso pode ser confirmado, pois as leveduras são microrganismos mesófilos, e em geral, as temperaturas ótimas para a sua utilização em processos fermentativos se situam-se na faixa entre 25°C - 35°C.

No que diz respeito ao pH, Neves (2003), assegurou que é uma importante variável a ser estudada em um processo fermentativo por microrganismos, pois cada cepa possui uma faixa ótima de pH. Klovrychev *et al.* (1979) afirmaram que o pH de um sistema afeta, pelo menos, dois aspectos de células microbianas, ou seja, o funcionamento das suas enzimas e o transporte de nutrientes dentro da célula. Já na concentração de inóculo, estudo realizado por Panesar (2008) verificou que as concentrações do inóculo entre 4% e 12% (v/v) na produção de lactase com *K. marxianus* promoveu a

menor atividade da enzima quando foi obtida com a menor concentração de inóculo. Resultado semelhante ao estudo apresentado

Outros autores realizaram trabalhos análogos para a produção da enzima β -galactosidase utilizando leveduras. Manera *et al.* (2008), otimizaram a produção de β -galactosidase utilizando *K. marxianus* CCT 7082, por fermentação submersa, utilizando o planejamento experimental e Metodologia de Superfície de Resposta. Os valores estabelecidos para a maior atividade enzimática foram pH 6,0, lactose 28,2 g/L, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 8,8 g/L, atividade enzimática de 10,6 U/mL, com 120 horas de fermentação. Valor de pH muito próximo ao utilizado nesse trabalho, contudo a atividade alcançada foi de 59,85 U/mL, 5,6 vezes maior e 72 horas de fermentação.

Furlan *et al.* (2001), determinou as melhores condições de produção de lactase, por *Kluyveromyces marxianus* CDB 002, empregando melaço de cana (meio isento de lactose). No experimento os autores determinaram pH 5,5 e temperatura na faixa de 30°C e 34°C como melhores valores, alcançando uma atividade enzimática de 21,8 U/mL. No trabalho apresentado a temperatura que obteve maior atividade é próxima a temperatura de Furlan *et al.* (2001), no entanto a atividade enzimática é superior, 59,85 U/mL. Essa diferença em relação aos resultados obtidos pode estar relacionada às diferentes fontes de carbono utilizadas pelos autores.

Já Meera *et al.* (2013) avaliaram o efeito da temperatura e do pH na produção de β -galactosidase proveniente de levedura probiótica. No estudo a maior atividade enzimática foi de 53 U/mL em meio de fermentação com pH 5,0 temperatura de 35°C e 24 horas de fermentação. Temperatura muito próxima (33°C) foi otimizada neste trabalho, mas com atividade de 59,85 U/, em período de fermentação de 72 horas. As diferenças entre os resultados das atividades enzimáticas publicados pelos autores podem ser devido a diferentes composições do meio de fermentação, diferentes estirpes de levedura utilizada e também condições de cultivo.

3.3.1 Valores preditos

Baseado na análise de Superfície de Resposta onde pode-se verificar que existe uma região de otimização e não apenas um ponto de otimização

para cada variável, foi realizada a análise de valores preditos (Tabela 6) para obtenção da máxima atividade enzimática através da intrapolação das variáveis independentes.

Tabela 6 - Valores preditos da variável dependente

Temperatura (°C)	pH	Concentração (%)	Valor predito (U/mL)
30	6,0	20	53,25
33	6,0	20	59,66
34	6,0	20	59,23
33	5,9	20	58,94
33	6,2	20	60,24
33	6,3	20	60,11
33	6,2	19	59,90
33	6,2	22	60,06
33	6,2	24	58,75

Diante dos valores observados na tabela dos valores preditos, foi possível constatar que a máxima atividade enzimática (60,24 U/mL) está diretamente relacionada com a massa celular produzida nessa condição de cultivo, temperatura 33°C, pH 6,2 e concentração do inóculo 20%. Esses valores estão dentro da região ótima indicada pelas análises das Superfícies de Respostas.

3.3.2 Validação do modelo

Afim de validar o modelo predito foi realizado um experimento em triplicata com os seguintes parâmetros: temperatura 33°C, pH 6,2 e concentração de inóculo 20% eguido pelo teste t Student (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste t Student para validação do modelo empírico ($p > 0,05$)

	Atividade enzimática (U/mL)	p-valor
Modelo predito	60,24	
Validação	59,85*±0,51	0,408

*média dos três experimentos com nível de significância ($p > 0,05$)

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a Metodologia de Superfície de Resposta foi uma ferramenta útil para otimização dos parâmetros na produção da β -galactosidase. A maior atividade enzimática predita pelo modelo foi de 60,24 U/mL, a validação indicou atividade enzimática de 59,85 U/ml, valor que corresponde a 99,3% do valor predito, confirmando assim a validade do modelo proposto. Para essa resposta as condições de produção da enzima foram: temperatura 33°C, pH 6,2 e concentração e inóculo 20% (v/v), com agitação de 180 rpm e 72 horas de fermentação.

3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., Polaina, J., 2004. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective, *Critical. Review. Food Science. Nut.* 44, 553-557.

Aktas, N., Boyaci, I. H., Mutlu, M. e Tanyolac, A., 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM) 504, *Bioresource Technology*, 97, 2252-2259.

Ansari, S. A., Husain, Q., 2011. Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles its future aspects in biosensors applications, *Journal Molecular Catalysis B: Enzym.*70, 119–126.

Association of Official Analytical Chemists International - AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. 17 ed. Arlington, 2, 474.

Barbosa, C. R., Andreazzi, M. A., 2011. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio, *Revista Saúde e Pesquisa*, 4, 81-86.

Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., 1995. Planejamento e otimização de experimentos, 2 ed. Ed. UNICAMP, Campinas.

Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., 2001. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, EDUNICAMP, Campinas.

Bipasha, D., Ananda, P. R., Sangita, B., Sudip C., Chiranjib B., 2015. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 121, 244–252.

Braga, A. R. C., Manera, A. P., Ores, J. C., Sala, L., Maugeri Filho, F., Kalil, S. J., 2013. Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified Beta-Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides, *Food Technology and Biotechnology*. 51, 45-52.

Dagbagli, S., Goksungur, Y., 2008. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology, *Electronical Journal Biotechnology*. 11, 1-12.

Elnashar, M. M. M., Yassin, M. A., 2009. Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 159, 426–437.

Furlan, S. A., Schneider, A. L. Dos S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M. De F., Jonas, R., 2001. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium, *Acta Biotechnology*, 21 - 57 – 64.

Grosová, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M., 2008. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry – A Review, Czech Journal Food Sciene. 26, 1–14.

Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., Domingues, L., 2010. Fermentação de lactose a bio-ethanol por leveduras como parte de soluções integradas para a valorização do soro de queijo, Biotechnology Advances. 28, 375-384.

Gupta, A. K., Singh, D. P., Kaur, N., Singh, R., 1994. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*, Journal Chemistry Technology Biotechnology. 59 -377-385.

Haider, T., Husain, Q., 2008. Concanavalin A layered calcium alginate-starch beads immobilized β galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients, International Journal Pharmaceutics. 359, 1–6.

Harju, M., Kallioinen, H., Tossavainen, O., 2012. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects, International Dairy Journal. 22, 104-109.

He, Y. Q., Tan, T. W., 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125, Journal of Molecular Catalysis Enzymatic B. 43, 9-14.

Heidtmann, B. R., Duarte, H. S., De Pereira, P., Braga, C. R. A., 2012. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio, Brazil Journal Food Technology. 15, 1981-6723.

Hsu, C. A., Yu, R. C., Chou, C. C., 2005. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions, International Journal of Food Microbiology. 104, 197– 206.

Hsu, C. A., Yu, R. C., Lee, S. L., Chou, C. C., 2007. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter, *International Journal of Food Microbiology*. 116, 186-189.

Husain, Q., 2010. Beta-galactosidases and their potential applications: a review, *Critical Review Biotechnology*. 30, 41-62.

Inchaurredo, V. A., Yantorno, O. M., Voget, C. E., 1994. Yeast growth and β galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium, *Process Biochemistry*. 29, 47-54.

Juajun, O., Nguyen, T. H., Maischberger, T., Igbal, S., Haltrich, D., 2011. Cloning, purification and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Applied. Microbiology Biotechnology*. 89, 645-654.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M., 2002. A new kinetic model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme Microb Technology*. 31 - 300-9.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M., 2004. Kinetic model of activity for proposed for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature, *Enzyme and Microbial Technology*. 34, 33-40.

Kamran, A., Bibi, B., Aman, A., Qader, S. A. U, 2016. Lactosehydrolysis approach: Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strainB-2, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 5 - 99–103.

Kieling, D. D. 2002. Enzimas, aspectos gerais, Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis.

Kim, C.S., Ji, E. S., Oh, D. K., 2004. Characterization of a thermostable recombinant beta-galactosidase from *Thermotoga maritime*, Journal Applied Microbiology 97 - 1006–1014.

Klein, M. P., 2010. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose, Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS – Brasil.

Klewicki, R., 2007. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β -galactosidase, Food Chemistry. 100 - 1196–1201.

Klovrychev, M. F., Korolev, P. N., Bulgakova, V. G., 1979. Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis*, Microbiology. 47 - 357-361.

Kong, F., Wang, Y., Cao, S., Gao, R., Xie, G., 2014. Cloning, purification and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10, Process Biochemistry. 49 - 775-82.

Kumar, M. D. J., Sudha, M., Devika, S., Balakumaran, M. D., Kumar, M. R., Kalaichelvan, P. T., 2012. Production and optimization of β -galactosidase by bacillus Sp. MPTK 121. Isolated from Dairy Plant Soil, Annals of Biological Research. 4, 1712-1718.

Ladero, M., Santos, A., Garcia-Ochoa, F., 2000. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized [beta]-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, Enzyme and Microbial Technology. 27, 583-592.

Lee, D. H., Kang, S. G., Suh, S. G., Byun, J. K., 2003. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*), Molecular Cells. 15 - 68–74.

Lehninger, A. L., 1997. Princípios de Bioquímica, 3. ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda.

Lima, A. F., Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., Cavalcante, K. F., Gonçalves, L. R. B., 2011. Seleção de espécies de *Kluyveromyces* para produção de β -galactosidase em soro de leite, XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul.

Liu, C. H., Lu, W. B., Chang, J. S., 2006. Optimizing lipase of *Burkholderia* sp. by response surface methodology, *Process Biochemistry*. 41, 1940-1944.

Mahan, L. K., Stump, S. E., 2005. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia, 11ª Edição. Editora ROCA, São Paulo.

Manera, A. P., Ores, J. C., Ribeiro, V. A., Burkert, C. A. V., Kalil, S. J., 2008. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, *Food Technology and Biotechnology*. 46, 66-72.

Manera, A. P., Ores, J. C., Ribeiro, V. A., Rodrigues, M. I., Kalil, S. J., Maugeri Filho, F., 2011. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, *Acta Scientiarum Technology*. 33, 155–161.

Martins, A. R., Monteiro, R. L., Burkert, J. F.M., Burkert, C. A. V., 2012. Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content, *Ciência e Agrotecnologia*. 36, 551-559.

Martins, D. B. G., Souza, C. G., Simões, D. A., Morais, M. A., 2002. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 decreases by high concentrations of galactose, *Current Microbiology*. 44, 379-382.

Meera, N. S., Theja, P. C., Devi, M. C., 2013. Production and optimization of β -galactosidase enzyme using probiotic *Yeast Spp*, Scholars Research Library Annals of Biological Research. 4 - 62-67.

Messia, M. C., Candigliota, T., Marconi E., 2007. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk, Food Chemistry. 104, 910 -917.

Montalto, M., Curigliano, V., Santoro, L., Vastola, M., Cammarota, G., Manna, R., Gasbarrini, A., Gasbarrini, G., 2006. Management and treatment of lactose malabsorption, World Journal of Gastroenterology. 12, 187 – 191.

Morais, M. B., 2007. Intolerância à Lactose: Fatos e Mitos.

Neu, J., 2010. Early feeding, human Milk and the transition. National Institutes of Health (NIH) – Concensus Development Conference: Lactose Intolerance and Health: 33 – 34.

Neves, L. C. M., 2003. Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181, 284p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

Nor, Z. M., Tamer, M. I., Mehrvar, M., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Jervis, E. J., 2001. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*, Biotechnology Letters. 23, 845-849.

Numanoglu, Y., Sungur, S., 2004. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system, Process Biochemistry. 39, 705-711.

Nunes, M. F. A., Massauger, S., Monte Alegre, R., 1993. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo. 29, 25-30.

O'connell, S., Walsh, G., 2008. Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance, *Applied Biochemistry Biotechnology*. 149, 129-38.

Panesar, P. S., 2008. Application of response surface methodology for maximal lactose hydrolysis in whole milk using permeabilized yeast cells, *Acta Alimentaria*. 37, 191- 203.

Panesar, R., Panesar, P. S., Singh, R. S., Kennedy, J. F., Bera, M. B., 2007. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells, *Food Chemistry*. 101, 786-790.

Pereira-Rodríguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M., Sanzá-Aparicio, J., 2012. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*. 177, 392-401.

Pivarnik, L. F., Senecal, A. G., Rand, A. G., 1995. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing, *Advances in Food and Nutrition Research*. 38, 1-102.

Rech, R., Ayub, M. A. Z., 2007. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey, *Process Biochemistry*. 42, 873 – 877.

Rubio-Teixeira, M., 2006. Endless versatility in the biotechnology applications of *Kluyveromyces* LAC genes, *Biotechnology Advances*, 24, 212-225.

Santiago, P., Marquez, L. D. S., Cardoso, V. L., Ribeiro, E. J., 2004. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*, *Ciência e Tecnologia Alimentícia*. 24, 567–572.

Schimidel, W., 2001. Biotecnologia dos processos fermentativos. In: engenharia bioquímica. Editora Edgar Blucher, v. 2, 2001.

Scholz, E. B., 2011. Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase, Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC – Brasil.

Statsoft 2007 Statistic (data analysis software system), version 7.0 Tulsa Statsoft Inc Available from: www.satsoft.com.

Swagerty, D. Z., Walling, A. D., Klein, R. M., 2002. Lactose Intolerance, American Family Physician. 65, 1845-1850.

Tello-Solís, S. R., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez-Ruíz, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., 2005. Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH, Journal Agricultural Food Chemistry. 53, 10200-10204.

Tomar, B. S., 2014. Lactose intolerance and other disaccharidase deficiency, Indian Journal Pediatrics. 81, 876-80.

Trevisan, A. P., 2008. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactase em leite pasteurizado, 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFSM, Santa Maria-RS.

Vieira, D. C., 2009. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação, Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, SP – Brasil.

Waszczynskyj, K., Nelsen, T., 1996. Collaborative study on sensory and volatile compound analysis of oils, *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73, 157-166.

CAPÍTULO IV - ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA PERMEABILIZAÇÃO CELULAR DE *SACCHAROMYCES FRAGILIS* IZ 275 UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS³

RESUMO: A hidrólise enzimática da lactose é uma das aplicações biotecnológicas mais promissoras na indústria alimentar, a qual pode ser utilizada para solucionar os problemas de indivíduos com intolerância à lactose. Uma alternativa para resolver essa questão constituiu em permeabilizar às células de leveduras produtoras da enzima β -galactosidase que hidrolisa a lactose. A permeabilização das células de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 foi realizada utilizando os solventes orgânicos etanol, acetona e clorofórmio. Os experimentos foram conduzidos primeiramente através de um Delineamento Fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central, avaliando as variáveis concentração de solvente (X_1), temperatura (X_2) e tempo (X_3), tendo como resposta a porcentagem de hidrólise da lactose em leite integral. Após avaliação dos resultados, um bloco foi adicionado ao Delineamento Fatorial com adição de 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, configurando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) que totalizou 20 ensaios. Utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, foi possível observar que as melhores condições de otimização do processo para cada solvente foi: etanol 30%, 35°C e 40 minutos de reação alcançando 73,53% de hidrólise da lactose. Já para acetona, a otimização se deu com 40% de solvente, temperatura de 39,05°C e 76,18 minutos, com 79,23% de hidrólise da lactose. Em relação ao clorofórmio a melhor resposta foi na concentração de solvente de 4%, temperatura de 25°C e 20 minutos de tratamento, obtendo assim uma hidrólise da lactose de 81,03%. Diante do exposto concluiu-se que a permeabilização celular é um método eficaz para hidrolisar a lactose.

Palavras-chave: acetona, clorofórmio, etanol, hidrólise, intolerância à lactose.

³ Situação: Será submetido ao Enzyme and Microbial Technology. Alessandra Bosso^{a*}, Adriana Aparecida Bosso Tomal^a, Lucas Caldeirão^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^a. ^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. * Autor correspondente: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, C. P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: alessandrabosso@yahoo.com.br

4.1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose é uma deficiência que acomete em aproximadamente 70% da população mundial e envolve a ausência ou a má absorção intestinal da lactose [1]. A lactose é um dissacarídeo presente em leites e derivados, alimentos considerados fontes de cálcio e de muita importância na alimentação humana [2]. Indivíduos que são acometidos pela intolerância à lactose tem ausência da enzima β -galactosidase no organismo [3].

A enzima β -galactosidase ou β -D-galactoside-galactohydrolase (EC 3.2.1.23), também conhecida como lactase, é uma enzima importante biotecnologicamente em indústrias de alimentos e indústrias farmacêuticas [4,5]. É amplamente utilizada para reduzir o teor de lactose em leite e derivados lácteos, através da hidrólise enzimática, resultando em glicose e galactose, para que assim consumidores intolerantes a esse dissacarídeo possam usufruir de tais produtos [6,7]. A aplicação da hidrólise também leva a melhoria das propriedades sensoriais e tecnológicas dos produtos, como maior doçura, maior solubilidade e prevenção da cristalização do dissacarídeo em produtos congelados [8].

A enzima lactase pode ser obtida por diferentes fontes como, microrganismos, plantas e células animais, contudo as obtidas por microrganismos são as mais interessantes do ponto de vista tecnológico [9,10]. As provenientes de leveduras são comumente utilizadas na produção da enzima β -galactosidase e também reconhecidas como Generally Recognized as Safe (GRAS) [11,12]. Nesse contexto, a enzima lactase produzida por leveduras possui pH de atuação neutro, o que é adequado para o processo de hidrólise da lactose em leites e soro de leite doce por exemplo [13].

No entanto, as aplicações industriais da hidrólise enzimática são dificultadas devido à localização intracelular da enzima de levedura, o que torna o processo de extração complexo e oneroso [13]. Sendo assim existe a necessidade do rompimento celular ou da permeabilização da membrana da célula sem causar desnaturação da enzima [14]. Dessa maneira a técnica de permeabilização pode auxiliar na resolução dessa problemática, e assim

permitir que a molécula-alvo seja liberada para o meio extracelular sem formações de fragmentos celulares [15].

A permeabilização celular é um processo para se obter enzimas intracelulares [16]. Essa técnica modifica a estrutura da membrana do microrganismo, diminuindo o conteúdo de fosfolipídios na membrana e facilitando a entrada e saída de solutos, tais como a lactose e seus produtos reacionais, para aumentar a permeabilidade da célula [17,18,19]. Os métodos de permeabilização são simples, rápidos e permitem o ensaio de enzimas sob o meio ambiente natural da célula [20]. Segundo Somkuti, Dominiecki e Steinberg [21] as células permeabilizadas podem ser consideradas portadoras de enzimas as quais permanecem em estado naturalmente imobilizado. Assim, as células são poupadas de tratamentos drásticos, como a ruptura celular [18].

Vários solventes têm sido utilizados para este fim devido ao baixo custo e boa permeabilização obtida [22]. Diversos processos de permeabilização de células de microrganismos com solventes orgânicos são relatados na literatura, solventes como etanol, clorofórmio, e também misturas de solventes orgânicos como clorofórmio-etanol, etanol-isopropano têm sido estudados para o aumento da permeabilidade celular [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

Jordão, Brando e Passos [30] estudaram a capacidade de permeabilização das células de *Kluyveromyces lactis*. Os autores relataram que a enzima contida nas células secas permeabilizadas com etanol 50% apresentou boa capacidade de hidrólise da lactose no leite (0,35mM/min/mg de célula) e também alta estabilidade. Flores, Voget e Ertola [31] permeabilizaram células de *Kluyveromyces lactis* utilizando como solvente, clorofórmio, tolueno e etanol e suas misturas. Os autores relataram que a permeabilização celular foi altamente dependente da concentração do solvente, temperatura e tempo. Nesse estudo a máxima resposta obtida foi com 2% de clorofórmio em temperaturas entre 5 e 37°C, os autores ressaltaram que a 37°C a permeabilização foi mais rápida (5 min), alcançando atividade de 10,8 µmol/min de ONPG.

Assim, a permeabilização de células pode ser utilizada como ferramenta importante para o processo de biotransformação que pode ser uma alternativa viável na produção de produtos com baixo teor de lactose [20].

Dessa forma o objetivo do trabalho foi otimizar as condições do processo de permeabilização de células de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 com solventes orgânicos, etanol, acetona e clorofórmio, para a máxima hidrólise da lactose utilizando Metodologia de Superfície de Resposta.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi a *Saccharomyces fragilis* IZ 275. A levedura foi mantida a 4°C em tubos de rosca inclinado contendo Agar Batata Dextrose (ABD). A cultura foi reativada em caldo YM (extrato de malte 2% e extrato de levedura 0,5% (m/v)), incubada a 30°C, durante 48 horas, em agitador orbital a 180 rpm de agitação. O inóculo foi padronizado pela contagem de células em câmara de Neubauer [14] e posteriormente transferido (v/v) para o meio de fermentação [32].

4.2.2 Meio de fermentação

A *Saccharomyces fragilis* IZ 275 foi cultivada em meio de fermentação composto por sacarose (14 g/L), soro de leite (17,7 g/L), glicose (10 g/L), lactose (10 g/L), extrato de levedura (5,14 g/L), peptona (8,85 g/L), MgSO₄ (7 g/L) e K₂HPO₄ (5 g/L), em condições de temperatura de 33°C, pH 6,3 e concentração do inóculo 20% (v/v) em agitação de 180 rpm, durante 72 horas. O meio foi conduzido em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio de fermentação.

4.2.3 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) na Permeabilização celular

Para avaliar os parâmetros da permeabilização celular da *Saccharomyces fragilis* IZ 275 em relação à hidrólise da lactose, foi aplicado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para cada solvente (etanol, acetona e clorofórmio) contendo três variáveis e replicatas no ponto central. As variáveis independentes codificadas e não codificadas estão apresentadas na Tabela 1 com seus níveis de variação. O DCCR foi realizado

em 2 blocos (Tabela 2). O bloco de modelagem exploratória (bloco 1) foi realizado com 11 ensaios (8 pontos fatoriais e 3 pontos centrais). A modelagem foi realizada no bloco 2 com 9 ensaios (6 pontos axiais e 3 pontos centrais), para a otimização, totalizando 20 ensaios nos dois blocos.

Tabelas 1 - Variáveis independentes e níveis de variação no DCCR

Variáveis Independentes	NÍVEIS DE VARIAÇÃO				
	-1,80	-1,00	0	+1,00	+1,80
Etanol ou Acetona					
Concentração de solvente (%) X_1	11,90	20	30	40	48,09
Temperatura (°C) X_2	20,95	25	30	35	39,05
Tempo (min) X_3	3,82	20	40	60	76,18
Clorofórmio					
Concentração de solvente (%) X_1	1,19	2,00	3,00	4,00	4,81
Temperatura (°C) X_2	20,95	25	30	35	39,05
Tempo (min) X_3	3,82	20	40	60	76,18

A função resposta (hidrólise da lactose) foi utilizada para realizar a análise de regressão e análise de variância (ANOVA). As figuras de Superfície de Resposta e Perfil de Desejabilidade foram geradas para a função resposta. Todas as análises executadas foram realizadas com o software estatística 7.0 [33].

Após a análise da Superfície de Resposta e representação gráfica do Perfil de Desejabilidade para a máxima hidrólise da lactose, o modelo proposto foi validado e novos ensaios foram realizados em triplicata, os resultados foram comparados com a resposta estimada por Teste t de Student ($p > 0,05$).

4.2.4 Permeabilização de células de levedura de *Saccharomyces fragilis* IZ 275

A permeabilização das células de levedura foi realizada segundo Panesar *et al.* [13] com modificações. Foram coletados 5 mL do meio de fermentação, em seguida foi realizada a centrifugação (6000g, 10 min a 5°C). O sobrenadante foi descartado e a biomassa de levedura lavada duas vezes com tampão fosfato (0,1 M, pH 6,6) nas mesmas condições acima citadas. Novamente o sobrenadante foi descartado e a biomassa utilizada para o processo de permeabilização. As concentrações dos solventes, bem como a temperatura e o tempo, foram determinadas conforme Delineamento

Experimental. Após a adição dos solventes (m/v), os tubos foram homogeneizados em vórtex e os ensaios foram conduzidos em banho-maria. Após a finalização do processo de permeabilização os tubos foram levados em banho de gelo para interromper o procedimento e em seguida foram centrifugados (6000g, 10 min, 5°C) para a remoção do excesso de solvente.

4.2.5 Determinação da hidrólise da lactose com células permeabilizadas

Para determinar a hidrólise da lactose, a massa celular permeabilizada (equivalente a 5mL do meio) adicionada em 50 mL de leite integral e levada em banho-maria a 37°C durante 60 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas e levadas em banho de água fervente por 5 minutos para paralisar a reação de hidrólise e posteriormente em banho de gelo por 3 minutos para posterior análise. A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase utilizando *kit Glicose-Laborclin Bioliquid*. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração inicial de lactose e a concentração de glicose liberadas foram utilizadas para calcular a porcentagem de hidrólise.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura para visualização das células permeabilizadas foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram primeiramente fixadas em glutaraldeído 3% e paraformaldeído 3% e aderidas em lamínula preparada com povidexrina, e mantidas *overnight* em temperatura refrigerada. Em seguida realizou-se 3 banhos de 15 minutos com tampão fosfato 0,1M, e fixação em ósmio 1% durante 1 hora seguido de banho de 15 minutos em tampão fosfato 0,1M e mais 3 banhos seriados em álcool 70%, 80%, 90% e 100%. Posteriormente as amostras foram montadas em stubs de alumínio usando fitas de carbono e cobertas com ouro (Sputter coater- Baltec SCD 050). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEIQuanta 200.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizado, para fins exploratórios, um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central para cada solvente (corridas 1-11). Um segundo bloco de experimentos foi realizado contendo seis pontos axiais e três pontos centrais, a fim de otimizar as variáveis estudadas (corridas 12-20) (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz do planejamento com as variáveis codificadas para o estudo de otimização da permeabilização celular de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 tendo a hidrólise da lactose como resposta

Corrida	X ₁ (Conc. de solvente (%))	X ₂ (Temperatura (°C))	X ₃ (Tempo (min))	Y ^a (Hidrólise (%))	Y ^b (Hidrólise (%))	Y ^c (Hidrólise (%))
1	-1	-1	-1	41,96	72,55	77,18
2	1	-1	-1	64,27	76,92	81,03
3	-1	1	-1	69,32	75,52	76,41
4	1	1	-1	70,26	73,97	74,53
5	-1	-1	1	49,40	67,32	64,02
6	1	-1	1	76,15	70,07	70,77
7	-1	1	1	74,36	72,11	78,03
8	1	1	1	77,00	75,32	75,47
9	0	0	0	73,93	73,34	73,08
10	0	0	0	73,42	72,89	73,38
11	0	0	0	74,20	72,76	74,01
12	-1,80	0	0	48,87	54,44	45,32
13	1,80	0	0	64,33	63,27	63,45
14	0	-1,80	0	67,17	66,15	49,77
15	0	1,80	0	63,54	81,48	47,79
16	0	0	-1,80	67,70	66,76	68,14
17	0	0	1,80	60,97	71,54	64,42
18	0	0	0	74,07	71,96	73,76
19	0	0	0	73,36	72,71	74,86
20	0	0	0	73,79	72,88	73,88

Y^a% de hidrólise para planejamento com etanol; Y^b% de hidrólise para planejamento com acetona; Y^c% de hidrólise para planejamento com clorofórmio.

Os modelos quadráticos gerados para os três planejamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e apresentaram alta significância estatística, ou seja, as variáveis estudadas influenciaram a permeabilização celular estimada pela porcentagem de hidrólise (Tabela 3). Foi possível observar também que os modelos sofreram falta de ajuste, entretanto, após avaliação residual (resíduos vs. preditos) não foi constatado um comportamento distinto da distribuição normal e características heterocedásticas. Adicionalmente, os valores das médias quadráticas do erro puro para os modelos (MQep) resultaram em valores muito baixos para os que utilizaram etanol ou acetona como solvente permeabilizante (etanol = 0,1423 e acetona = 0,1775), logo, o valor de F para o ajuste do modelo para as respostas podem ser superestimados com a subestimação do valor de MQep, resultando na falta de ajuste observada.

O modelo para planejamento envolvendo o clorofórmio, apresentou resíduos muito elevados (observados vs predito), portanto, o modelo foi desconsiderado. Também foi observado que existe uma diferença expressiva entre os blocos, essa diferença deve-se as condições extremas proporcionadas pelos pontos axiais que inviabilizaram a permeabilização e conseqüentemente a porcentagem de hidrólise, seja pela baixa concentração de solvente (ensaio 12), tempo insuficientemente curto para a ação do solvente (ensaio 14) ou excessivamente longo (ensaio 15), que pode ter levado a ruptura celular e extravasamento da enzima de interesse. A maior resposta para esse planejamento foi para o ensaio 2 (81,03% de hidrólise da lactose), o qual foi realizado com 4% de solvente, temperatura de 25°C e 20 minutos de tratamento. Esse resultado foi, assim como no planejamento utilizando acetona, 8,5 unidades maiores do que a média de todos os ensaios (72,41%).

Tabela 3 - Coeficientes e estatística F para modelos gerados a partir do planejamento experimental.

Experimentos	Intercepto	Bloco	Coeficiente										
			X_1	X_2	X_3	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	F_{REG}	F_{FAJ}
Etanol	73,83	-0,84	5,54	-4,89	3,61	-2,22	1,30	-2,53	-5,68	0,77	-0,94	1216,31 ^a	556,19 ^b
Acetona	72,82	-1,81	1,33	-3,02	2,60	1,09	-0,38	-0,34	-0,68	-	1,25	232,72 ^c	88,93 ^d
Clorofórmio	72,41	-6,34	2,68	-2,74	0,54	-4,45	-1,90	0,90	-1,88	-	3,25	241,19 ^c	151,59 ^d

X_1 = concentração (L) X_2 = temperatura (L); X_3 = tempo (L); X_1^2 =concentração (Q); X_2^2 = temperatura (Q); X_3^2 = tempo (Q); X_1X_2 =concentração vs temperatura; X_1X_3 = concentração vs tempo e X_2X_3 = temperatura vs tempo.

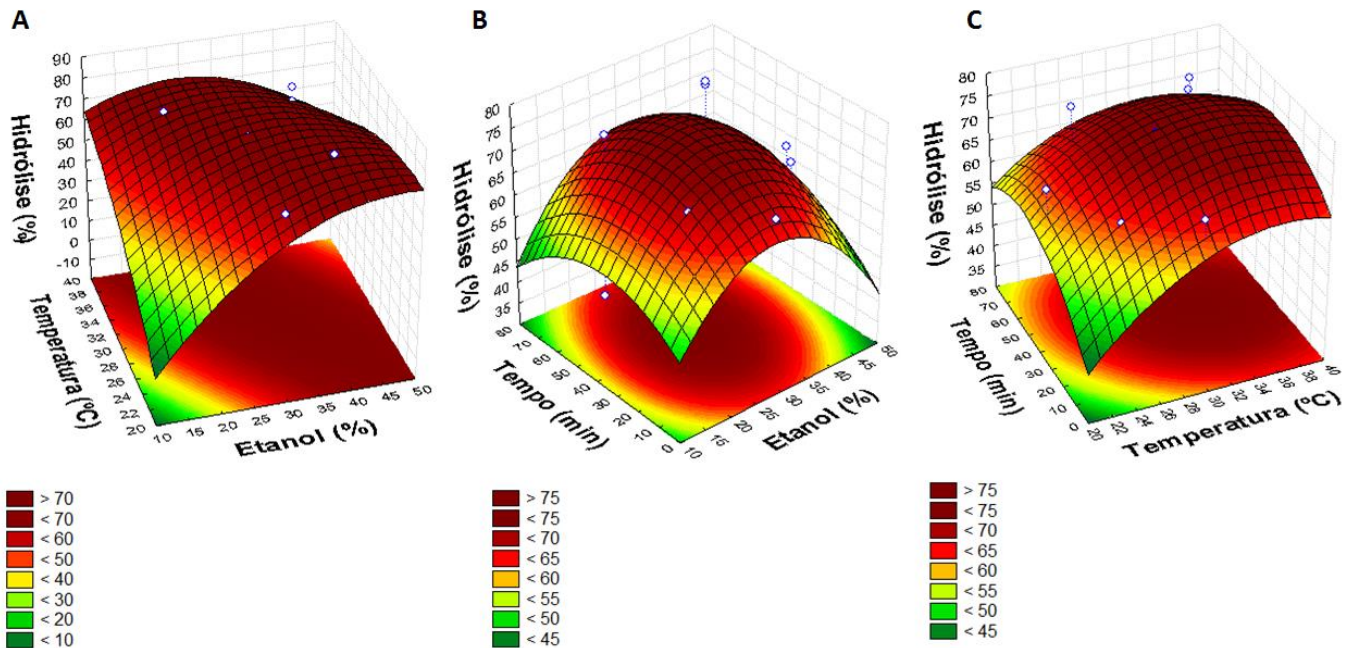
F_{REG} = Valor de F para regressão; F_{FAJ} = Valor de F para falta de ajuste; ^a F crítico = 6,00; ^b F crítico = 6,26; ^c F crítico = 6,04; ^d F crítico = 6,16.

A partir das Superfícies de Resposta geradas para o delineamento envolvendo o etanol como solvente permeabilizante, foi possível observar as dependências entre as variáveis. A Figura 1A indica que a temperatura mostrou-se dependente da concentração de etanol, uma vez que a resposta (hidrólise da lactose) aumentou quando a temperatura esteve nos seus níveis mais elevados em relação à mesma concentração de etanol.

Na Figura 1B foi possível observar que as maiores respostas estão na região do ponto central, e que a dependência do tempo em relação a concentração de etanol indicou que nos níveis extremos tem-se menores respostas.

A interação tempo versus temperatura (Figura 1C) indica que a hidrólise da lactose é dependente dessas variáveis, uma vez que a resposta aumentou quando a temperatura foi mais elevada em relação a um mesmo tempo.

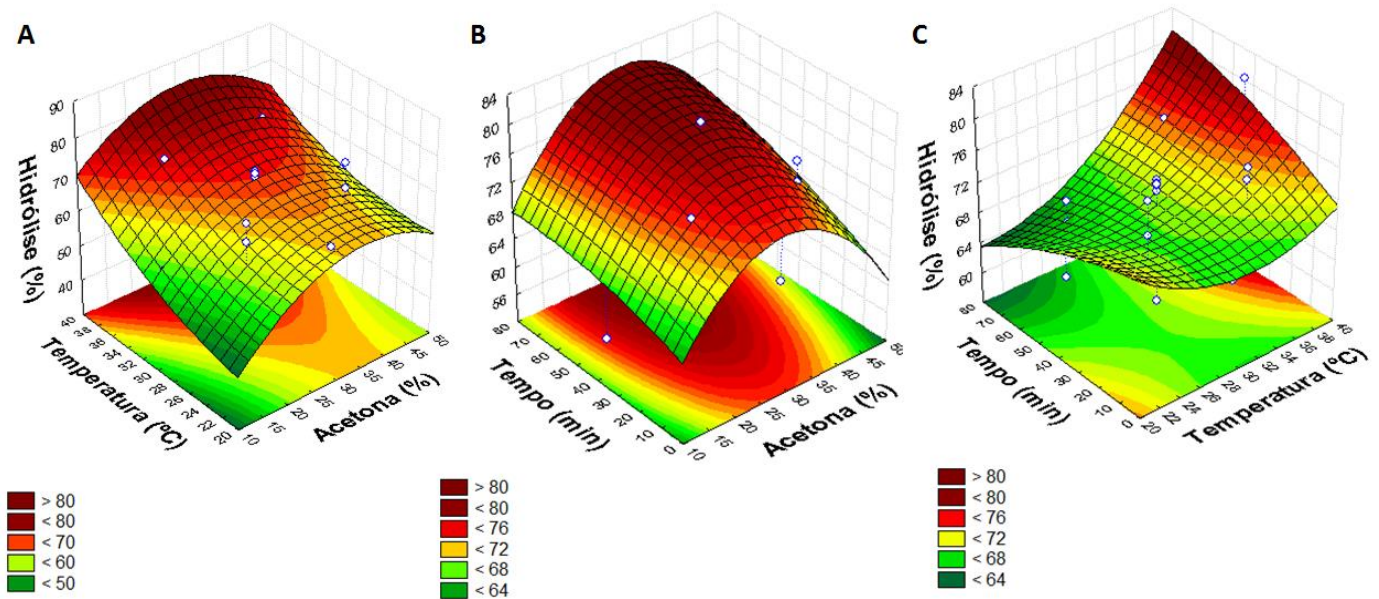
Figura 1 - Superfícies de resposta para DCCR utilizando etanol como solvente permeabilizante.



Na Figura 2 observa-se a Superfície de Resposta gerada para o delineamento utilizando acetona como solvente de permeabilização. Nota-se que as maiores porcentagens da hidrólise da lactose estão associadas nos maiores níveis de temperatura, entretanto a resposta é diminuída quando utilizada as concentrações de acetona nos níveis extremos (Figura 2A). O mesmo ocorre na interação entre

concentração de acetona e tempo para a hidrólise da lactose (Figura 2B). A Figura 2C indica que a temperatura é dependente do tempo, onde a máxima resposta é obtida quando a temperatura e o tempo estão nos seus níveis mais altos.

Figura 2 - Superfícies de resposta para DCCR utilizando acetona como solvente permeabilizante.



Outros autores realizaram estudos de permeabilização de células de leveduras com solventes orgânicos e surfactantes obtendo resultados expressivos na hidrólise da lactose. Kaur *et al.* [6] pesquisaram as variáveis que afetam o processo de hidrólise da lactose com células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando brometo de cetiltrimetil amônio como agente permeabilizante, e alcançaram um máximo de 90,5% de hidrólise após 90 minutos de incubação à 40°C.

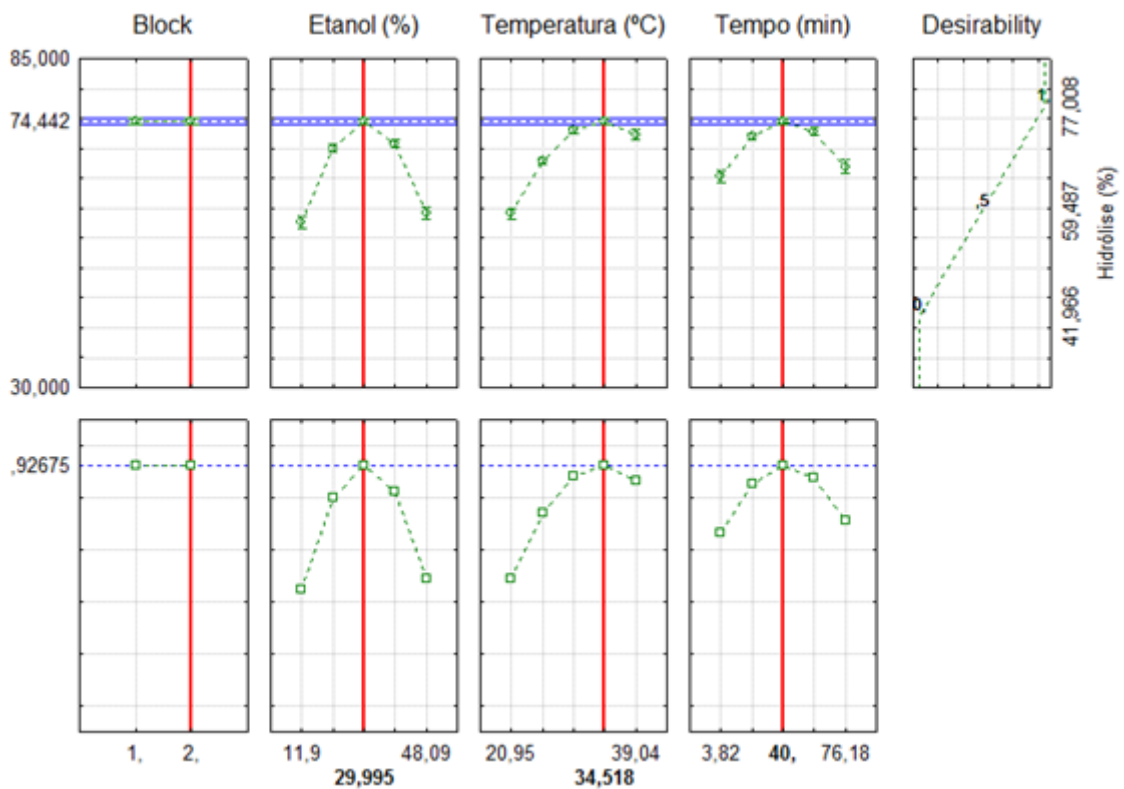
Em estudo realizado por Panesar *et al.* [13] permeabilizando células da levedura *K. marxianus*, os autores utilizaram diferentes solventes para tal finalidade e concluíram que as melhores condições de otimização do processo foram com 50% de etanol, a 25°C e tratamento térmico de 25 minutos. Com esses parâmetros conseguiram 90% de hidrólise da lactose após 150 minutos de reação. Já Morioka, Colognesi e Sugimoto [34], permeabilizaram células de *Saccharomyces fragilis* utilizando como agente permeabilizante o solvente orgânico etanol. As melhores condições estabelecidas no processo foram 35% de etanol, 25°C e 20 minutos de

tratamento. Com esse resultado os autores obtiveram atividade enzimática de 10,59U/mg. Outro estudo relatado sobre permeabilização celular foi realizado por Bachhawat, Gowda e Bhat [35] onde os pesquisadores estudaram os efeitos de células de *K. fragilis* permeabilizadas com brometo de cetiltrimetil amônio e chegaram a 90% de hidrólise da lactose em soro de leite após 120 minutos de tratamento.

4.3.1 Perfil de desejabilidade

No Perfil de Desejabilidade para etanol (Figura 3), foi possível determinar a melhor condição para o máximo valor de hidrólise da lactose a partir das células permeabilizadas. As condições otimizadas para esse planejamento foram de 30% de solvente, 35°C durante 40 minutos, obtendo resposta de 73,53% de hidrólise da lactose.

Figura 3 - Desejabilidade para a hidrólise da lactose em função da concentração de etanol, temperatura e tempo.



Três experimentos confirmatórios foram realizados para validar o ponto ótimo os quais geraram uma média de 73,53% de hidrólise, valor muito próximo do previsto para o modelo que foi de 74,44% (Tabela 4).

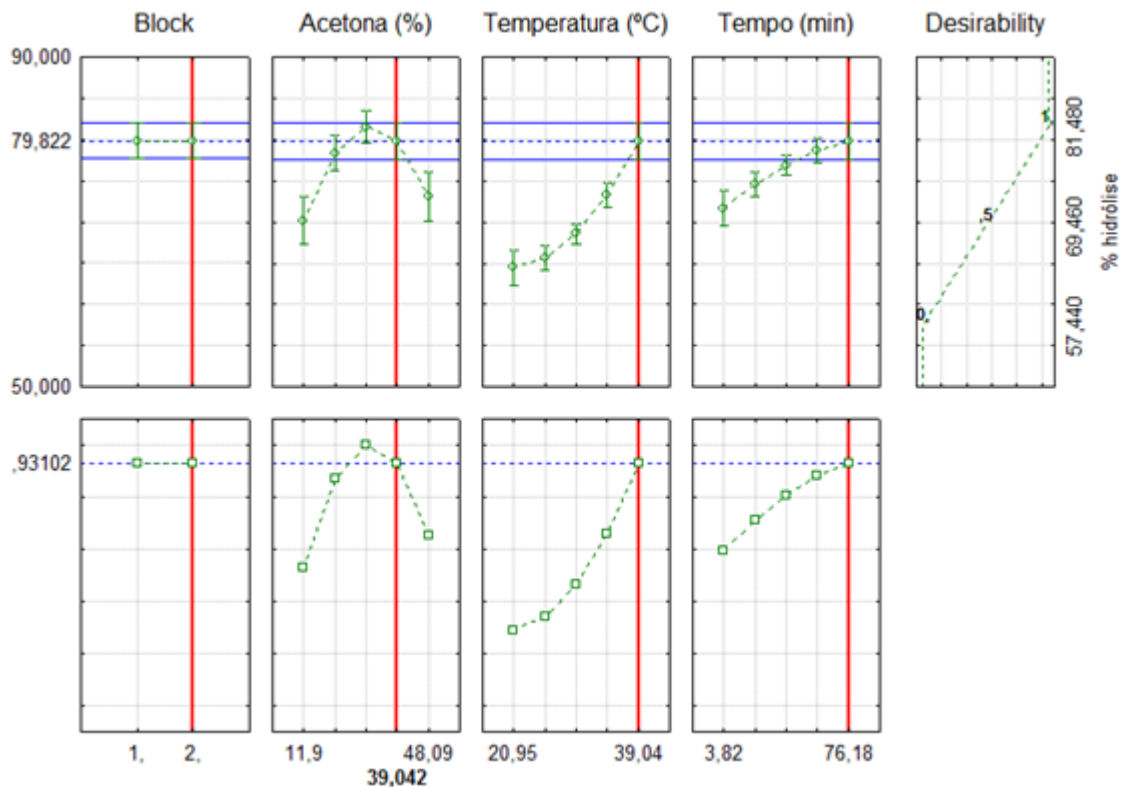
Tabela 4 – Teste t Student para validação do modelo empírico para etanol ($p > 0,05$).

	Hidrólise da lactose (%)	p-valor
Modelo empírico	74,44	
Validação	73,53*±0,71	0,333

*média dos três experimentos a um nível de significância ($p > 0,05$)

O Perfil de Desejabilidade para a acetona (Figura 4) indica como melhor condição de permeabilização 40% de solvente em temperatura de 39,05°C durante 76,18 minutos de procedimento.

Figura 4 - Desejabilidade para a hidrólise da lactose em função da concentração da acetona, temperatura e tempo.



Nessa condição o valor previsto pelo modelo foi de 79,82% de hidrólise enquanto que o observado foi 79,23% (Tabela 5). Valor esse realizado em triplicata para validação do modelo, ou seja, os valores são muito próximos e denota a adequação dos valores para a otimização das variáveis que afetam a permeabilização celular e conseqüentemente a porcentagem de hidrólise de lactose.

Tabela 5 - Teste t Student para validação do modelo empírico para acetona ($p > 0,05$).

	Hidrólise da lactose (%)	p-valor
Modelo empírico	79,82	
Validação	79,23*±0,58	0,424

*média dos três experimentos a um nível de significância de ($p > 0,05$)

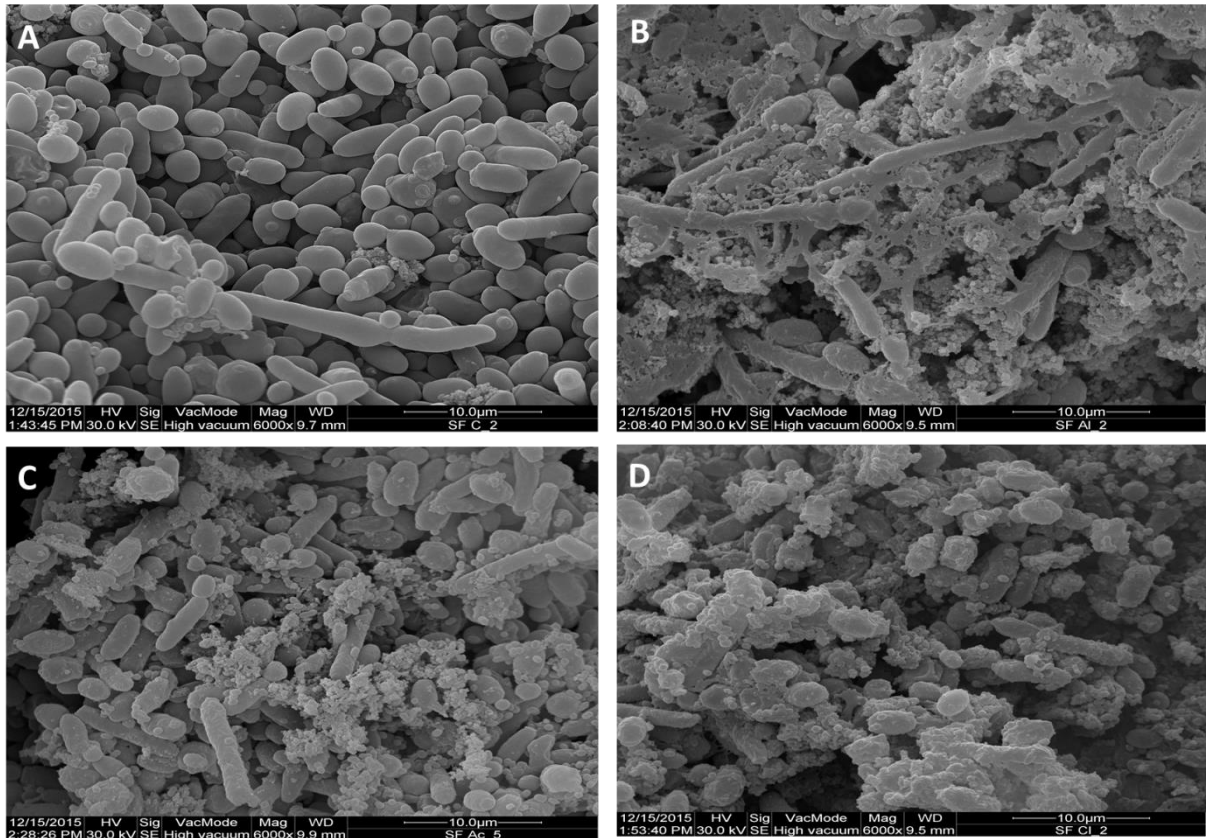
Dessa forma entende-se que os resultados apresentados nesse estudo são relevantes quanto à escolha dos solventes e as condições de permeabilização. A utilização do clorofórmio, por exemplo, leva a concentração 10 vezes menor quando comparado à acetona e, aproximadamente, um quarto do tempo para produzir resultados semelhantes. Para trabalhos futuros utilizando células permeabilizadas o solvente etanol é o mais apropriado quando comparado aos outros solventes estudados. Isso se deve ao fato de que a acetona e o clorofórmio não se apresentarem seguros para o consumo e dessa forma seria necessário o emprego de outras etapas no processo para a remoção dos solventes do produto. Diante desse contexto o etanol se apresenta como matéria prima de baixo custo quando comparado aos outros solventes, baixo impacto ambiental, fácil acesso e seguro industrialmente.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 5 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células não permeabilizadas (A), permeabilizadas com etanol (B), acetona (C) e clorofórmio (D). Foi possível observar que as células não permeabilizadas possuem superfície lisa e íntegra, enquanto que as permeabilizadas apresentam deformações e rugosidades causadas pelos solventes. A deformidade da superfície celular é devido a redução dos fosfolípídeos da membrana, o que possibilita a passagem de

solutos de baixo peso molecular para dentro e fora da célula, incluindo açúcares como a lactose e seus produtos de hidrólise [17, 19].

Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de células de *S. fragilis* IZ 275 sem permeabilização (A) e permeabilizadas com etanol (B), acetona (C) e clorofórmio (D), com aumento de 6000 vezes.



4.3.3 Estudo para o desenvolvimento de um produto para intolerantes à lactose

Com os resultados da permeabilização das células de levedura usando os solventes etanol, acetona e clorofórmio, uma nova etapa do trabalho foi proposta.

Levando em consideração que grande parte da população sofre de intolerância à lactose e buscando uma alternativa para amenizar os sintomas e desconfortos causados por essa patologia, foram realizados estudos a fim de produzir um produto para essa parte da população.

Os estudos foram conduzidos utilizando o etanol como solvente.

Nessa nova etapa a produção enzimática foi realizada conforme procedimento descrito nos artigos “Determinação da condição de cultivo de *Saccharomyces fragilis* utilizando soro de leite suplementado para a produção de β -galactosidase” e “Otimização dos parâmetros pH, temperatura e concentração de inóculo na produção de β -galactosidase utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis*”, seguindo a permeabilização celular conforme procedimento para o solvente etanol validado neste artigo.

Após o processo de produção, permeabilização e liofilização, a massa celular permeabilizada foi liofilizada e o produto resultante foi armazenado para posteriores análises. As análises foram realizadas semanalmente, em duplicata.

Uma alíquota do produto armazenado foi adicionada em leite integral durante 60 minutos para a reação de hidrólise. Em seguida a reação foi paralisada e a porcentagem de hidrólise da lactose foi determinada através da concentração de glicose determinada pelo método da glicose oxidase. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração inicial de lactose e a concentração de glicose liberadas foram utilizadas para calcular a porcentagem de hidrólise.

Após as análises dos resultados desse estudo foi possível observar que o produto obteve alta porcentagem de hidrólise da lactose. Esses resultados mostraram-se promissores para atender as necessidades dos portadores de intolerância à lactose, contudo novas análises serão realizadas para finalização do produto proposto.

4.4 CONCLUSÃO

A metodologia de permeabilização das células de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 desenvolvida neste trabalho mostrou-se promissora para fins de hidrólise da lactose. Pode-se concluir que os parâmetros de concentração de solvente, temperatura e tempo exerceram influência sobre a permeabilização que foi determinada por meio da lactose hidrolisada. A otimização do etanol foi nas condições de 30% de solvente, 35°C e 40 minutos de reação, já a acetona foi otimizada com 40% de solvente, temperatura de 39,05°C e 76,18 minutos de tratamento. Com esses parâmetros a hidrólise da lactose alcançada foi de 73,53% e 79,23%, respectivamente. Para o solvente clorofórmio optou-se por manter os

parâmetros da permeabilização do ensaio 2, sendo as condições desse experimento, 4% de clorofórmio, temperatura de 25°C e 20 minutos de reação, obtendo hidrólise da lactose de 81,03%.

4.5 REFERÊNCIAS

- [1] Mattar, R., Mazo, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 56 (2010) 230-236.
- [2] Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schoffer, J. D. N. E Ayub, M. A. Z. High stability of immobilized B-D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis, *Carbohydrate Polymer*. 95 (2013) 465-470.
- [3] Husain, Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Review Biotechnology*. 30 (2010) 41-62.
- [4] Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G. E Vicaria, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbial Technology*. 31 (2002) 300-309.
- [5] Martins, A. R. E Burkert, C. A. V. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos, *Brazilian Journal Food Technology*, 12 (2009) 230- 240.
- [6] Kaur, G., Panesar, P. S., Bera, M. B., Kumar, H. Hydrolysis of whey lactose using CTABpermeabilized yeast cells, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (2009) 63-67.
- [7] Mahoney, R. R. *Lactose: enzymatic modification*. In *Advanced Dairy Chemistry*, 2nd ed., Chapman & Hall, London, (1997), p.77–125.
- [8] Grosová, Z., Rosenberg, M., Rebros, M. Perspectives and applications of immobilized β - galactosidase in food industry – A Review, *Czech. Journal Food Sciences*. 26 (2008) 1-14.

- [9] Mariotti, M. P., Yamanaka, H., Araujo, A. R. E Trevisan, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized-Galactosidase, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51 (2008) 1233-1240.
- [10] Panesar, P. S., Kumari, S. E Panesar, R. Review Article: Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries, *Enzyme Research*. (2010) 1-16.
- [11] Fai, A. E. C., Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Kawaguti, H. Y., Thomazelli, I., Pastore, G. M. Synthesis of galactooligosaccharides from lactose by β -galactosidase immobilized on glutaraldehydetreated chitosan. In: Campana Filho, S. C., Beppu, M. M., Fiamingo, A. (Editores.). *Advances in Chitin Science XIV* (1a ed), editora IQSC, São Carlos. 2014.
- [12] Petrova, V. Y.; Kujumdzieva, A. V. Thermotolerant yeast strains producers of galactooligosaccharides, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2010) 1612-1619.
- [13] Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Bera, M. B. Permeabilization of yeast cells with organic solvents for β -galactosidase activity, *Research Journal of Microbiology*. 2 (2007) 34-41.
- [14] Santiago, P. A., Marquez, L. D. S., Cardoso, V. L., Ribeiro, E. J. Estudo da produção de β - galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24 (2004) 567-572.
- [15] Pessoa Junior, A., Kilikian, B. V., *Purificação de produtos biotecnológicos*. Manole, Barueri, São Paulo, (2005), p. 440.
- [16] Coelho, M. A. Z., Salgado, A. M., Ribeiro, B. D. *Tecnologia enzimática*, Editora EPUB, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- [17] Becker, J. M.; Caldwell, G. A.; Zachgo, E. A. Exercise 15 - Determination of β -

Galactosidase in Permeabilized Yeast Cells. In: Becker, J M.; Caldwell, G. A.; Zachgo, E. A. *Biotechnology: a technology course*. 2. ed. Academic Press, 1996. p. 131-134.

[18] Panesar, P. S. Application of response surface methodology for maximal lactose hydrolysis in whole milk using permeabilized yeast cells, *Acta Alimentaria*. 37 (2008) 191- 203.

[19] Siso, M. I. G., Cerdan, E., Freire, M. A., Ramil, E., Belmonte, E. R., Torres, A. M. R. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for Milk whey saccharification: a comprison of different treatments, *Biotechnology and Technology*. 6 (1992) 289-292.

[20] Naglak, T. J., Bettewar, D. J., Wang, H. Y., Chemical permeabilization of cells for intracellular product release, in: J.A. Assenjo (Ed.), *Separation Processes in Biotechnology*, Marcel Dekker, 1990, pp. 177–196.

[21] Somkuti, G. A., Dominiecki, M. E., Steinberg, D. H., Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *Bulgaricus* with ethanol, *Current Microbiology*. 36 (1998) 202–206.

[22] Kondo, A., Liu, Y., Furuta, M., Fujita, Y., Matsumoto, T., Fukuda, H. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol, *Enzyme and Microbial Technology*. 27 (2000) 806-811.

[23] Choi, K. O., Song, S. H., Yoo, Y. J. Permeabilization of *Ochrobactrum anthropi* SY 509 cells with organic solvents for whole cell biocatalyst, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 9 (2004) 147-150.

[24] Lee, Y. J., Kim, C. S., Oh, D. K. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 (2004) 787-793.

- [25] Kubal, B. S., D'Souza, S. F. Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg White using glutaraldehyde, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 59 (2004) 61-64.
- [26] Stano, J., Tokhtaeva, E., Micieta, K., Fulmekova, M., Varadinova, M., Foltan, V., Uricek, M. Melibiase in immobilized cells of watermelon, *Chemistry of Natural Compounds*. 41 (2005) 65-68.
- [27] Genari, A. N., Passos, F. V., Passos, F. M. L. Configuration of a Bioreactor for Milk Lactase Hydrolysis. *Journal of Dairy Science*. 86 (2003) 2783-2789.
- [28] Declaire, M., De-Cat, W., Van-Huynh, N. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ β -galactosidase activity, *Enzyme Microbial Technology*. 9 (1987) 300–302.
- [29] Champluvier, B., Kamp, B., Rouxhert, P. Preparation and Properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp*, *Enzyme and Microbial Technology*. 10 (1988) 611-617.
- [30] Jordão, R. B., Brando, I. V., Passos, F. M. L. Stabilization of the activity of β -galactosidase in permeabilized cells for hydrolysis of lactose in milk, *Journal of Food Biochemistry*. 25 (2001) 257-266.
- [31] Flores M.V., Voget C.E., Ertola R.J.J., Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents, *Enzyme Microbiology Technology*. 16 (1994) 340–346.
- [32] Nor, Z. M., Tamer, M. I., Mehrvar, M., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Jervis, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*, *Biotechnology Letters*. 23 (2001) 845-849.
- [33] Statsoft 2007 Statistic (data analysis software system), version 7.0 Tulsa Statsoft Inc Available from: www.satsoft.com.

[34] Morioka, L. R. I., Colognesi, G. O., Suguimoto, H. H. Permeabilization of *Saccharomyces fragilis* IZ 275 cells with ethanol to obtain a biocatalyst with lactose hydrolysis capacity, *Acta Scientiarum. Biological Science*. 38 (2016) 149-155.

[35] Bachhawat, N., Gowda, L. R., Bhat, S. G. Single step method of preparation of detergent permeabilized *Kluyveromyces fragilis* for lactose hydrolysis, *Process Biochemistry*. 31 (1996) 21–25.

CONCLUSÃO GERAL

No estudo da produção da enzima β -galactosidase utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis* IZ 275 em soro de leite suplementado, foi possível determinar as melhores condições de otimização para a obtenção da máxima atividade enzimática. Utilizando concentrações de 14 g/L de sacarose, 17,7 g/L de soro de leite, 5,14 g/L de extrato de levedura, 8,85 g/L de peptona, 10 g/L de lactose e glicose, 7 g/L de $MgSO_4$ e 5 g/L de K_2HPO_4 e condições de fermentação de 30°C, pH 6,8, 10% de inóculo, 180 rpm e 72 horas de fermentação a máxima atividade enzimática obtida foi de 54,20 U/mL. Portanto o meio de fermentação proposto apresentou-se como uma fonte alternativa viável para a produção da enzima lactase, apresentando valor de atividade enzimática desejável.

No estudo em que os parâmetros pH, temperatura e concentração do inóculo foram otimizados, a máxima atividade enzimática alcançada foi de 59,85 U/mL. Essa atividade foi obtida quando o meio de fermentação já otimizado anteriormente foi submetido a um pH de 6,2, temperatura de 33°C e adição de 20% de inóculo. Pode-se verificar que a atividade enzimática foi aumentada com a alteração desses parâmetros.

Já o estudo da permeabilização celular utilizando diferentes solventes orgânicos a fim de otimizar os parâmetros concentração de solvente, temperatura e tempo foi realizado em busca da máxima hidrólise da lactose em leite integral. Os solventes utilizados foram etanol, acetona e clorofórmio. Para o primeiro as melhores condições de otimização foram de 30% de solvente, 35°C e 40 minutos de reação para 73,53% de hidrólise da lactose. Para o segundo as condições otimizadas foram de 40% de solvente, 39,05°C e 79,18 minutos de permeabilização para alcançar uma hidrólise da lactose de 79,23%, e para o terceiro solvente otimizado as condições foram de 4%, temperatura de 25°C e 20 minutos de tratamento para uma hidrólise de 81,03%. As respostas obtidas neste trabalho foram consideradas satisfatórias pelos autores, contudo para trabalhos futuros o solvente de escolha será o etanol, em função da sua facilidade de obtenção, menor custo, ser seguro para ingestão em alimentos e seguro industrialmente quando comparado aos outros solventes estudados.