

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

GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA

**AVALIAR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA  $\beta$ -GALACTOSIDASE  
PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus* A PARTIR DO PERMEADO DE  
SORO DE LEITE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO  
2019

GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA

**AVALIAR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA  $\beta$ -GALACTOSIDASE  
PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus* A PARTIR DO PERMEADO DE  
SORO DE LEITE**

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

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

TOLEDO

2019

## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus* A PARTIR DO PERMEADO DE SORO DE LEITE

Por

**GABRIELA NASCIMENTO FERREIRA**

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 29 de novembro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. *O(A) candidato(a) foi arguido(a)* pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

---

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

---

Prof. Dra. Debora Jacomini (Membro – *Universidade Estadual do Oeste do Paraná*)

---

Prof. M.e. Renam Luis Acorsi (Membro – *Universidade Tecnológica Federal do Paraná*)

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, que sempre me deu apoio e incentivo sempre. Pai e Mãe, muito obrigada por acreditarem em mim, às vezes até mais do que eu mesma, vocês são responsáveis pelo ser humano que me tornei, amo vocês.

Agradeço às minhas amigas, em especial Maíra e Emilly, por me apoiarem e me ouvirem sempre que precisei. Obrigada por caminharem do meu lado, amo vocês.

Agradeço à toda comunidade acadêmica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, principalmente aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por toda contribuição durante minha formação.

Obrigada à Profa. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva, pela orientação, carinho e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos que de alguma forma auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

O permeado de soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios com alta carga de DBO e DQO, é obtido através da concentração do soro de queijo, a sua composição é basicamente água e lactose, tornando-o um meio interessante para microrganismo capazes de fermentar a lactose, como a *Kluyveromyces marxianus* que converte esse dissacarídeo em galactose e glicose devido à atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase. Essa levedura produz a enzima de forma intracelular, logo são necessários métodos de extração para obtenção da enzima. O objetivo do estudo foi extrair a  $\beta$ -galactosidase, produzida por *K. marxianus* em permeado de soro de leite, por diferentes métodos de rompimento celular. Os métodos realizados foram extração por abrasão com perolas de vidro, com ruptor ultrassônico, choque térmico, por agentes químicos como SDS e Triton X-100. Os resultados obtidos mostraram que os métodos utilizados atingiram bons rendimentos, sendo o choque térmico com o melhor resultado, um rendimento de 203 %, com valores de atividade enzimática de 19,1 U<sub>ONPG</sub> /gcel.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -galactosidase, Choque térmico, Pérolas de vidro, Ruptor ultrassônico, Permeado de soro de leite.

## ABSTRACT

Whey permeate is a byproduct of the BOD and COD high-load dairy industry. It is obtained by concentrating cheese whey, its composition is basically water and lactose, which makes it an interesting medium for microorganisms capable of ferment this molecule, such as *Kluyveromyces marxianus* which converts lactose to galactose and glucose due to the enzymatic activity of  $\beta$ -galactosidase. This yeast produces the enzyme intracellularly, so extraction methods are required to obtain the enzyme. The aim of the study was to extract  $\beta$ -galactosidase, produced by *k. marxianus* in whey permeate by different cell disruption methods. The methods performed were abrasion with glass beads, ultrasonic rupture, thermal shock, and chemical agents such as SDS and Triton X-100. The results showed that the methods used achieved good yields, being the thermal shock the one with best result, a yield of 203%, with enzymatic activity values of 19.1 U<sub>ONPG</sub> /gcel.

**Key-word:**  $\beta$ -galactosidase, Extraction, Thermal Shock, Glass Pearls, Ultrasonic Ruptor, whey permeate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estrutura da $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	12
<b>Figura 2-</b> Estrutura da molécula de lactose.....	12
<b>Figura 3-</b> Estrutura do substrato ONPG (a) e hidrólise do ONPG em unidade de galactose e o-NP. ....	15
<b>Figura 4-</b> Foto da levedura <i>K. marxianus</i> em microscopia eletrônica de varredura (MEV), ampliada 5000 X. ....	17
<b>Figura 5-</b> Representação do metabolismo da lactose em leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i> .....	18
<b>Figura 6-</b> Fluxograma de obtenção do permeado de soro de leite.....	20
<b>Figura 7-</b> Mecanismo de ruptura celular pelo método ultrassônico (A) e pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (B). ....	25
<b>Figura 8-</b> Permeado de soro de leite.....	26
<b>Figura 9-</b> <i>Kluyveromyces marxianus</i> mantido em meio Malt Extract Ágar Base.....	27
<b>Figura 10-</b> Propagação em meio YPD. ....	28
<b>Figura 11-</b> Concentração celular de <i>K. marxianus</i> ATCC 36907. ....	29
<b>Figura 12-</b> Fermentação submersa em incubadora de agitação e temperatura controlada. ....	30
<b>Figura 13-</b> Extração com pérolas de vidro agitadas em vórtex. ....	31
<b>Figura 14-</b> Extração em sonificador de ponteira ultrassônica. ....	32
<b>Figura 15-</b> Atividade enzimática específica de $\beta$ -galactosidase por diferentes métodos de extração. ....	38
<b>Figura 16-</b> Extração da cepa bacteriana da $\beta$ -galactosidase <i>Arthrobacter oxydans</i> utilizando diferentes métodos químicos, considerando a sonicação como controle. ....	42
<b>Figura 17-</b> Viscosidade dos sobrenadantes utilizados para determinação da atividade enzimática. A) Choque térmico. B) Sonificador. C) Abrasão com perolas de vidro. D) Triton-X. E) SDS.....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1 OBJETIVOS	10
1.1.1 OBJETIVO GERAL	10
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
2.1 ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE	11
2.2 LEVEDURAS	15
2.3 PERMEADO DE SORO DE LEITE	19
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE	22
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>26</b>
3.1 SUBSTRATO	26
3.1.2 MICRORGANISMO	27
3.2 CURVA DE CONCENTRAÇÃO CELULAR	28
3.3 PRODUÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE	30
3.4 EXTRAÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE	31
3.4.1 EXTRAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE POR ABRASÃO COM PEROLAS DE VIDRO	31
3.4.2 EXTRAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE COM RUPTOR ULTRASSÔNICO	32
3.4.3 CHOQUE TÉRMICO PARA EXTRAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE	33
3.4.4 MÉTODO DO SDS PARA EXTRAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE	33
3.4.5 MÉTODO TRITON PARA EXTRAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
4.1 PRODUÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE	36
4.2 EXTRAÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE	38
4.2.1 EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE POR ABRASÃO COM PEROLAS DE VIDRO	38
4.2.2 EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE COM RUPTOR ULTRASSÔNICO	39
4.2.3 EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE COM CHOQUE TÉRMICO	40
4.2.4 EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE COM SDS	41
4.2.5 EXTRAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE COM TRITON X-100	42
4.3 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS	44
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>46</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>60</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos para a geração de produtos de interesse comercial, como as enzimas microbianas tem recebido crescente atenção por parte da indústria de alimentos. Neste contexto, encontra-se a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por microrganismos, que pode ser empregada na hidrólise da lactose do leite, visando obter um produto com baixo teor de lactose, ideal para consumidores intolerantes a este açúcar (JURADO *et al.*, 2002).

Cerca de 70% da população mundial sofre com a intolerância a lactose, é um problema de digestibilidade da lactose devido à deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase, que hidrolisa o açúcar do leite, e normalmente está presente e ativa na porção inicial do intestino (ENATTAH *et al.*, 2002; HEYMAN *et al.*, 2006). Devido a isso essa enzima é usada na elaboração e desenvolvimento de produtos destinados a população com intolerância a lactose.

A  $\beta$ -galactosidase também conhecida como lactase, é uma enzima classificada como hidrolase, utilizada industrialmente para converter a lactose em glicose e galactose. As lactases mais importantes em termos de interesse tecnológico, produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, são intracelulares (SZCZODRAK, 2000).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* pode ser empregada na produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, com a vantagem de ser reconhecida como segura para a produção de alimentos e fármacos (ALVES, 2008). Além de apresentar características importantes do ponto de vista industrial, como crescimento em uma ampla faixa de temperatura, necessidade reduzida de controles de contaminação no cultivo comercial, atividade enzimática superior quando comparada a outras leveduras, crescimento rápido em uma ampla variedade de fontes de carbono (PECOTA *et al.*, 2007; MANERA, 2008).

Para produção de  $\beta$ -galactosidase é essencial que o substrato contenha lactose, como é o caso do permeado de soro de leite, efluente do setor de laticínios. A reutilização de subprodutos da agroindústria é uma alternativa ambientalmente amigável, pois pode reduzir a poluição ambiental, além de baratear o processo. Desta forma este trabalho visou o estudo de métodos de extração da enzima  $\beta$ -

galactosidase produzida intracelularmente pela levedura *Kluyveromyces marxianus* a partir de permeado de soro de leite.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes métodos de extração da enzima  $\beta$ -galactosidase do meio de cultivo (permeado de soro de leite) pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a fermentação do permeado de soro de leite empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* para produzir  $\beta$ -galactosidase, de acordo com Rachow (2019).
- Avaliar e verificar os diferentes métodos de extração da enzima produzida.
- Determinar a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida durante a fermentação e após a aplicação dos diferentes métodos de extração.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enzima $\beta$ -galactosidase

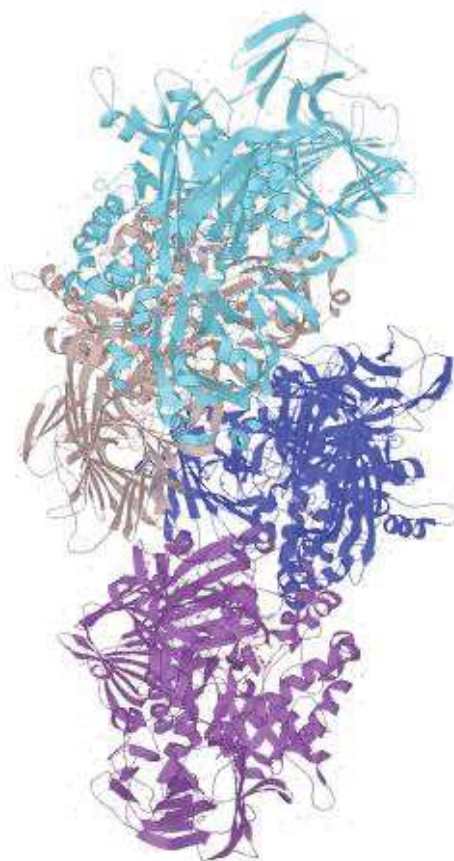
As enzimas são proteínas que agem como catalisadores em reações bioquímicas ao diminuir a energia de ativação, formadas dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos e bactérias. Controlam várias funções vitais incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerar a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficiente (LEHNINGER, 1997).

A biotecnologia da produção de enzimas pode partir de fontes naturais, formada por tecidos animais e vegetais ou de fontes cultivadas, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas. A utilização de microrganismos para a geração de produtos de interesse comercial tem recebido crescente atenção por parte da indústria de alimentos, pois possui menor custo em sua produção e a possibilidade de produção em larga escala (SILVA; FRANCO, 1999).

A  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohidrolase, E.C 3.2.1.23), no qual o 3 significa que é uma hidrolase, o 2 glicosidases, e o 1 que hidrolisa ligações  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 1), é uma enzima que foi primeiramente descrita por Beijerinck em 1889 em células de *Saccharomyces kefir* e *Saccharomyces tyrocola*. Essa enzima é classificada como uma glicosil hidrolase, que são ativas em carboidratos, com capacidade de converter a lactose, em seus monossacarídeos glicose e galactose (SANTIAGO, 2004).

A enzima pode ser encontrada em vegetais, particularmente em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs, em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos e placenta, normalmente em baixas quantidades. Também é produzida por vários microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (RICHMOND *et al.*, 1981).

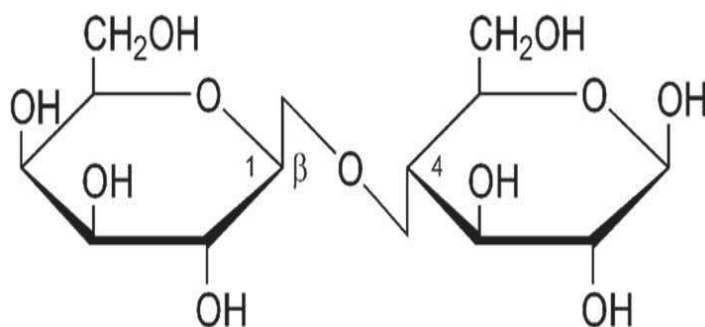
**Figura 1-** Estrutura da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.



Fonte: CAZy (2019).

A lactose tem fórmula molecular  $C_{22}H_{34}O_{11}$ , é um dissacarídeo formado por  $\alpha$ -D-glicose e  $\beta$ -D-galactose unidos por uma ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica (CAMPBELL, 2000), conforme a Figura 2.

**Figura 2-** Estrutura da molécula de lactose.



Fonte: MENA, (2015).

Aproximadamente 65 % da população mundial tem deficiência primária de lactase, devido à deficiência da enzima lactase-florizin hidrolase (homóloga a  $\beta$ -galactosidase) que hidrolisa o açúcar do leite, e normalmente está presente e ativa na porção inicial do intestino, denominada jejuno. A necessidade de baixa lactose no leite é importante, pois evita a desidratação tecidual grave, diarreia e até mesmo a morte em crianças e adultos intolerantes. (HEYMAN *et al.*, 2006; BANSAL *et al.*, 2008).

Na indústria alimentícia, produtos como leite, queijo, sorvete e iogurte são submetidos aos processos de redução do teor de lactose para permitir seu consumo por pessoas portadoras de intolerância. Esses processos podem ser realizados por hidrólise ácida, contudo a desnaturação das proteínas, a formação de bioprodutos indesejáveis, a necessidade de etapas adicionais de desmineralização e descoloração, e o alto custo fazem a substituição deste método pelo enzimático. Neste processo, a enzima solúvel ou imobilizada é utilizada para hidrolisar a lactose, sem que haja necessidade de etapas adicionais ao processo e com possibilidade de reutilização do reator no caso das enzimas imobilizadas (GEKAS, LOPEZ-LEIVA, 1985).

As  $\beta$ -galactosidases produzidas por leveduras são as mais utilizadas no tratamento de produtos lácteos de leite, soro doce e pH neutro entre 6,5 e 7. A atividade e estabilidade das enzimas são influenciadas pelas condições de cultivo do processo fermentativo e composição do meio de crescimento (FURLAN *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2005).

Quando consumido pelos seres humanos, a lactose também necessita ser hidrolisada. Esse processo ocorre na mucosa intestinal pela ação da  $\beta$ -galactosidase, uma enzima que quebra a molécula de lactose em glicose e galactose, essa enzima está localizada na superfície do intestino delgado. Após a hidrólise, os enterócitos da membrana celular do intestino absorvem os monossacarídeos, de modo que a atividade enzimática e o tempo de passagem pela mucosa intestinal são importantes para a absorção adequada (SWAGERTY JR *et al.*, 2002; PERINI, 2013).

As principais  $\beta$ -galactosidases comerciais são produzidas a partir de leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, sendo o restante da bactéria *E. coli*, porém enzimas produzidas por leveduras são as mais utilizadas

para o tratamento do leite e produtos lácteos, devido seu crescimento em faixa neutra de pH (DAGBAGLI, GOKSUNGUR, 2008).

Para a obtenção da  $\beta$ -galactosidase pode-se empregar também processos fermentativos utilizando microrganismos como *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus* que vem sendo estudados quanto ao potencial industrial (GEKAS, LOPEZ-LEIVA, 1985).  $\beta$ -galactosidases provenientes de fungos filamentosos e leveduras apresentam pH e temperaturas ótimos entre 3,0 – 5,0 e 50 – 55 °C; 6,0 – 7,0 e abaixo de 40 °C, respectivamente (HOLSINGER, KLIGERMAN, 1991; ROBINSON, 1991).

Para otimizar o processo e reduzir custos, são utilizados microrganismos que sejam capazes de fermentar um substrato com baixo valor agregado, como os resíduos de laticínios. Assim, tem-se a levedura *K. marxianus*, que é capaz de utilizar a lactose como fonte de crescimento, produzindo a  $\beta$ -galactosidase.

A fermentação necessita de um substrato como fonte de carbono e nutrientes, como o permeado de soro de leite, na qual a lactose atua como fonte de carbono. É necessário suplementar o meio para que as necessidades nutricionais da levedura sejam atendidas. Estudos relatam que o uso de extrato de levedura maximiza o rendimento em biomassa de *K. marxianus*, enquanto o uso de ureia não é significativo (MARTINS, 2005).

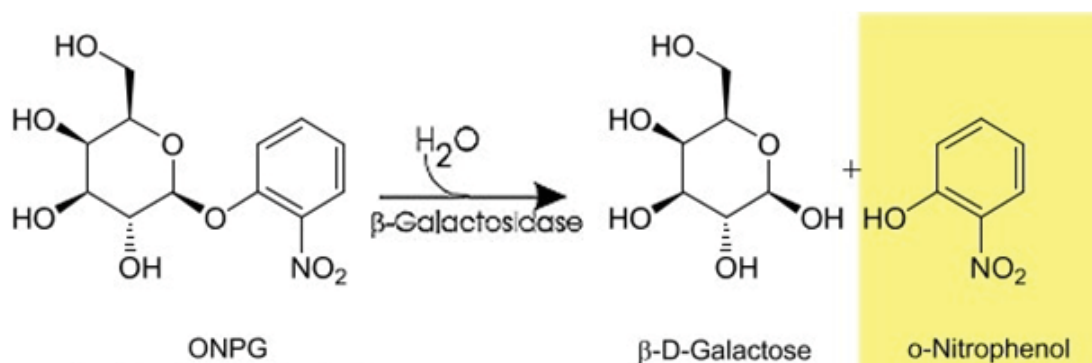
Manera *et al.*, (2008) otimizaram o meio de cultivo para a produção de  $\beta$ -galactosidase utilizando *Kluyveromyces marxianus*. Os autores variaram a concentração de lactose, sulfato de amônio e extrato de levedura, verificaram a influência do pH e mantiveram fixa a concentração de sulfato de magnésio heptahidratado (0,4 g/L) e de fosfato monopotássico (5 g/L). O melhor resultado de atividade enzimática obtida foi de 10,7 U/mL. As variáveis testadas foram todas significativas, e a melhor condição obtida foi com 55 g/L de lactose, 20 g/L de extrato de levedura e 7 g/L de sulfato de amônio, em pH 7.

Quando a enzima  $\beta$ -galactosidase é obtida de células de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, ela é intracelular, e seu peso varia de entre 90 e 201 kDa (Dalton). Devido a isso há a necessidade do rompimento celular ou a permeabilização da membrana da célula sem causar a desnaturação da enzima (RECH et al, 1999).

A determinação da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase pode ser realizada através de um teste colorimétrico, a partir da reação de hidrólise da enzima com o substrato o-nitrofenil- $\beta$ -Dgalactopiranosídeo (ONPG), que é um líquido incolor

e após a reação de hidrólise produz galactose (incolor) e o o-nitrofenol (O-NP) que apresenta coloração amarela (NICHELE et al., 2011). A Figura 3 demonstra a reação de hidrólise do ONPG pela enzima  $\beta$ -galactosidase.

**Figura 3-** Estrutura do substrato ONPG (a) e hidrólise do ONPG em unidade de galactose e o-np.



Fonte: Adaptado de NICHELE et al., (2011).

## 2.2 Leveduras

As leveduras são microrganismos eucariontes, sapróbios ou parasitas, dependentes do carbono orgânico como fonte de energia, fungos unicelulares não filamentosos esféricos ou ovais (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). As leveduras se apresentam como organismos unicelulares durante a fase vegetativa e na fase sexuada ocorre a esporulação e conjugação. Segundo Castrilho-Valavicius et al.1992, as leveduras se mantêm no ciclo vegetativo até que condições de estresse se estabeleçam, o que as leva a iniciarem um ciclo de vida meiótico.

As leveduras são organismos de grande interesse industrial por possuírem capacidade de se desenvolver em substratos baratos e de fácil acesso, possuem facilidade de multiplicação e formam produtos tanto intracelulares quanto extracelulares (BOTHÁ, 2011).

Algumas leveduras como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus* são consideradas *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Reconhecida como segura) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e no caso da *K. marxianus* também *Qualified presumption of safety* (QPS) (Presunção qualificada de segurança) na União Europeia (VAN DER BERG, et al., 1990; SANTIAGO, 2004), o



que possibilita seu uso em diferentes áreas, indústria fermentativa, farmacêutica, química, além das pesquisas em biologia celular, bioquímica, genética e biologia molecular, pesquisas biomédicas, e tecnologia ambiental (HENSING *et al.*, 1995; BELEM, LEE, 1998).

O gênero *Kluyveromyces* é composto por leveduras homotáticas diploides com alto polimorfismo intraespecífico. Pode ser encontrado em grãos de kefir, leite cru, e em uma grande variedade de queijos (Roquefort, Camembert, Cheddar, mussarela de búfala, Gruyère e Beaufort) (MARTINS, 2004).

As *Kluyveromyces* produzem lactases ideais para aplicações no tratamento de leite, pois as enzimas produzidas estão adaptadas a uma faixa de pH próximo do neutro, ideal para hidrólise da lactose. Além de atuarem em ampla faixa de temperaturas, pode ser cultivada em temperatura de até 52 °C reduzindo a necessidade de controles de contaminação no cultivo comercial. Pois a maioria dos organismos encontrados em um ambiente industrial não pode crescer nesta temperatura (PECOTA *et al.*, 2007; MANERA *et al.*, 2008; DINIZ *et al.*, 2014; AL-JAZAIRI *et al.*, 2015).

A enzima produzida é intracelular, e desta forma, a lactose é transportada para o interior da célula por uma permease onde é hidrolisada. Por isso, a obtenção desta enzima requer uma etapa adicional de lise celular para purificação da enzima (OLIVEIRA, GUIMARÃES, DOMINGUES, 2011). Segundo Manera (2007) a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* é mais alta quando comparadas a outras leveduras, com uma atividade maior que 2,8 U/ml enquanto *Kluyveromyces fragilis* obteve uma atividade de no máximo 1,5 U/ml.

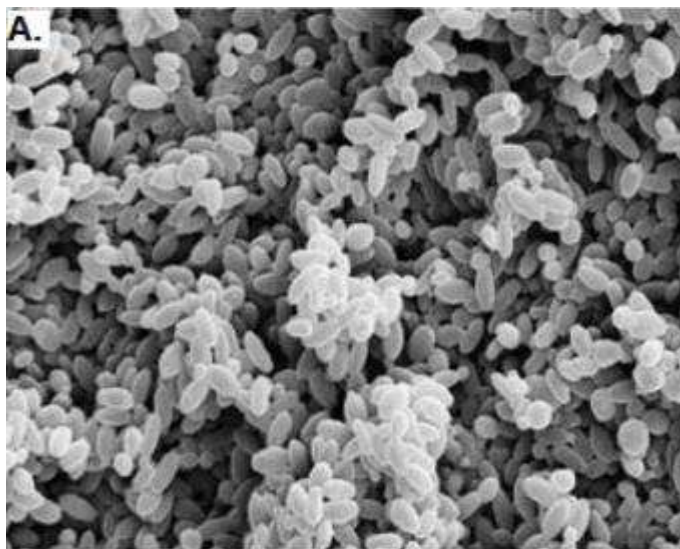
A *Kluyveromyces marxianus* (Figura 4) é um fungo não patogênico e com grande potencial industrial, devido sua capacidade de ser cultivado em elevadas temperatura e uma grande faixa de pH, curto tempo de geração em glicose, alta taxa de crescimento, além de utilizar grande variedade de açúcares como fonte de carbono, como a lactose, é capaz de hidrolisa-la nos monossacarídeos glicose e galactose as tornando metabolizáveis. É capaz de assimilar inulina, mas é a única espécie do gênero que não assimila ou fermenta D-glicosídeos como a maltose (BELLOCH *et al.*, 2002).

Diversas aplicações biotecnológicas têm sido investigadas com esta levedura, como a produção de enzimas, de proteínas para alimentação animal e humano, de



compostos aromáticos como fenil-etanol e de biocombustíveis como o etanol (FONSECA *et al.*, 2008).

**Figura 4-** Foto da levedura *K. marxianus* em microscopia eletrônica de varredura (MEV), ampliada 5000 X.



Fonte: TAVARES, (2017).

É classificada como fermentativa facultativa, do tipo *Crabtree* negativa. O metabolismo *Crabtree* é caracterizado quando na presença de excesso de substrato, mesmo em ambientes aeróbios, as enzimas do metabolismo respiratório são inibidas, devido ao excesso transitório de piruvato e este é transferido para a fermentação alcoólica. (ZOPPELLARI; BARDI, 2013).

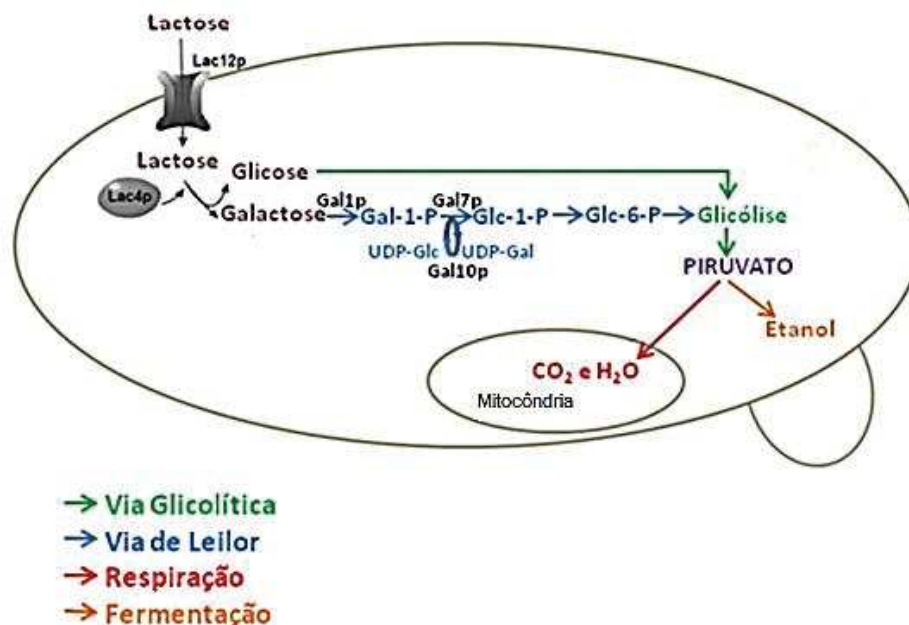
Na levedura, a lactose é transportada pela permease do meio extracelular para o intracelular. Ela é uma proteína de membrana facilitadora do tipo simporte, pois utiliza o gradiente de prótons em direção à célula para transportar os  $\beta$ -galactosídeos (SEIBOTH *et al.*, 2007; SYRIOPOULOS *et al.*, 2008).

Em seguida, a  $\beta$ -galactosidase hidrolisa a lactose em glicose. Esta segue para a via glicolítica, enquanto a galactose é metabolizada à glicose-1-fosfato pela via de Leloir, para posteriormente ser convertida em glicose-6-fosfato que entra na via glicolítica (SEIBOTH *et al.*, 2007; SYRIOPOULOS *et al.*, 2008).

Ao fim da glicólise, tem-se o piruvato, que dependendo das condições de cultivo, pode seguir pelo ciclo do ácido cítrico, que é totalmente oxidado a  $\text{CO}_2$  para produção de ATP, ou entrar na via fermentativa, no qual é reduzido a etanol (BAI *et al.*, 2008; PFEIFFER, MORLEY, 2014).

A representação do metabolismo de lactose em leveduras do gênero *Kluyveromyces* é apresentado na Figura 5.

**Figura 5-** Representação do metabolismo da lactose em leveduras do gênero *Kluyveromyces*.



Sendo que, Gal1p: galactoquinase; Gal7p: uridiltransferase; UDP: glicose com difosfato de uridina.

Fonte: DINIZ et al., (2015).

O *operon lac*, que é promovido pelo gene *lacP* e regulado pelo *lacO*, que são transcritos até serem reprimidos por uma proteína do gene *lacI*. Ele é constituído por três genes estruturais: *lacZ*, que codifica a  $\beta$ -galactosidase, o *lacY*, que controla a entrada da lactose na célula e o *lacA*, responsável pela produção da  $\beta$ -galactosídeo transacetilase, que transfere o grupo acetil do acetil-CoA para os  $\beta$ -galactosídeos (RECH, 1998).

A *K. marxianus* é um dos microrganismos mais utilizados para hidrólise da lactose do soro de queijo, e conseqüente para produção de  $\beta$ -galactosidase. Simultaneamente a produção da enzima, o microrganismo também produz etanol, que constitui uma fonte de energia. De acordo com informações obtidas no laudo técnico da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 (2016), obtido da Fundação André Tosello, Campinas – SP, a temperatura ótima para cultivo da cepa é 40 °C, em atmosfera tipicamente aeróbica. Após três dias incluídas em meio próprio a 40 °C

as células são globosas, elipsoidais, cilíndricas, que se apresentam individuais, pares ou em cadeias curtas. O crescimento é simétrico, brilhante e cremoso.

Perini (2013) produziu  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, a partir de fontes alternativas de carbono, o soro de queijo, e milhocina como fonte de nitrogênio, avaliando o efeito da temperatura (25 a 45 °C), a agitação a 200 rpm e da aeração sobre a produção da enzima. Obtendo os valores de atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase de 9,8 U/mL.

### 2.3 Permeado de soro de leite

A crescente produção de queijo no Brasil e no mundo é de cerca de 2,6 milhões de toneladas por ano, com um aumento estimado de 3% ao ano, é responsável pelo grande volume de soro de leite, estima-se que para a fabricação de 1 kg de queijo são necessários em média 10 litros de leite, levando a produção de 8 a 9 litros de soro, e com isso mais de 160 milhões de toneladas de soro produzidas no mundo anualmente (FAOSTAT, 2017).

Sua demanda biológica de oxigênio (DBO) varia de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro, valor 100 vezes maior ao do esgoto doméstico. Um produto secundário de alto valor nutritivo agregado, e que se descartado de forma incorreta no meio ambiente se torna um grande poluidor (REBOUILLAT, ORTEGA-REQUENA, 2015).

Segundo o Regulamento técnico de qualidade de soro de leite, é definida como o líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado a fabricação de queijos, caseína ou produtos lácteos similares. Contem nutrientes importantes, como cálcio, fosforo, potássio e é rico em lactose. Atua no realce do sabor, de modo semelhante ao sal, sem integrar grandes quantidades de sódio, se tornando um fator positivo na saúde do consumidor. Além disso, a lactose se constitui em uma fonte de energia para diversos processos biotecnológicos (STOLIAR, 2009; MURARI et al., 2013).

O permeado de soro é o produto obtido a partir da obtenção da proteína concentrada de soro de leite. O soro líquido é submetido a um tratamento de ultrafiltração para remoção das proteínas solúveis do soro  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina (OLIVEIRA, MOURA, BENEDET, 2006).

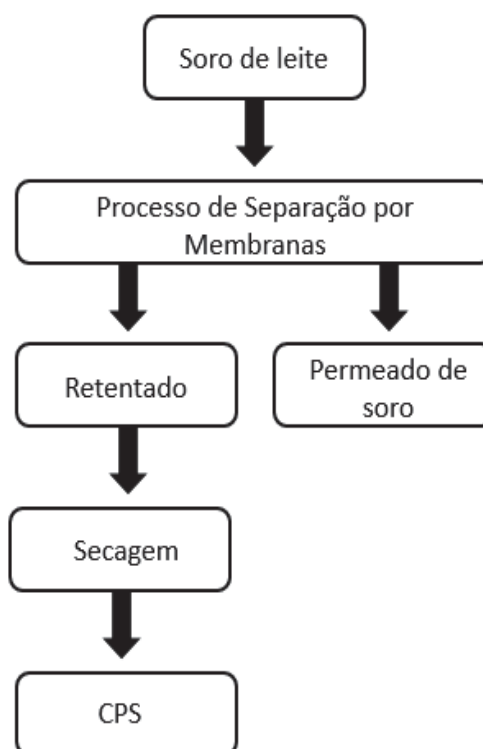
A partir do permeado de soro pode-se, ainda, produzir mistura de sais minerais do leite e isolar oligossacarídeos. Esses componentes podem ter aplicação na formulação de vários produtos lácteos e não lácteos. A utilização do permeado do soro possibilita agregar ainda mais valor ao coproduto soro de queijo da indústria de queijos (ZACARCHENCO et al., 2005).

Uma das melhores formas da utilização do permeado é sua submissão a processos de desidratação para obtenção do permeado em pó. No estado sólido os teores chegam a cerca de 85% de lactose e cerca de 15% de sais minerais (ZACARCHENCO et al., 2012).

Para a obtenção do permeado de soro de leite, o soro residual da fabricação de queijos passa por dois processos de separação, esquematizado na Figura 6 por membranas, que podem ser a nanofiltração e a ultrafiltração.

Esses processos possuem baixo consumo energético e proporcionam tratamentos eficientes na recuperação de produtos celulares ou intracelulares e na obtenção de produtos clarificados (MOREIRA, 2011).

**Figura 6-** Fluxograma de obtenção do permeado de soro de leite



Fonte: Adaptado de HEIN, (2015).

Os processos de separação por membrana consistem na filtração tangencial onde a corrente filtrante passa paralelamente a membrana, a partir desse processo é possível a obtenção da separação da fase lipoproteica do soro, com o mínimo de desnaturação de proteínas. Quando aplicado ao soro resulta em um retentado e um permeado.

No retentado ficam retidas proteínas, gordura e minerais coloidais, e que ao passar por secagem é utilizado na produção do concentrado proteico de soro. E o permeado, composto de água e pequenas moléculas de lactose, minerais solúveis, compostos nitrogenados não proteicos de baixo peso molecular e vitaminas, que não possui aplicação industrial (LAGRANGE, DALLAS, 1997; ZARCACHENCO et al., 2012).

Estudos tecnológicos envolvendo o emprego do permeado de soro de leite, baseiam-se no alto valor nutricional do produto. De acordo com Ministério da Agricultura (2013), o permeado do soro de leite em pó deve conter em torno de 80 % de lactose, proteína mínima de 1 %, sais minerais mínimo de 9 %, umidade máxima de 5 % e acidez em ácido láctico máxima de 0,35 %. Não há especificação com relação aos lipídeos, devido provavelmente, a baixa concentração no produto.

A lactose proveniente do permeado de soro de leite, é utilizada nas indústrias de alimentos para realçar cores e sabores. Além disso, ela pode ser utilizada como substrato para o crescimento de microrganismos, sobretudo leveduras, visando à produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos e enzimas (RECH, AYUB, 1998).

Diniz e colaboradores, (2014) otimizaram a produção de etanol a partir de permeado de soro empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Através da metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology – RSM*) e delineamento composto central rotacional (*Central Composite Rotational Design – CCRD*) avaliaram o efeito de 4 fatores em diferentes níveis: pH, temperatura, concentração Inicial de lactose e concentração inicial de biomassa. Na validação dos melhores ensaios encontrados obtiveram um rendimento na produção de etanol de cerca de 90 %.

Rech e Ayub (1998) analisaram a influência do pH (4,5-5,5) e temperatura (30,0-37,0 °C), durante a avaliação do aproveitamento do soro de queijo para a produção de  $\beta$ -galactosidase por *K. marxianus* CBS 6556. Os resultados mostraram que a melhor condição de produção enzimática ocorreu em pH 5,5 e temperatura

37,0 °C. Além disso, atividade igual a 700 U<sub>ONPG/g<sub>cél</sub></sub> foi encontrada em soro a 7 % e 800 U<sub>ONPG/g<sub>cél</sub></sub> em soro a 21 %, o que demonstra que a composição do meio está intimamente ligada com a produção de enzimas.

Como a  $\beta$ -galactosidase é intracelular, busca-se encontrar métodos eficiente para a extração.

## 2.4 Métodos de extração de $\beta$ -galactosidase

A separação e purificação de uma proteína de fermentações em larga escala ou o sobrenadante da ruptura de células é um elemento crítico do processo biotecnológico moderno e representa o principal custo industrial (ASENJO, 1990). A recuperação de produtos intracelulares provenientes de microrganismos, tem se tornado de grande importância principalmente devido à introdução de novas técnicas aplicadas nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, e a necessidade de produtos com alto grau de pureza.

Devido ao tamanho maior e à diferença na estrutura da parede celular, a ruptura de leveduras em geral é mais fácil que a ruptura de bactérias. Os componentes básicos da parede celular de leveduras são glucanas, mananas e proteínas. Em geral, métodos mecânicos não são específicos, mas possuem alta eficiência e ampla aplicação em comparação com outros métodos. As características do processo de ruptura podem variar com base na estabilidade mecânica do microrganismo, a qual depende da espécie, idade da cultura, taxa de crescimento específico, temperatura de cultivo e meio de cultura (GECIOVA, 2002).

Como a  $\beta$ -galactosidase é intracelular quando obtida de células de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, é necessário realizar rompimento celular ou a permeabilização da membrana da célula, sem causar desnaturação da enzima. A ruptura celular é uma importante etapa no processo de isolamento de materiais intracelulares e constitui uma etapa essencial no processo de *downstream* (separação e purificação da enzima). Possuindo considerável influência não somente na quantidade total da proteína de interesse a ser recuperada, mas também na sua atividade biológica, pois qualquer dano que ocorra nessa fase inicial pode comprometer e invalidar as etapas seguintes de purificação (RECH et al., 1999).

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas e enzimas intracelulares, dependendo de fatores como a força física da parede celular dos microrganismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse. Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos ou a combinação destes podem ser aplicados (MEDEIROS et al., 2008).

No entanto, pelo fato da  $\beta$ -galactosidase ter sua aplicação na modificação de alimentos ou em medicamentos, permanecendo no produto final, a ruptura das células de *Kluyveromyces* se conduzida por métodos químicos, necessita de uma etapa de remoção de contaminantes. Já os métodos mecânicos e físicos de ruptura celular não implicam em riscos de toxicidade, pois não incluem produtos químicos no extrato enzimático (MEDEIROS et al., 2008).

O método mais comum de autólise celular para  $\beta$ -galactosidase de leveduras é o tratamento de uma suspensão de células com agentes químicos capazes de desorganizar a membrana plasmática, como solventes orgânicos, surfactantes, policátions, proteínas básicas, ou soluções com alto poder iônico (FLORES, et al., 1994).

Banerjee et al., (2016) utilizou 4 métodos químicos de extração para  $\beta$ -galactosidase, sendo eles o método utilizando SDS, Triton X-100, Tween 20, álcool isoamílico e mistura de tolueno-acetona. Desta forma, demonstrou que a utilização de Tween 20 foi o método químico mais eficaz para extração de  $\beta$ -galactosidase da cepa bacteriana *Arthrobacter Oxydans*, seguido por mistura de tolueno-acetona e álcool isoamílico, respectivamente. Bury, Jelen e Kalab (2001), afirmaram que a extração com sonicador e prensa francesa não era adequado para a produção em grande escala de  $\beta$ -galactosidase da estirpe bacteriana *Lactobacillus delbrueckii*.

Ultrassom (US) é um tipo de energia não radiante, considerada “verde” devido suas propriedades, com alta eficiência e reprodutibilidade nas áreas que tem sido aplicada. O principal efeito do US em meio líquido é atribuído ao fenômeno físico da cavitação e ao fenômeno químico da formação de radicais livres (FENG, BARBOSA-CÁNOVAS, WEISS, 2011; DELGADOPOVEDANO, LUQUE DE CASTRO, 2015; DALAGNOL et al., 2017).

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e também como método potencial para acompanhamento de cultivos microbianos. A maior parte das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de



bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e consequente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e criação de uma força capaz de romper as células e liberar seus componentes de interesse, como a enzima (BOSSIO et al., 2008).

Sinisterra (1992) mostrou que o ultrassom à alta intensidade pode romper células ou desnaturar enzimas, mas a baixa intensidade pode modificar o metabolismo celular ou aumentar a transferência de reagentes ou produtos através da parede ou membrana celular. Segundo o autor a utilização das radiações mais suaves têm maior interesse considerando as alterações provocadas em processos biotecnológicos.

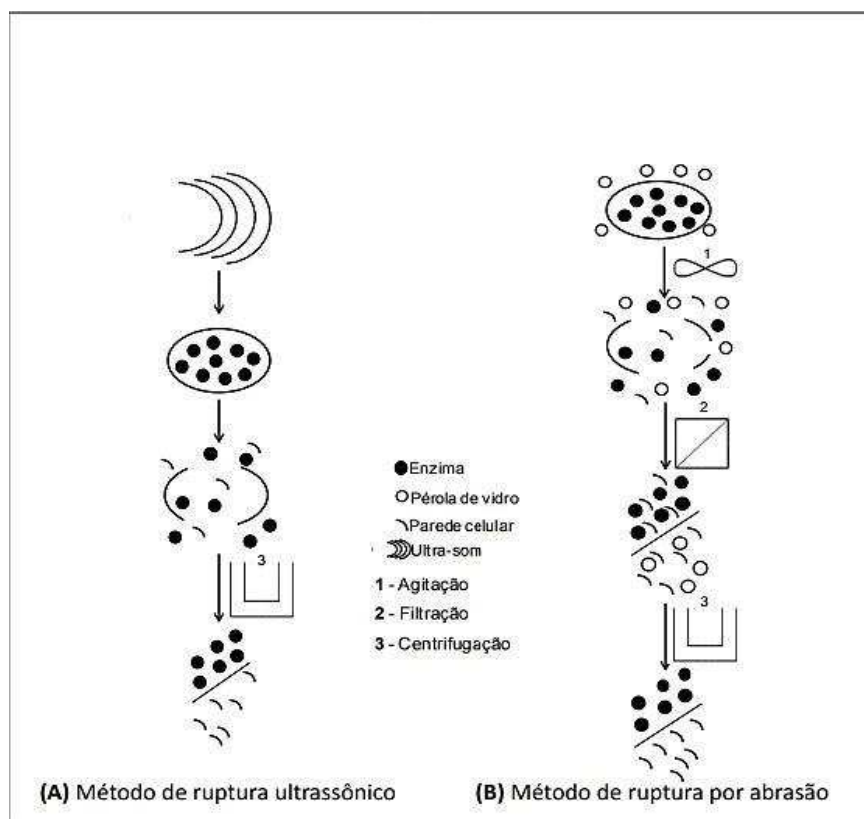
O rompimento manual com pérolas de vidro é um método mecânico que não demanda de muitos equipamentos e estrutura experimental. Ocorre devido à força de cisalhamento aplicada pelas esferas de vidro contra a parede celular das células. Consiste na adição de pérolas de vidro em um tubo contendo suspensão celular, então o tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado, e a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas abrasivas. Pode ser feito de maneira contínua e descontínua (Medeiros et al., 2008). A Figura 7 demonstra os mecanismos de ruptura pelos métodos de abrasão e ultrassônico.

Lemes et al. (2012) utilizaram o método de ultrassom e o método de abrasão com perolas de vidro. O rendimento do processo com ultrassom com ponteira intermediária foi de 876 U/g, quase duas vezes superior ao rendimento utilizando a microponteira, 480 U/g. Já o rendimento, utilizando método de abrasão com pérolas de vidro, foi de 977,5 U/g, demonstrando que o processo ultrassônico apresenta-se como uma alternativa analítica eficiente para extração da enzima produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*.

A Homogenização em alta pressão é processo mais utilizado para o caso de rompimentos em larga escala. O procedimento consiste no bombeamento constante, sobre pressão positiva, do líquido contendo as células por um sistema de orifícios de tamanho reduzido. Enquanto a lise Enzimática é um método mais utilizado em escala laboratorial, pois é economicamente inviável em escala industrial. Um grande número de enzimas que atua na parede celular das leveduras vem sendo descrito no decorrer dos anos, uma mistura de glucanases, quitinases, entre outras enzimas podem ser utilizadas com essa finalidade (FLEURI et al., 2008).



**Figura 7-** Mecanismo de ruptura celular pelo método ultrassônico (A) e pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (B).



Fonte: LEMES et al., (2012).

As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases, mananases, proteases e quitinases estão envolvidas na lise de leveduras. Em geral, somente duas enzimas são essenciais para o rompimento da célula: a protease lítica específica, que degrada a camada externa de mananaproteína e a  $\beta$ -1,3-glucanase lítica, que degrada a camada interna de glucana (ASENJO et al., 1985).

Entretanto, a  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 é capaz de lisar a parede celular de leveduras sem a presença de proteases líticas. (FLEURI, SATO, 2005).

Segundo Fleuri as enzimas invertases de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 podem ser extraídas com o tratamento da massa celular das leveduras com  $\beta$ -1,3-glucanase. Foi obtido 429,01 U/mg, após tratamento das leveduras com a  $\beta$ -1,3-glucanase durante 60 min a 35 ° C.

### 3. METODOLOGIA

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

#### 3.1 Substrato

O permeado de soro de leite, ilustrado na Figura 8, foi coletado na empresa Sooro de Marechal Cândido Rondon.

Após a coleta, o permeado foi armazenado em frascos de 1 litro a temperatura de  $-8,0 (\pm 2,0 \text{ } ^\circ\text{C})$  em congelador vertical Bosch, Freezer 32 e descongelados conforme a necessidade sob refrigeração à temperatura de  $3,0 (\pm 2,0 \text{ } ^\circ\text{C})$  por 24 horas (ISO 6887-2, 2003).

**Figura 8-** Permeado de soro de leite.



Fonte: Autor (2019).

### 3.1.1 Microrganismo

Para a produção de  $\beta$ -galactosidase foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (NCYC 587), da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP, fornecida pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel.

O microrganismo esteve mantido em meio “Malt Extract Ágar Base” (extrato de malte 30 g/L, peptona 5 g/L e ágar 15 g/L), como na Figura 9, a 4 °C, em geladeira Bosh, Style Single Door 34, com repiques a cada 2 meses (CAMARGO, 2016).

**Figura 9-** *Kluyveromyces marxianus* mantido em meio Malt Extract Ágar Base.



Fonte: Autor (2019).

O microrganismo foi crescido em erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio YPD (yeast extract; peptone; dextrose) (20 g/L peptona, 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de glicose), observado na Figura 10. O procedimento foi executado em fluxo laminar Grupo Velco, cflv 09 a fim de evitar contaminações na cepa. O cultivo do

pré-inoculo foi realizado em incubadora Thoth, 6430 com agitação a 150 rpm, temperatura de 30°C, por 24 horas.

**Figura 10-** Propagação de *Kluyveromyces marxianus* em meio YPD.



Fonte: Autor (2019).

Após o término do cultivo, as células foram centrifugadas em centrífuga de bancada Daiki, a 2000 rpm por 20 min, lavadas com água destilada estéril, centrifugadas novamente e ressuspensas em água destilada estéril. Após esses procedimentos, as células foram utilizadas como inóculo para fermentação (CAMARGO, 2016).

### 3.2 Curva de concentração celular

Após a propagação do microrganismo, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 100 mL de água destilada estéril, novamente centrifugadas, concentradas com 50 mL de água destilada estéril e realizou-se diluições para estabelecer uma curva padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis

Spectroquant, Pharo 100 a 620 nm e a concentração celular foi calculada conforme a curva de calibração com peso seco (OLSSON, NIELSEN, 1997).

Para a elaboração da curva de peso seco centrifugou-se 10 mL da amostra de cultivo por 20 minutos, ressuspendeu-se em água destilada e filtrou-se a suspensão em sistema de filtração com membrana 0,45 µm, previamente pesada e seca em micro-ondas até peso constante. O conjunto membrana + material retido foi seco em micro-ondas a 100 W por 20 minutos (RECH, 1998). A concentração celular ( $C_{m\grave{a}e}$ ) foi determinada pela equação 1.

$$C_{m\grave{a}e} = 1000 \times \frac{(m_F - m_I)}{V} \quad (1)$$

Na qual,

$m_F$ : massa da membrana + amostra;

$m_I$ : massa da membrana;

$V$ : volume de filtrado.

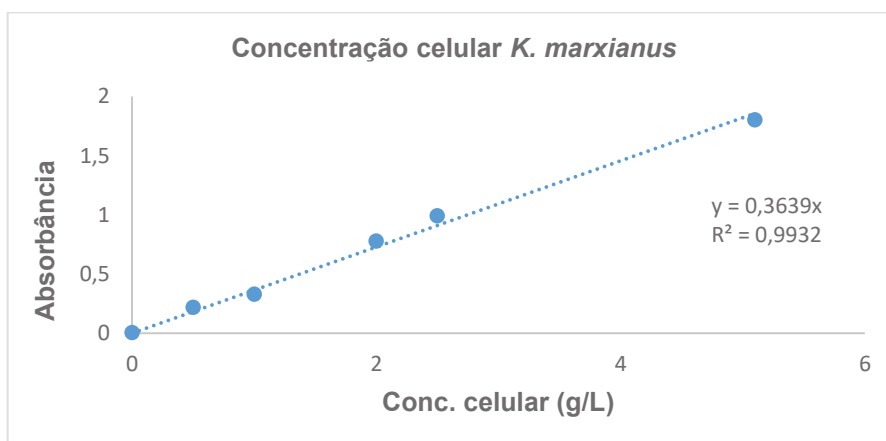
A partir da Eq. 2 calculou-se a concentração celular de cada amostra diluída.

$$C = \frac{C_{m\grave{a}e}}{F} \quad (2)$$

Na qual,

$F$ : fator de diluição.

**Figura 11-** Concentração celular de *K. marxianus* ATCC 36907.



Fonte: Autor (2019).

### 3.3 Produção da enzima $\beta$ -galactosidase

A enzima foi obtida por fermentação submersa em meio de permeado de soro de leite, seguindo as melhores condições obtidas no trabalho de Rachow (2019) a 37°C e 150 rpm por 3 horas, com concentração inicial de 4 g/L de células do pré-inoculo, realizado em incubadora Thoth, 6430 (Figura 12). Quanto à suplementação com extrato de levedura, foi utilizado uma concentração fixa de 10 g/L de extrato de levedura, e sais 10 g/L de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g/L de fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,6 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Figura 12-** Fermentação submersa em incubadora de agitação e temperatura controlada.



Fonte: Autor (2019).



### 3.4 Extração da enzima $\beta$ -galactosidase

A extração foi adaptada da metodologia de Neves, (2003) na qual uma suspensão celular na concentração de 4 g/L foi coletada com auxílio de pipeta e, em seguida, submetidas à centrifugação em 4000 rpm por 20 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas utilizando solução tampão, denominada solução de rompimento, será constituída por Tampão Tris-HCl 50mM pH 7.0.

#### 3.4.1 Extração de $\beta$ -galactosidase por abrasão com perolas de vidro

Pesou-se o equivalente a 5.5 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro) para 5ml de suspensão, foram utilizadas como agente abrasivo no rompimento e adicionadas à amostra ressuspensa em tampão Tris-HCl. Os rompimentos foram efetuados sob agitação em vórtex, utilizando a rotação de aproximadamente 3000 rpm, como na Figura 13, os tempos de rompimento foram testados para 1, 5, 10 minutos, com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo (MEDEIROS et al., 2008).

**Figura 13-** Extração com pérolas de vidro agitadas em vórtex.



Fonte: Autor (2019).

Após o rompimento, os fragmentos celulares e as esferas de vidro foram removidos por centrifugação em 4000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

### 3.4.2 Extração de $\beta$ -galactosidase com ruptor ultrassônico

Com auxílio de micropipeta, foi coletado 5mL de amostra já centrifugada e ressuspensa em tampão Tris-HCl. Então, as condições de rompimento foram ajustadas no aparelho de ultrassom de sonda (Sonicador Eco-Sonics), com microprobe. O rompimento foi feito a uma frequência de 20 kHz e os tempos de rompimento foram de 1, 5, 10 minutos. A Figura 14 demonstra a extração com o sonicador de probeira ultrassônica. (Lemes et al., 2012).

**Figura 14-** Extração em sonicador de probeira ultrassônica.



Fonte: Autor (2019)



### 3.4.3 Choque térmico para extração de $\beta$ -galactosidase

A metodologia de Novaki (2009) foi adaptada para a extração por choque térmico, após a obtenção dos extratos enzimáticos e foi adicionado 50 mL de água destilada gelada (8 °C) em cada frasco.

Em seguida foram agitados em incubadora com controle de agitação e temperatura (shaker) a 120 rpm durante 60 min a 4 °C. E então as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

### 3.4.4 Método do SDS para extração de $\beta$ -galactosidase

Para o método do SDS células foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de tampão de pH 7 contendo 50  $\mu$ L de SDS a 1% e incubados por 8 horas a 37 °C. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação (4000 rpm, 20 min) para determinação da atividade enzimática.

### 3.4.5 Método Triton para extração de $\beta$ -galactosidase

Para o método do Triton células foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de tampão de pH 7, contendo 50  $\mu$ L de Triton X-100 a 1% e incubado por 8 horas a 37 °C. O sobrenadante contendo a enzima bruta foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

## 3.5 Determinações da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada através do método ONPG (*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Em tubo de Eppendorf foi adicionado 780  $\mu$ L de tampão K (Fosfato de potássio monobásico 1,65 g/L; Fosfato de potássio dibásico dihidratado 11,58 g/L; Cloreto de magnésio hexahidratado 0,215 g/L;  $\beta$ -mercaptoetanol 3,67 g/L) e 110  $\mu$ L de amostra contendo a enzima. O tubo foi mantido em banho-maria BIOPAR, por 10 minutos a 30 °C. Em seguida, adicionou-se 110  $\mu$ L de ONPG 35 mM. Após 1 minuto a reação foi interrompida com 220  $\mu$ L de carbonato de sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm em

espectrofotômetro UV-Vis Spectroquant, Pharo 100. Para o branco, realizou-se o mesmo procedimento, usando água destilada no lugar da amostra. A atividade enzimática foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer (Equação 3) (RECH, 1998).

$$A = \varepsilon_{\text{ONPG}} \times L \times C_{\text{ONPG}} \quad (3)$$

Sendo,

A: absorvância da amostra;

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

L: caminho ótico (cm);

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

Considerando a diluição da amostra com a enzima, temos a equação 4.

$$C_{\text{ONPG}} = \frac{A \times V_f}{\varepsilon_{\text{ONPG}} \times L \times V_a} \times f \quad (4)$$

Na qual,

A: absorvância;

$V_f$ : volume final do teste;

$V_a$ : volume inicial da amostra;

f: fator de diluição.

A atividade enzimática volumétrica ( $A_V$ ) é determinada pela equação 5.

$$A_V = \frac{C_{\text{ONPG}}}{t} \quad (5)$$

Na qual,

t: tempo de reação (min);

$A_V$ : atividade enzimática volumétrica em  $U_{\text{ONPG}}/\text{mL}$  (quantidade de  $\mu\text{mols}$  de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação).

No caso da  $\beta$ -galactosidase,  $t = 1$  min;  $V_f = 1,22$  mL;  $V_a = 0,11$  mL;  $\varepsilon_{\text{onpg}} = 3,1$   $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$  e  $L = 1$  cm, a atividade enzimática volumétrica fica de acordo com a Equação 6.

$$A_V = 3,576 \times A \times f \quad (6)$$

A partir da equação 7, foi calculada a atividade específica ( $A_{\text{enzimática}}$ ) da  $\beta$ -galactosidase ( $U_{\text{ONPG}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ).

$$A_{\text{enzimática}} = \frac{A_V}{X} \quad (7)$$

Sendo,

X: Concentração celular no fermentador em g<sub>cél</sub>/L.

### 3.6 Análise do rompimento celular

A análise do rompimento celular foi realizada a partir do Fator de Purificação (FP), é uma medida empregada para acompanhar as operações de purificação. Foi calculado através da Equação 8 (PORTO et al., 2008).

$$FP = \frac{A_{\text{esppurificado}}}{A_{\text{espbruta}}} \quad (8)$$

Sendo,

$A_{\text{esppurificado}}$ : é a atividade específica da enzima após extração (U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>).

$A_{\text{espbruta}}$ : é a atividade específica da enzima bruta β-galactosidase (U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>).

Após a realização das etapas da metodologia, foram obtidos os resultados apresentados no próximo item.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção da enzima $\beta$ -galactosidase

Conforme descrito no item 3.3 foram obtidos os resultados de concentração celular e atividade enzimática apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado de concentração celular e atividade enzimática em duplicata após 3 horas de fermentação.

Sem extração		
Atividade enzimática ( $U_{ONPG/mL}$ )	Atividade enzimática específica ( $U_{ONPG/g_{cél}}$ )	Concentração celular (g/L)
5,475	9,580	0,571
5,500	9,300	0,592

Fonte: Autor (2019)

Os resultados obtidos nos dois ensaios não apresentaram diferenças consideráveis. A atividade volumétrica dos ensaios foi de 5,5  $U_{ONPG/mL}$  enquanto a atividade específica foi de 9,580  $U_{ONPG/g_{cél}}$  no primeiro e 9,300  $U_{ONPG/g_{cél}}$  no segundo ensaio, as concentrações celulares foram de 0,571 g/L e 0,592 g/L, respectivamente.

Fonseca, Carvalho e Gombert (2013) avaliaram o crescimento celular máximo de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em diferentes fontes de carbono. Eles constataram que os meios com maior crescimento celular foram os de sacarose com 5,73 g/L e os de lactose com 5,00 g/L, em temperaturas de 30 °C e 37 °C, com 24 horas de fermentação. Como o objetivo dos autores era verificar o melhor meio, não apresentaram valores de atividade enzimática.

Lima et al. (2013), em estudo com cepas do gênero *Kluyveromyces* para produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de soro de queijo em pó, na concentração de 50 g/L, obtiveram 1,97 g/L e 2,97 g/L de biomassa, e resultados de 0,33  $U_{ONPG/mL}$  e 168,96 U/g utilizando *K. marxianus* em fermentações com soro de queijo por 24 horas. Em comparação com esse trabalho, no qual o meio utilizado foi permeado de soro de leite suplementado com extrato de levedura, e tempo de fermentação de 3 horas, a atividade enzimática volumétrica foi superior ao resultado de Lima, enquanto a concentração celular foi bem inferior, o que pode estar relacionado ao

tempo de fermentação e a composição do meio. Quanto à suplementação com extrato de levedura neste trabalho, foi realizado de acordo com trabalhos anteriores (Rachow, 2019) que verificaram que 10 g/L proporcionaram maior atividade enzimática.

Santiago (2004) verificou que a concentração de lactose tem uma influência mais acentuada no crescimento celular; e a concentração de extrato de levedura na atividade enzimática. Comparando as atividades enzimáticas alcançadas com meios a base de soro a 50,0 e 70,0 g/L de lactose, ambos suplementados com extrato de levedura a 12,0 g/L, verifica-se que as mesmas foram praticamente iguais. Da mesma forma, Vasiljevic e Jelen (2001) avaliaram a produção de  $\beta$ -galactosidase utilizando leite desnatado, soro e permeado, através da ação de bactérias termófilas de ácido láctico, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842, perceberam que o crescimento dos microrganismos e a atividade enzimática no meio *in natura* nem sempre é significativa, tornando-se necessária a suplementação com fontes de nitrogênio, sais minerais e vitaminas.

Os parâmetros físico-químicos do permeado de soro de leite estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros físico-químicos do permeado de soro de leite.

Parâmetros	Composição
Ph	6,62
Umidade	85,40%
Lactose	8,46%
Lipídeos	0,03%
Proteínas	<0,1 %
Brix	15

Fonte: Rachow, (2019).

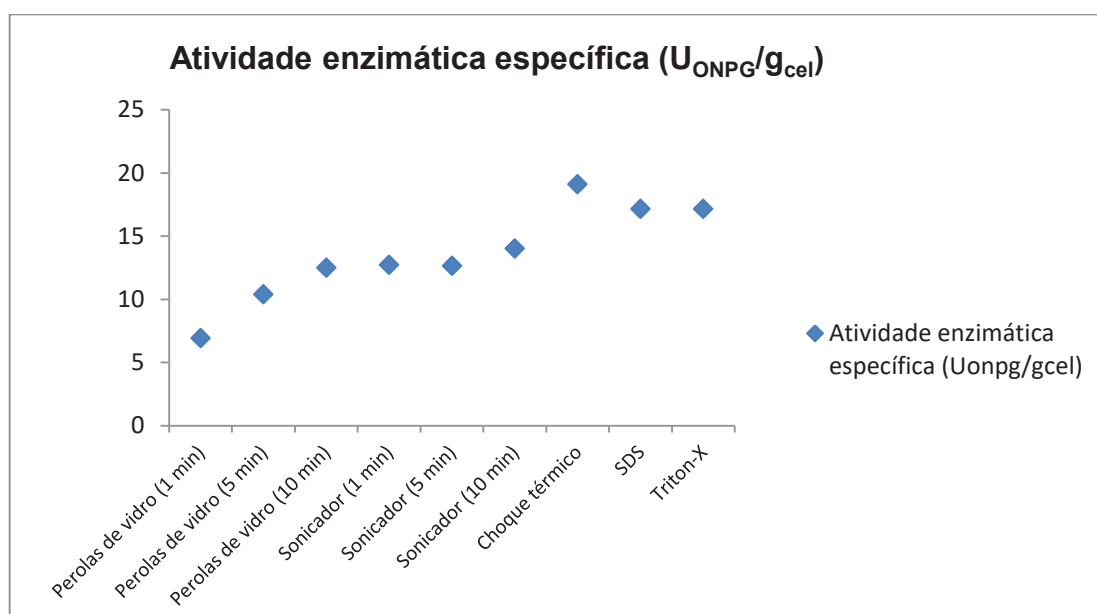
Conforme Tabela 2 é possível perceber que o permeado de soro de leite apresenta uma quantidade de sólidos totais de 15 °Brix, e a lactose é a molécula mais representativa, com 8,46 %. A levedura consome o dissacarídeo presente no meio e o converte em energia química para a célula, assim como os sais e o extrato de levedura. O consumo dos nutrientes reduz a disposição de sólidos, a lactose é hidrolisada à glicose e galactose, que são direcionadas para a via da glicose e via de

Leilor, respectivamente. Dessa forma a levedura não esta conseguindo assimilar e produzir tantas células quanto o esperado, pois as vias podem convergir para a produção piruvato, seguido de fermentação alcoólica ou manutenção e crescimento celular (BRITO, 2015).

## 4.2 Extração da enzima

Na tabela 3 em anexo estão os resultados obtidos de atividade enzimática volumétrica e específica, e na Figura 15 o resultado foi representado graficamente para uma melhor visualização.

**Figura 15-** Atividade enzimática específica de  $\beta$ -galactosidase por diferentes métodos de extração.



Fonte: Autor (2019).

### 4.2.1 Extração de $\beta$ -galactosidase por abrasão com perolas de vidro

A extração foi realizada conforme item 3.5.1, após a extração o melhor resultado foi no tempo de 10 minutos, com atividade enzimática volumétrica e específica de 6,92 U<sub>ONPG</sub>/mL e 12,5 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>.

Em comparação, Lemes (2012) utilizaram o método de abrasão com pérolas de vidro para extração de  $\beta$ -galactosidase, a enzima foi obtida por fermentação submersa utilizando meio de cultura com concentração de lactose de 28,2 g/L,

concentração de extrato de levedura de 17,0 g/L, concentração de sulfato de amônio de 8,8 g/L e mantido a 30°C, 180 rpm por 96h, e obtiveram atividades enzimáticas volumétricas e específicas de 39,1 U<sub>ONPG</sub>/mL e 8,8 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>, respectivamente.

Medeiros et al. (2008) ao utilizar pérolas de vidro de diferentes diâmetros (0,6 e 0,95 mm) para extrair  $\beta$ -galactosidase de *k. marxianus* obtiveram atividade enzimática de 597,04 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>. Entretanto é importante destacar as condições em que esse resultado foi obtido, por fermentação submersa utilizando meio composto por extrato de levedura, sulfato de amônio, dihidrogenofosfato de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado e 10 g/L de lactose a 180 rpm, 30 °C por 48 h, e extração em agitador tipo vórtex por 30 minutos. Numanoglu e Sungur (2004), constataram, sob as mesmas condições de trabalho de Medeiros et al., (2008) que tempos acima de 10 min não representavam melhorias significativas na extração desta enzima.

A metodologia de extração baseada no uso do vórtex é eficiente, contudo além de todos os ciclos de ruptura ser realizados manualmente, um bom controle da temperatura é necessário, pois como já foi verificado por Medeiros, devido ao aumento na interação entre as pérolas e as células contendo a enzima o aquecimento do meio pode provocar a desnaturação protéica, prejudicando a atividade biológica da enzima.

#### 4.2.2 Extração de $\beta$ -galactosidase com ruptor ultrassônico

Como descrito no item 3.5.2 foram testados 3 tempos diferentes, os resultados foram apresentados na Tabela 3, o tempo 10 min apresentou o melhor resultado, com valores de atividade enzimática volumétrica e específica de 7,76 U<sub>ONPG</sub>/mL e 14,0 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>, respectivamente.

Medeiros et al. (2008) estudaram a extração da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, as condições de produção são as mesmas citadas no item 4.2.1, utilizando sistema de banho de ultrassom em combinação com o processo de abrasão com pérolas de vidro em uma carga de 1,1 g/mL de suspensão celular (diâmetro entre 0,95- 1,05 mm), por 40 min, obtendo um rendimento de extração de 550,4 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>. Com isso pode-se perceber que a combinação dos métodos de extração é uma alternativa viável e eficiente para otimizar o rendimento de extração.

Lemes et al. (2012) utilizaram o ruptor ultrassônico com micro ponteira e ponteira intermediária, para extração de  $\beta$ -galactosidase de *K. marxianus* com as condições de obtenção também citadas no item 4.2.1. Obtiveram resultados de atividade volumétrica e específica de 19,2 U<sub>ONPG</sub>/mL e 7,7 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub> com a micro ponteira, e com a ponteira intermediária a atividade volumétrica e específica, respectivamente, foi de 35,04 U<sub>ONPG</sub>/mL e 6,0 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>. Em comparação com os resultados obtidos neste trabalho no qual foi utilizado somente a micro ponteira, os valores foram de 7,7 U<sub>ONPG</sub>/mL e 14 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>, respectivamente.

Este método de extração apresenta bons resultados, contudo a temperatura durante o processo deve ser controlada, pois a dissipação das ondas na suspensão celular gera calor e pode resultar na desnaturação da enzima e consequente perda de atividade biológica (Lemes et al. 2012). Esse método é menos trabalhoso e não necessita de trabalho manual constante, sendo uma alternativa viável para extração em escala laboratorial.

O uso do ultrassom para o rompimento em larga escala é inviável, pois é necessário utilizar grande quantidade de sondas dispostas em série e instalar um eficiente sistema de refrigeração.

#### 4.2.3 Extração de $\beta$ -galactosidase com choque térmico

O método do choque térmico para extração celular foi o melhor entre os cinco métodos utilizados para extração enzimática, como valores de atividade volumétrica e específica, respectivamente, de 10,4 U<sub>ONPG</sub>/mL e 19,1 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>.

Novaki (2009) utilizou choque térmico com adição de água gelada nos extratos obtidos por fermentação em estado sólido de *Aspergillus caseiellus*, para extrair a invertase. Nesse tipo de fermentação o objetivo é fazer com que ocorra a precipitação, o termo precipitação é usado para descrever uma operação na qual uma alteração química ou física, em uma solução protéica causa a formação de partículas insolúveis de proteína. Usualmente ela é considerada um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (KILIKIAN & PESSOA JR, 2005).

Não foi encontrada durante a revisão da literatura a utilização de choque térmico para extração de enzimas intracelulares por fermentação submersa. Esta é uma alternativa que despertou interesse, por isso foi verificado neste trabalho como



método de extração da  $\beta$ -galactosidase. Os resultados foram satisfatórios, sendo o método que apresentou melhor rendimento, mesmo não ocorrendo à precipitação, a diferença de temperatura pode ter causado um desequilíbrio osmótico na célula, permeabilizando a estrutura da parede celular e liberando a enzima para o meio extracelular.

#### 4.2.4 Extração de $\beta$ -galactosidase com SDS

O Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como agente químico para o rompimento da  $\beta$ -galactosidase, pois é um detergente aniônico que age rompendo ligações não covalentes nas proteínas, o que causa desnaturação e perda da sua forma nativa. Como apresentado na Tabela 3, foi o segundo método mais eficiente de extração, com uma atividade enzimática volumétrica e específica, de respectivamente, 9,5 U<sub>ONPG</sub>/mL e 17,14 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cel</sub>.

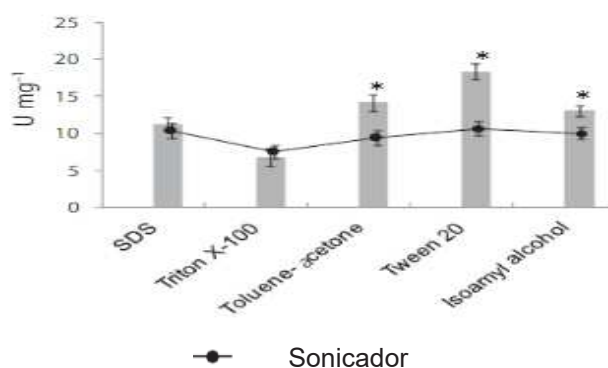
Bansal et al. (2008) utilizou SDS combinado com clorofórmio, e obteve os melhores resultados de atividade da  $\beta$ -galactosidase, com valores de atividade específica de 168 U/g<sub>cel</sub>, a enzima foi produzida a partir de *K. marxianus* e soro de leite por 30 h de fermentação.

Banerjee et al. (2016) utilizou SDS 1%, Triton-X, Tween 20, Acetona e Tolueno, e álcool isoamilico, para extrair  $\beta$ -galactosidase de *Arthrobacter oxydans*, cujo controle foi por sonicação, pela Figura 15 verifica-se que a atividade enzimática específica foi de aproximadamente 100 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cel</sub>, e o SDS não apresentou diferença significativa do método controle.

Prasad et al. (2012) comparou 4 métodos de extração de  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium animalis* Bb12 e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, e para ambos os microorganismos o método do SDS-clorofórmio foi um dos menos eficientes, ganhando apenas do tratamento com Tolueno-Acetona, com atividade 1,58 U/mL no caso de *B. animalis* Bb12 e 4,85 U/mL para *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Ambos os resultados contradizem os obtidos neste trabalho, essa diferença pode estar relacionada principalmente ao microorganismo utilizado, nos dois últimos trabalhos citados o SDS foi utilizado para extrair a enzima de bactérias e não foi eficiente, no caso da levedura *K. marxianus* foi um dos melhores métodos.

**Figura 16-** Extração da cepa bacteriana da  $\beta$ -galactosidase *Arthrobacter oxydans* utilizando diferentes métodos químicos, considerando a sonicação como controle.



Fonte: Banerjee et al, 2015.

#### 4.2.5 Extração de $\beta$ -galactosidase com Triton X-100

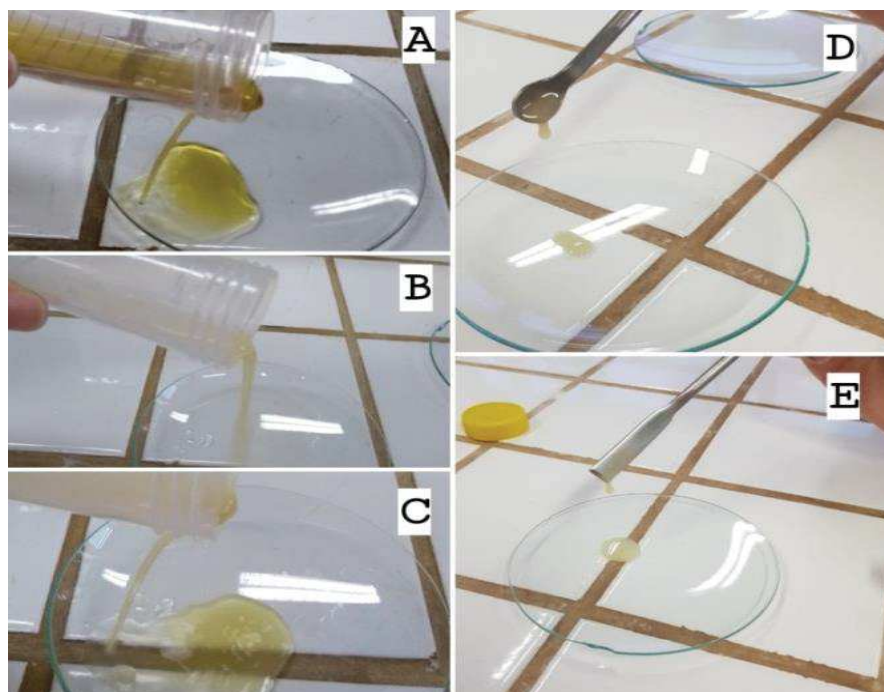
O Triton X-100 foi utilizado como agente químico para extração da  $\beta$ -galactosidase com uma atividade enzimática volumétrica e específica, de respectivamente, 9,5 U<sub>ONPG</sub>/mL e 17,14 U<sub>ONPG</sub>/g<sub>cél</sub>, o mesmo obtido com SDS. Dessa maneira, os métodos químicos de extração enzimática se mostraram eficientes e de fácil aplicação, apesar de longo tempo.

Banerjee et al. (2016), na sua comparação dos diferentes métodos químicos de extração, notou que o método do Triton X foi o menos eficiente para extrair  $\beta$ -galactosidase de *Arthrobacter oxydans* (Figura 16) o que contradiz novamente os resultados obtidos neste trabalho, sugere que esse agente pode ser melhor aplicado para extração de células de levedura, pois o resultado encontrado foi satisfatório.

O Triton X-100 é um tensoativo não iônico com viscosidade de 240 cp. Segundo a ficha de informações do produto (SIGMA, 2019), sua absorção na região ultravioleta do espectro pode interferir na quantificação de proteínas, seria indicado utilizar uma resina polimérica ou cromatografia para remoção desses tensoativo, aumentando o número de etapas de *downstream*, e conseqüentemente encarecendo o processo.

Foi realizada uma análise simples e qualitativa realizada do perfil de escoamentos dos sobrenadantes (Figura 17), e o método do Triton X-100 apresentou perfil mais viscoso.

**Figura 17-** Análise visual do escoamento dos sobrenadantes utilizados para determinação da atividade enzimática. (A) Choque térmico (B) Sonicador (C) Abrasão com perolas de vidro (D) Triton-X-100 (E) SDS.



Fonte: Autor (2019).

Rojas (2001) estudou a purificação das proteínas do soro de queijo  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg), onde as viscosidades das fases foram o parâmetro empregado para selecionar a concentração de soro de queijo a ser adicionada aos SAB (Sistemas aquosos bifasicos). Com os dados de viscosidade, foi escolhido para estudo o SAB composto por 18 % PEG (Polietilenoglicol 1500 + 18 % FFP (fosfato de potássio) + 10 % de soro de queijo + 54 % água (%peso/peso). Para desenvolver um bom processo de purificação, é importante analisar a viscosidade das amostras, no presente trabalho não foi possível avaliar quantitativamente e obter valores de viscosidade, mas através do teste realizado já é possível DEFINIR que as amostras possuem baixas viscosidades, facilitando a purificação.

Altas viscosidades causam instabilidade, escoamento irregular e alteram a separação dos picos dos solutos que compõem a mistura, reduzindo o desempenho da coluna (LIANG, 2000). Já uma amostra com baixa viscosidade tende a levar à obtenção de uma boa resolução.

### 4.3 Comparação dos métodos

Após os cultivos a atividade enzimática foi avaliada via ONPG, e esse resultado foi utilizado para determinar o fator de purificação, os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que o ONPG não quantificando toda a enzima no interior da célula, pois com exceção do método perolas de vidro com rendimento de extração de 73 %, os demais métodos apresentaram resultados acima de 100 %.

Tabela 4- Fator de purificação.

Fator de purificação	% Extração
Sem extração	100
Perolas de vidro (1 min)	73
(5 min)	111
(10 min)	133
Sonicador (1 min)	135
(5 min)	134
(10 min)	150
Choque térmico	203
SDS	183
Triton X-100	183

Fonte: Autor (2019).

Al-Jazairi (2015) realizou a permeabilização das células de *K. marxianus* DIYSI 11 com um tampão, seguido da adição de SDS e clorofórmio, a atividade enzimática foi determinada pelo método do ONPG, e o tempo de reação após a adição do ONPG foi até a solução apresentar coloração amarela. Neste trabalho, o tempo de reação com o ONPG foi de 1 min, o que demonstra que o tempo de contato influencia o consumo do reagente.

Enquanto Viana et al. (2018), utilizaram etanol como método de permeabilizar a célula de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 em soro de queijo, utilizando o método de hidrólise enzimática de lactose obtiveram atividades de 0,17 U/mL a 0,44 U/mL.

Rachow (2019) utilizando a mesma metodologia deste trabalho, obteve valor máximo de atividade 16,312  $U_{ONPG}/g_{cél}$  após 1 hora de fermentação, sem nenhum método de permeabilização celular. Alves (2018) permeabilizou as células de *K. marxianus* com etanol para determinação da atividade enzimática pelo método ONPG e verificou uma atividade enzimática de 1100  $U_{ONPG}/g_{cél}$ . Desta maneira, para

experimentos futuros uma técnica de permeabilização celular deve ser realizada antes de quantificar a atividade enzimática.

Dessa forma, fica evidente através da Tabela 4 que o método com melhor rendimento de extração foi o de choque térmico, seguido pelos métodos químicos, extração com ruptor ultrassônico e pérolas de vidro.

Como a  $\beta$ -galactosidase é uma enzima de grande importância para indústria farmacêutica e de alimentos, exige eficientes processos de purificação, principalmente partindo dos métodos de extração por agentes químicos. Dentre os métodos de purificação de biomoléculas mais utilizados estão às cromatografias, adsorção em leito fixo e leito expandido, e sistema aquoso bifásico.

Silva e Franco (1999) desenvolveram um método para extração e purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. Na primeira etapa, um sistema composto por 6 % de PEG 4000-APGP (paminofenil-f3-D-tiogalactopiranosídeo) e 8 % de dextrano 505 foi utilizado, onde a  $\beta$ -galactosidase foi fortemente particionada para a fase superior. Na segunda etapa, um sistema formado por 13 % PEG-APGP e sal de fosfato a 9 % foram utilizados para reverter o valor do coeficiente de partição de  $\beta$ -galactosidase, a fim de proporcionar a purificação e recuperação de 39 % da enzima na fase de fundo rica em sal.

Silva (2009) estudou a purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando a técnica de sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração. Determinou as condições de purificação, considerando a pureza e o rendimento da enzima. No método de SAB o sistema era formado por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio. A melhor condição obtida foi com fator de purificação da  $\beta$ -galactosidase de 10,1 vezes e recuperação de 175,2 % na fase de fundo do SAB utilizando PEG 8000 no pH 8,0. Já os testes de ultrafiltração foram realizados a fim de selecionar a massa molar de corte de uma membrana comercial adequada ao processo, na qual permitisse a passagem da menor quantidade de enzima para o permeado, o que foi quantificado por medidas de atividade enzimática e do teor de proteína na alimentação e no permeado após cada teste. Desta forma, estudos sobre a purificação da enzima devem ser realizadas, dando sequência as etapas do processo de *downstream*.

## 5. CONCLUSÃO

O permeado de soro de leite se mostrou um potencial meio fermentativo para a levedura *Kluyveromyces marxianus* produzir de  $\beta$ -galactosidase, desde que seja suplementado para atender as necessidades nutricionais, como as fontes nitrogenadas para o bom desenvolvimento da levedura.

Os métodos de extração testados tiveram bons rendimentos, e dessa forma se mostraram alternativas com potencial para serem estudados. Os métodos consolidados de extração dessa enzima por *Kluyveromyces marxianus* são extração com ruptor ultrassônico e abrasão com pérolas de vidro, métodos esses que necessitam de controle de temperatura que devem ser aprimorados.

O método do choque térmico é um método simples, barato e atóxico que apresentou os melhores rendimentos e não foi encontrado na literatura aplicação em fermentação submersa, o tornando uma técnica com grande potencial de aplicação, inclusive em sistema contínuo.

Os métodos químicos também apresentaram bons rendimentos, porém requerem etapas adicionais no processo de *downstream*. Além disso, ficou claro que a permeabilização da célula é um importante fator para atividade enzimática, e deve ser aplicado em estudos futuros.

## 6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Métodos de permeabilização celular.
- Métodos de purificação enzimática.
- Utilização de mais métodos de extração, como extração enzimática.

## REFERÊNCIAS

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

ALVES, F. G. **Produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada**. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – Rio Grande do Sul, 2008.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A.; HUNTER, J. B.; LECORRE, S. **Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics**. Process Biochemistry, Oxford, p. 159-164, 1985.

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

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

BANERJEE, G. *et al.* Chemical extraction and optimization of intracellular  $\beta$ -galactosidase production from the bacterium *Arthrobacter oxydans* using Box-Behnken design of response surface methodology. **Acta alimentaria**, v. 45, n. 1, p. 93-103, 2016.

BECCERA, M. *et al.* Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-140, 2001.



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

BELLOCH, Carmela et al. An analysis of inter-and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. *Yeast*, v. 19, n. 3, p. 257-268, 2002.

BIASUTTI, E. A. R. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina**, 2006. 88 p. Dissertação (Pós Graduação em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. **Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.

BOTHA, Alfred. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2011.

BRADFORD, M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

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

BURY, D.; JELEN, P.; KALAB, M. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of

sonication, high-pressure homogenization and bead milling. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n. 1, p. 23-29, 2001.

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

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 3ª Edição, p. 751, 2000.

CARVALHO, Nuno Miguel Barbosa de; FONSECA, Gustavo Graciano; GOMBERT, Andreas Karoly. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Estados Unidos, **Applied Microbial and Cell Physiology**, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-4748-6.

CASTILHO-VALAVICIUS, B. A. *et al.* The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **CIÊNCIA E CULTURA**, v. 44, p. 301-301, 1992.

CAZY. Carbohydrate Active Enzymes. Glycoside Hydrolase Family 2. Disponível em < [http://www.cazy.org/GH2\\_structure.html](http://www.cazy.org/GH2_structure.html) > Acesso em 30/11/2019.

DAGBAGLI, Seval; GOKSUNGUR, Yekta. Optimization of b-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 11-12, 2008.

DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, n. July, p. 80–87, 2017.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 2015.

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

ENATTAH, Nabil Sabri *et al.* Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nature genetics**, v. 30, n. 2, p. 233, 2002.

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

FENG, Hao; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V.; WEISS, Jochen. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. New York: Springer, 2011.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FLEURI, Luciana Francisco *et al.*  $\beta$ -1, 3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, 2008.

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

FLORES, M. V.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. J. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994.

FURLAN, S.A., SCHNEIDER, A.L.S., MERKLE, R., CARVALHO-JONAS, M.F.; JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of

$\beta$ -D -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium. **Acta Biotechnologica**, vol. 21, no. 1, p. 57-64, fev. 2001.

GECIOVA, Jana; BURY, Dean; JELEN, Paul. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.

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

HENSING, M., *et al.* Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 516-521, dez. 1994.

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

HEYMAN, Melvin B. *et al.* 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**, Filadélfia – Pensilvânia, v. 45, n. 1, p. 93-95, 1991.

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

ISO 6887-2, 2003. **Microbiology of food for human consumption and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological consideration**. Ed. 1.

JURADO, E; CAMACHO, F; LUZÓN, G; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002.

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. Inovação de Produto com Concentrados de Proteína de Soro de Leite dos USA: **Boletim da Sociedade brasileira de ciência e tecnologia de alimentos**, v.31, n.1, p.17-21, Campinas, 1997.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 17–26, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. ed. Neal V. 1997.

LEMES, Ailton Cesar; ÁLVARES, Gabriel Teixeira; KALIL, Susana Juliano. Extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2013.

LIMA, A.F; CAVALCANTE, K.F; FREITAS, M.F.M; RODRIGUES, T.H.S; ROCHA, M.V.R; GONÇALVES, L.R.B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, n. 48, p. 443-452, 2013.

LIANG, J.-Z. Pressure effect of viscosity for polymer fluids in die flow. *Polymer*, v. 42, n. 8, p. 3709-3712, 2001.

LIMA, Ariosvana Fernandes et al. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 443-452, 2013.

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

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

MEDEIROS, Fabiana Oliveira de *et al.* Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. 2008.

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

MURARI, Cleidiane Samara *et al.* Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013.

NEVES, Luiz Carlos Martins das. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando '*Saccharomyces cerevisiae*' W303-181**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDNI, E.  $\beta$ -galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 71, p. 10-15, 2011.

NOVAKI, Lexandra *et al.* Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casei* Ill. 2009.

OLIVEIRA, A. F de. **Desenvolvimento de Bebida Láctea Não Fermentada com Soro de Leite Ácido**. 2011. 38f. Dissertação (TCC) – Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, Pr.

OLIVEIRA DE MEDEIROS, F.; VEIGA BURKERT, Carlos A.; JULIANO KALIL, Susana. Purification of  $\beta$ -Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 5, p. 911-918, 2012.

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

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

OZMIHCI, S.; CARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, p.876-880, july, 2007.

PECOTA, D.C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N.A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.408-416, 2007.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Ángel et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Journal of structural biology*, v. 177, n. 2, p. 392-401, 2012.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. Editora Manole, São Paulo, Brasil. p. 176 – 279, 2005.

PORTO, T. S. et al. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 4, p. 716-721, 2008.

PRASAD, Laxmi N.; SHERKAT, F.; SHAH, N. Extraction and characterisation of  $\beta$ -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 and

Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus ATCC 11842 grown in whey. International Food Research Journal, 2013.

RACHOW, M, L. **Produção de  $\beta$ -galactosidase a partir do permeado de soro de leite utilizando a levedura *kluveromyces marxianus* ATCC 36097.** 2019.

Monografia (TCC)- Engenharia de Bioprocessos e biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo, Pr.

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

REBOUILLAT, Serge; ORTEGA-REQUENA, Salvadora. Potential applications of milk fractions and valorization of dairy by-products: a review of the state-of-the-art available data, outlining the innovation potential from a bigger data standpoint. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 03, p. 176, 2015.

RECH, Rosane; AYUB, Marco A. Z. **Aproveitamento do soro de queijo para produção de lactase por *Kluveromyces marxianus*.** 1998. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

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

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

ROJAS, Edwin Elard Garcia. Separação e purificação de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina pela cromatografia por exclusão molecular após a extração com sistemas aquosos bifásicos. 2001. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L. RIBEIRO, E. J. **Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com**



**Kluyveromyces marxianus**. Food Science and Technology, Brasil, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

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

SIGMA. Ficha técnica do Triton X-100. SIGMA PRODUCT NUMBER: X-100 (Laboratory Grade). Disponível em <<https://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf>> Acesso em 18/11/2019.

SILVA, Ana Paula Rosa da. Purificação de b-galactosidade de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas. 2009. Dissertação de Mestrado.

SILVA, Maria Estela da; FRANCO, Telma Teixeira. Purification of microbial b-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. Revista de Microbiologia, v. 30, n. 4, p. 324-331, 1999.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. Ultrasonics. Oxford, v. 30, nº 7 3, p.180 – 185, 1992.

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American Family Physician**, v. 65, n. 9, p. 1845-1850, 2002.

SYRIOPOULOS, *et al.* Transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* physiology in the context of galactose assimilation perturbations. **Molecular BioSystems**, v. 4, n. 9, p. 937-949, out. 2008.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 6, p. 631-637, 2000.

TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica**. 97 f. Tese

(Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, 2017.

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

VAN DEN BERG, Johan A. *et al.* *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. **Bio/technology**, v. 8, n. 2, p. 135, 1990.

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

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n. 2, p. 75-85, 2001.

VIANA, Caroline dos Santos et al. Determination of Cell Permeabilization and Beta-Galactosidase Extraction from *Aspergillus oryzae* CCT 0977 Grown in Cheese Whey. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2018, 2018.

WILLIAMS, A.R., *Ultrasound: Biological effects and potential hazards*. 1 ed., Orlando, **Academic Press**, p.321, 1983.

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

ZOPPELLARI, Francesca; BARDI, Laura. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. **New biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 607-613, 2013.

## ANEXOS

Tabela 3. Resultados de atividade enzimática volumétrica e específica dos métodos de extração celular.

Método de extração (X= 0,554 g/L)	Atividade enzimática volumétrica ( $U_{ONPG}$ /ml)	Atividade enzimática específica ( $U_{ONPG}$ /gcel)
Perolas de vidro (1 min)	3,83	6,91
(5 min)	5,75	10,40
(10 min)	6,92	12,50
Sonicador (1 min)	7,05	12,72
(5 min)	7,00	12,63
(10 min)	7,76	14,00
Choque térmico	10,40	19,10
SDS	9,50	17,14
Triton-X	9,50	17,14

Fonte: Autor (2019).