



## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA EM SORO DE QUEIJO PORUNGO POR *Kluyveromyces marxianus*

**Resumo:** O aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a obtenção de biomoléculas tem incentivado o avanço de novas estratégias de produção. O soro de queijo, um substrato rico em lactose, serve como fonte alternativa e de baixo custo para a obtenção da enzima  $\beta$ -galactosidase, comumente empregada na indústria de alimentos. O objetivo do trabalho foi aproveitar o soro de queijo porungo, substrato ainda pouco explorado, para produção da enzima e determinação das características enzimáticas. Neste trabalho, a  $\beta$ -galactosidase foi produzida pelo cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meio de cultura à base de soro de queijo porungo. As fermentações foram conduzidas em shaker a 180 rpm, a 30°C, pH 7,0. O extrato bruto obtido foi analisado quanto às condições ótimas de atividade da enzima quanto a temperatura (20-60 °C) e pH (5,5-8,0). A atividade enzimática máxima foi de 14,52 U ml<sup>-1</sup> em 15 h de cultivo, consumindo 85 % da lactose (7,69 g L<sup>-1</sup>). A enzima apresentou atividade ótima a 37 °C e pH 6,5. O soro de queijo mostrou potencialidade para a síntese da enzima  $\beta$ -galactosidase, agregando valor a este, e simultaneamente, reduzindo os impactos ambientais ocasionados pelo descarte inadequado. <https://youtu.be/ckw-dYOdJck>

**Palavras-chaves:**  $\beta$ -galactosidase; *Kluyveromyces marxianus*; RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS; SORO DE QUEIJO PORUNGO

### INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos alternativos para aplicação em bioprocessos vem impulsionando pesquisas a desenvolver novas estratégias tecnológicas para a obtenção de biocompostos. O soro de queijo representa o principal e mais problemático subproduto da indústria de laticínios, sendo caracterizado por elevados valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que variam na faixa de 30-50 g L<sup>-1</sup>, apresentando potencial poluidor cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico (SISO, 1996; GUIMARÃES *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2016).

Contudo, devido a sua composição rica em nutrientes, apresenta potencialidade de aplicação em diferentes processos biotecnológicos e na obtenção de biomoléculas, tais como a enzima  $\beta$ -galactosidase, popularmente conhecida como lactase (EC 3.2.1.23). Esta enzima é classificada como uma hidrolase, responsável pela hidrólise da lactose originando como produtos a mistura equimolar de glicose e galactose (SISO, 1996; GROSOVA *et al.*, 2008, FAI e PASTORE, 2015). A produção da  $\beta$ -galactosidase através do aproveitamento de subprodutos industriais é uma ferramenta importante para a redução dos custos de produção associada à sua utilização. Além disso, proporciona um destino



adequado ao soro de queijo, minimizando a problemática de geração de resíduos das indústrias de laticínios (RECH *et al.*, 1999).

Com base na importância desta enzima na indústria de alimentos e no destino adequado para o soro de queijo porungo, um subproduto da agroindústria do Território Lagoa do Sino, ainda pouco explorado cientificamente, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção da enzima através da levedura *Kluyveromyces marxianus* em meio soro de queijo e em seguida determinar suas condições ótimas de temperatura e pH.

### MATERIAIS E MÉTODOS

O soro de queijo foi fornecido por produtores de queijo porungo pertencentes ao Território Lagoa do Sino, localizado no município de Angatuba, São Paulo. Este foi previamente hidrolisado com Alcalase 2.4 L (Tovani Benzaquen Ingredients, SP, Brazil) a 55 °C, pH 8,5, por 3 horas e estocado em freezer a -16°C. Utilizou-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. A linhagem foi cedida pelo Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia (BiotecLab), do Instituto de Ciência e Tecnologia em Alimentos da UFRGS. A renovação da cultura microbiana foi realizada pelo método de esgotamento, em placas de Petri estéreis com meio nutritivo YEP-Lactose, sendo após incubadas em estufa a 30 °C por 48 horas e armazenadas a 4 °C. A produção da enzima foi realizada de acordo com estudo de otimização realizado por Coelho *et al.* (2019), usando temperatura de 30 °C e pH 7,0, a partir de soro de queijo suplementado com extrato de levedura (3 g L<sup>-1</sup>). A enzima foi extraída através da ruptura da parede celular de acordo com a metodologia modificada de Medeiros *et al.* (2008). O consumo da lactose foi determinado pelo método do ácido 3,5 - dinitrosalicílico - DNS (CHAPPLIN e KENNEDY, 1994). A determinação da concentração celular foi determinada seguindo metodologia proposta por Gabardo *et al.* (2014). A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo metodologia descrita por Klein *et al.* (2013), utilizando ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) como substrato. A experimentação foi realizada em duplicata. A temperatura ótima da β-galactosidase foi avaliada a partir de solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M contendo solução de cloreto de magnésio 1,5 mM (MgCl<sub>2</sub>), em pH 7,0, variando a temperatura entre 20°C a 60°C. Da mesma forma, o pH da β-galactosidase foi avaliado na faixa de 5,5 a 8,0, em 37°C. A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita acima. Os testes foram realizados em triplicata.

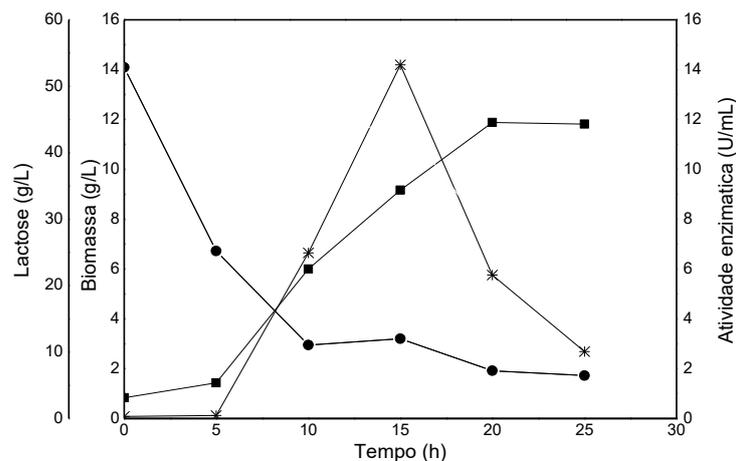
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade enzimática máxima foi encontrada em 15 horas, alcançando 14,19 U mL<sup>-1</sup>, enquanto que o consumo de lactose atingiu praticamente sua totalidade após 20 horas de cultivo, em que a levedura metabolizou 85% da lactose (7,69 g L<sup>-1</sup>), com produção máxima de biomassa de 11,88 g L<sup>-1</sup> (Figura 1). A curva de crescimento microbiano (biomassa) apresentou uma curta fase lag, atingindo rapidamente a fase exponencial, demonstrando a adaptação da levedura ao meio soro de queijo. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os encontrados na literatura para a produção de β-galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, pode-se concluir que os mesmos foram bastante similares. Santiago



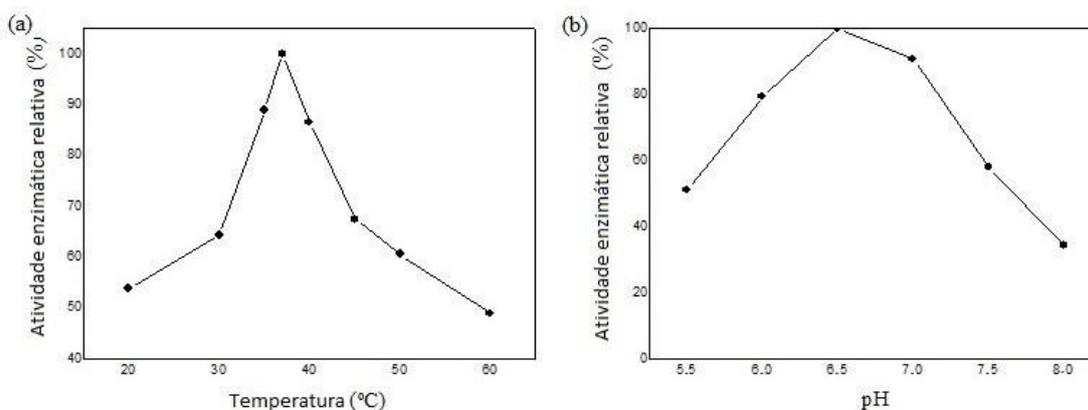
*et al.* (2004), estudaram a síntese de  $\beta$ -galactosidase a partir de soro de queijo com e sem suplementação por extrato de levedura (30 °C, 150 rpm, pH 5,5) a partir de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 e encontraram máxima produção da enzima (20 U mL<sup>-1</sup>) no tempo de 12 h ao utilizar o dobro da concentração de extrato de levedura do presente trabalho (6 g L<sup>-1</sup>) frente a 12 U mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática quando testada a produção da enzima sem a suplementação do soro de queijo. Em contrapartida, valores de atividade enzimática menores foram obtidos por Rech *et al.* (1999) a partir de duas linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, CBS 712 e CBS 6556, em soro de queijo suplementado com extrato de levedura, conduzido em biorreator (500 rpm, 37 °C, pH 5,5), chegando a um máximo de, aproximadamente, 5,0 U mL<sup>-1</sup> em 10 h de cultivo e de 4,5 U mL<sup>-1</sup> em 25 h de cultivo, para cada uma das linhagens, respectivamente.

Figura 1 - Cinética de fermentação para a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 quanto ao consumo de lactose (●), atividade enzimática (\*) e biomassa (■).



Ao analisar as condições de pH e temperatura ótimas (Figura 2), nota-se que a atividade enzimática é dependente da temperatura (Figura 2a).

Figura 2 - Efeito da temperatura (a) e pH (b) na atividade da  $\beta$ -galactosidase.



Uma atividade enzimática ascendente é observada até atingir a atividade máxima a 37 °C, e acima desta temperatura a atividade apresentou um declínio acentuado. Isso ocorre porque os valores de energia de ativação ( $E_a$ ) para a desativação enzimática costumam ser maiores que os valores  $E_a$  para o efeito de ativação, uma vez que a desnaturação da proteína envolve o desdobramento de grandes segmentos da cadeia polipeptídica (processo global), exigindo maior alteração de energia livre do que a necessária estabilização do estado de transição no sítio ativo (processo localizado) (Damodaran *et al.*, 2007). Além disso, essa característica, segundo Illanes *et al.* (1998), é inerente às lactases provenientes de leveduras, visto que enzimas obtidas através de leveduras geralmente se apresentam mais termosensíveis daquelas observadas por fungos e bactérias (50-60°C), uma vez que sua faixa de temperatura ótima está abaixo. Similarmente ao presente estudo, Alves (2008) estudando a imobilização da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 encontrou uma maior atividade a 37 °C, observando decréscimo de atividade para valores fora dessa faixa de temperatura.

A atividade enzimática foi ascendente até pH 6,5 (Figura 2b), quando atingiu o valor máximo e começou a declinar. O valor ótimo de pH obtido para a  $\beta$ -galactosidase (6,5) está de acordo com a literatura em que são reportados valores de pH ótimos na faixa de 6,0-7,3 para enzimas obtidas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* (ZHOU & CHEN, 2001; JURADO *et al.*, 2002). Assim como no presente trabalho, Jurado *et al.*, (2002) estudaram o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* e encontraram maior atividade enzimática em pH 6,6 e temperatura de 37 °C. Em concordância, Song *et al.* (2010) encontraram pH e temperatura ótimos de, respectivamente, 7,0 e 37°C para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre, quando investigada a influência do pH (5,0 a 9,0) e da temperatura (17-42 °C). Embora no estudo de Klein *et al.* (2013) os autores observaram a atividade máxima da  $\beta$ -galactosidase a 45 °C utilizando *Kluyveromyces lactis* (Maxilact LX 5000) na forma livre, o pH ótimo (6,5) estava de acordo com os resultados deste trabalho.

## CONCLUSÕES



O meio de cultura formulado com soro de queijo se mostrou adequado para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 e para a síntese da enzima  $\beta$ -galactosidase, agregando valor significativo a este subproduto e reduzindo os impactos ambientais ocasionados pelo descarte incorreto do mesmo. O conhecimento das condições enzimáticas ótimas consiste em uma importante ferramenta para sua aplicação industrial.

### REFERÊNCIAS

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

CHAPPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. 2 edition. Oxford University Press, Oxford, 1994.1-40.

COELHO, R. J. S., AYUB, M. A. Z.; PIMENTEL FILHO, N. J.; GABARDO, S. Biotechnological use of porungo cheese whey to produce  $\beta$ -galactosidase. In: XXII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS E XIII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 4. 2019. In: Anais. Uberlândia, MG, 2019.

DAMODARAN S.; PARKIN K. L.; FENNEMA O. R. Fennema's Food Chemistry. 4 edition. Boca Raton: CRC Press, 2007.1160 p.

DAS, M.; RAYCHAUDHURI, A.; GHOSH, S. K. Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. Procedia Environmental Sciences, 35: 833 – 846, 2016.

FAI, A. E. C.; PASTORE, G. M. Galactooligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. Scientia Agropecuaria, 6: 69 – 81, 2015.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. Renewable Energy, 69: 89-96, 2014.

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

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. Biotechnology Advances, 28: 375–384, 2010.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C.; AILLAPÁN, A.; TOMASELLO, G. ZUÑIGA, M. E.



Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 3-9, 1998.

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

KLEIN, M. P.; FALLAVENA, L. P.; SCHÖFFER, J. N.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. High stability of immobilized  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95: 465 – 470, 2013.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova*, 31: 336-339, 2008.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A. R.; AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J.Ind. Microbial Biotechnology*, 23: 91-96, 1999.

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

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a reiew. *Bioresource Technology*, 57: 1-11, 1996.

SONG, Y. S.; LEE, J. H.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Performance of  $\beta$ -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilization process. *Food Chemistry*, 123: 1-5, 2010.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9: 33-40, 2001.