

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aproveitamento do soro de queijo para a produção
de lactase por *Kluyveromyces marxianus***

Rosane Rech

Porto Alegre - RS

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*

Rosane Rech

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Orientador: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Porto Alegre

Março / 1998

Dissertação defendida e aprovada, em ___ de _____ de 1998, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Maurício M. Silveira

Prof^ª. Sandra A. Furlan

Prof. Nilson R. Marcílio

Prof. Marco Antônio Z. Ayub
orientador

Agradecimentos

Aos meus pais, René e Ruth, por todo apoio, ajuda e carinho. Por me ensinarem os verdadeiros valores da vida humana, e que a educação é um deles. Sem eles certamente eu não teria chegado aqui.

Ao professor Marco Ayub, pela orientação, amizade e presença constante. Pelo seu esforço em manter os laboratórios sempre com as melhores condições de trabalho possíveis.

Ao Cristiano, cuja dedicação foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do ICTA, pela amizade e companheirismo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Adriano e aos demais colegas da Físico-Química, pela disponibilidade com que me ajudaram na parte final do trabalho.

Ao meu noivo Christian, pelo seu carinho.

Ao CNPq e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

"Estamos ingressando no século XXI, com empresas projetadas para o século XIX. O engessamento das organizações não está no winchester dos computadores, mas sim no winchester dos homens - a forma de pensamento."

M. Hammer

Aos meus pais

Sumário

Resumo.....	xiv
1 - Introdução	1
2 - Revisão Bibliográfica	2
2.1 - Soro de Queijo	2
2.1.1 - Alternativas tecnológicas para o aproveitamento do soro de queijo.....	3
2.2 - Lactose.....	4
2.2.1 - Ocorrência.....	4
2.2.2 - Propriedades	6
2.2.2.1 - Solubilidade e cristalização	6
2.2.2.2 - Poder adoçante.....	7
2.2.2.3 - Outras características físico-químicas.....	7
2.2.3 - Aspectos nutricionais.....	8
2.2.4 - Produtos de lactose hidrolisada.....	9
2.2.4.1 - Leite	9
2.2.4.2 - Doces de Leite, Leites Aromatizados e Concentrados Açucarados	9
2.2.4.3 - Leites Fermentados	10
2.2.4.4 - Queijos.....	10
2.2.4.5 - Soro de Queijo	10
2.2.5.6 - Sorvetes.....	10
2.3 - A Enzima Lactase	11
2.3.1 - Ocorrência na natureza	11
2.3.2 - Fatores que afetam a atividade enzimática	13
2.3.2.1 - pH	13

2.3.2.2 - Temperatura	13
2.3.4 - O <i>operon lac</i> : mecanismo de síntese microbiana de lactase	14
2.4 - Microrganismos produtores de lactase.....	18
2.4.1 - A produção de lactase por leveduras a partir do soro de queijo	18
2.1.2 - A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> como microrganismo experimental	19
3 - Teoria.....	21
3.1 - Cinética de crescimento celular em processo descontínuo	21
3.2 - Conversão metabólica.....	22
3.3 - Consumo de oxigênio em culturas microbianas	23
3.3.1 - Transferência de oxigênio da bolha de gás para a célula.....	24
3.3.2 - Medida do k_La - método dinâmico	25
4 - Materiais e Métodos	28
4.1 - Materiais	28
4.1.1 - Microrganismos	28
4.1.2 - Meio de cultura e condições de armazenamento para a manutenção das cepas	28
4.1.3 - Meio de cultura para fermentação.....	28
4.1.3.1 - Preparo do extrato de levedura	29
4.1.4 - Soluções tampão	29
4.1.4.1 - Tampão fosfato	29
4.1.4.2 - Tampão K	29
4.2 - Métodos de cultivo	30
4.2.1 - Esterilização.....	30
4.2.2 - Pré-inóculo.....	30
4.2.3 - Cultivo em incubadora rotatória	30
4.2.4 - Cultivo no biorreator.....	31
4.3 - Técnicas analíticas	33

4.3.1 - Medida de biomassa.....	33
4.3.2 - Açúcares totais medidos como lactose	34
4.3.3 - Concentração de etanol.....	34
4.3.4 - Atividade de lactase	35
4.3.4.1 - Cálculo da atividade de lactase.....	36
4.3.5 - Proteína solúvel	37
4.4 - Medida do k_La e do q_{O_2}	38
5 - Resultados e Discussão.....	39
5.1 - Estudo das condições de crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	39
5.1.1 - Estudo do pH inicial do meio de cultura.....	39
5.1.2 - Estudo da temperatura do meio de cultura.....	39
5.1.3 - Estudo da suplementação do soro de queijo	40
5.2 - Estudo cinético da produção de lactase em biorreator.....	41
5.3 - Crescimento em soro de queijo concentrado	43
5.4 - Cálculo do k_La e do q_{O_2}	44
5.5 - Caracterização parcial da enzima produzida.....	44
6 - Conclusões	57
7 - Perspectivas Futuras	59
8 - Referências Bibliográficas.....	61
Apêndices.....	66
Abstract	74

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do soro de queijo tipo <i>Cheddar</i>	2
Tabela 2: Composição do leite de mamíferos domésticos e experimentais.	4
Tabela 3: Solubilidade dos isômeros da lactose.....	6
Tabela 4: Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos. ...	8
Tabela 5: Possíveis fontes de β -galactosidase.	12
Tabela 6: Principais lactases comerciais e suas propriedades.....	12
Tabela 7: Alguns coeficientes de conversão metabólica.....	23
Tabela 8: Experimentos realizados em incubadora rotatória.	31
Tabela 9: Condições de operação do biorreator.....	32
Tabela 10: Curva-padrão de BSA para análise de proteína solúvel.....	38
Tabela 11: Parâmetros de fermentação calculados para o crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> em soro de queijo.	42
Tabela 12: Parâmetros de fermentação calculados para o crescimento de <i>K. marxianus</i> CBS 6556 em soro de queijo.	43
Tabela 13: Composição do soro de queijo utilizado neste trabalho.....	66
Tabela 14 a 26: Dados referentes aos gráficos das Figuras 11 a 23:	69

Lista de Figuras

Figura 1: Fórmulas estruturais da lactose (A), glicose (B), galactose (C).	5
Figura 2: Resíduos α e β da glicose.....	5
Figura 3: Tipos de mecanismos regulatórios genéticos.	16
Figura 4: Regulação do <i>operon lac</i>	17
Figura 5: Curva de crescimento em reator batelada.....	22
Figura 6: Etapas da transferência de oxigênio da bolha de ar para a célula	25
Figura 7: Curva de variação de concentração de oxigênio dissolvido para cálculo de k_La e q_{O_2} conforme o método dinâmico.	27
Figura 8: Desenho esquemático do biorreator utilizado na segunda fase dos experimentos.	32
Figura 9: Curva de calibração OD - peso-seco para cálculo de concentração de biomassa para <i>Kluyveromyces marxianus</i>	33
Figura 10: Curva de calibração para o cálculo da concentração de etanol.	35
Figura 11: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712 em incubadora rotatória. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, temperatura 30°C e agitação 200 rpm.	46
Figura 12: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 em incubadora rotatória. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, temperatura 30°C e agitação 200 rpm.	47
Figura 13: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712 em incubadora rotatória, onde T1 = 30°C e T2 = 37°C. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5 e agitação 200 rpm.	48
Figura 14: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 em incubadora rotatória, onde T1 = 30°C e T2 = 37°C. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5 e agitação 200 rpm.	49
Figura 15: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712 em incubadora rotatória, onde: M1 = soro de queijo 7%; M2 = soro de queijo 7% + uréia 1%; M3 = soro	

de queijo 7% + extrato de levedura 1%. Condições de cultivo: pH 5,5, temperatura 30°C e agitação 200 rpm.	50
Figura 16: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 em incubadora rotatória, onde: M1 = soro de queijo 7%; M2 = soro de queijo 7% + uréia 1%; M3 = soro de queijo 7% + extrato de levedura 1%. Condições de cultivo: pH 5,5, temperatura 30°C e agitação 200 rpm.	51
Figura 17: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 712 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, extrato de levedura 1%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.	52
Figura 18: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.	53
Figura 19: Crescimento da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 21%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.	54
Figura 20: Variação da atividade enzimática da lactase de <i>K. marxianus</i> CBS 6556 com a temperatura.....	55
Figura 21: Ensaio de estabilidade enzimática da lactase de <i>K. marxianus</i> CBS 6556 em temperatura ambiente (30°C).	55
Figura 22: Ensaio de estabilidade enzimática da lactase de <i>K. marxianus</i> CBS 6556 em temperatura de armazenamento: -18°C (<i>freezer</i>), -4°C (congelador) e +4°C (geladeira).	56
Figura 23: Gráfico da concentração de oxigênio contra o tempo para o cálculo do k_{La} e do q_{O_2}	68

Terminologia

Lista de símbolos e unidades

símbolo	definição	unidades
a	área da interface líquido-gás por unidade de volume do fluido	m^{-1}
A	absorbância	adimensional
A_e	atividade enzimática específica	$U.gcél^{-1}$
A_v	atividade enzimática volumétrica	$U.ml^{-1}$
A_{EtOH}	área do pico de etanol	pontos
A_{PrOH}	área do pico de <i>n</i> -propanol	pontos
C_{ONPG}	concentração de ONPG	$\mu mol.ml^{-1}$
C	concentração de oxigênio no meio de cultura	$mol.m^{-3}$
C_0, C_i	concentração de oxigênio em algum tempo específico	$mol.m^{-3}$
C^*	concentração de oxigênio em equilíbrio com a fase gasosa	$mol.m^{-3}$
ϵ_{ONPG}	coeficiente de extinção molar do ONPG	$cm^2.\mu mol^{-1}$
F	fator de diluição	adimensional
k_L	coeficiente de transferência de massa da fase líquida	$m.s^{-1}$
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida	h^{-1}, s^{-1}
L	caminho ótico	cm
μ	velocidade específica de crescimento celular	h^{-1}
m_{EtOH}	massa de etanol	g
m_{PrOH}	massa de <i>n</i> -propanol	g
N	taxa de transferência de oxigênio por unidade de volume de fluido	$mol.m^{-3}.s^{-1}$
q_{O_2}	taxa específica de consumo de oxigênio	$mgO_2.gcél^{-1}.s^{-1}$
r_X	taxa volumétrica de produção de biomassa	$g.l^{-1}.s^{-1}$

t_d	tempo de duplicação	h
V_a, V_f	volume inicial de amostra e volume final do teste	ml
X	concentração de biomassa no biorreator	g.l^{-1}
X_0	concentração inicial de biomassa no biorreator	g.l^{-1}
Y_{PS}	unidades de enzima gerada por unidade de massa de substrato consumido	U.g^{-1}
Y_{PX}	unidades de enzima gerada por unidade de massa de biomassa formada	U.g^{-1}
Y_{XS}	biomassa formada por unidade de massa de substrato consumido	adimensional

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos, em escala laboratorial, processos para o aproveitamento do soro de queijo como meio de cultura para as leveduras *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, objetivando a produção de lactase.

A primeira etapa dos experimentos foi realizada em incubadora rotatória para determinar-se as condições ideais de crescimento microbiano (pH, meio de cultura e temperatura). Os resultados desta etapa definem que o pH e a temperatura ideais de crescimento são 5,5 e 37°C, respectivamente. Quanto ao meio de cultura, definiu-se soro de queijo *in natura* (7% w/v) para a cepa CBS 6556 e soro suplementado com extrato de levedura (1% w/v) para a cepa CBS 712.

A segunda etapa dos experimentos foi realizada em biorreator aerado, utilizando-se as condições de crescimento determinadas na etapa anterior, com o objetivo de determinar a melhor cepa produtora de lactase. Ambas linhagens produziram quantidades equivalentes da enzima, sendo então escolhida, para os testes posteriores de otimização do processo e caracterização enzimática parcial, a levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, por utilizar um meio de cultura mais simples e barato.

Testou-se, então, o crescimento em soro de queijo concentrado (21% w/v), que resultou em uma maior produtividade específica de lactase pela levedura, contudo apresentou, também, maior produção de etanol, tóxico à célula.

A caracterização enzimática mostrou que a lactase produzida possui atividade enzimática máxima em torno de 37°C e que possui pouca estabilidade à temperatura ambiente (30°C) e ao armazenamento à 4°C. Durante o armazenamento nas temperaturas de -4°C e -18°C a enzima conservou sua estabilidade durante as nove semanas.

1 - Introdução

A utilização de células vivas para a geração de produtos de interesse mercadológico tem recebido crescente importância nos dias de hoje. Estima-se que no ano 2000, os produtos químicos, agrícolas e alimentos produzidos por biossíntese, que em 1990 movimentavam um mercado de US\$ 275 milhões, movimentarão cerca de US\$ 17 bilhões (Fogler,1992). Tanto microrganismos como células de mamíferos estão sendo utilizados na produção de uma variedade de produtos como insulina, a maioria dos antibióticos e polímeros. Espera-se que no futuro uma grande parte dos compostos químicos atualmente derivados do petróleo serão produzidos por células vivas. Entre as vantagens da bioconversão pode-se citar as condições amenas da biorreação (temperatura, pressão) e as altas conversões (Fogler,1992).

Dentro deste contexto, este trabalho visou o desenvolvimento de tecnologia para a utilização da levedura *Kluyveromyces marxianus* para a produção de lactase (β -galactosidase), uma enzima de grande interesse industrial que atualmente não é produzida no Brasil. Também inclui o desenvolvimento de tecnologia para o aproveitamento do soro de queijo, atualmente um subproduto da indústria de laticínios, como meio de crescimento microbiano, transformando-o em um produto de alto valor agregado e contribuindo para a redução dos custos de tratamento de efluentes da indústria de laticínios.

Mais especificamente, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um processo para o aproveitamento do soro de queijo como um meio de cultura eficiente e barato, testando o enriquecimento do soro com extrato de levedura ou uréia. Também utilizou a levedura *Kluyveromyces marxianus*, testando diferentes cepas e analisou a cinética de formação de biomassa e produção de lactase em biorreatores de bancada. Por fim, realizou-se uma caracterização parcial da enzima produzida

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Soro de Queijo

A fabricação de queijo, tanto pelos métodos tradicionais quanto pelos mais modernos, gera uma grande quantidade de soro de queijo (aproximadamente 83% do volume total de leite empregado). Este produto contém cerca da metade do extrato seco total do leite original utilizado. A Tabela 1 apresenta a composição do soro resultante da fabricação de queijo tipo *Cheddar* (Scott, 1993).

Tabela 1: Composição do soro de queijo tipo *Cheddar*.

Água	93%
Lactose	4,9%
Proteínas	1,1%
Lipídeos	0,2%
Ácido láctico	0,25%
Sais	0,6%
Sólidos totais	7,05%

Fonte: Scott, 1993. p. 316.

Devido a sua alta concentração de substâncias orgânicas, principalmente lactose (70% dos sólidos totais) e pelas proteínas (20% dos sólidos totais), o soro de queijo impõe um alto valor de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) às plantas de tratamento de efluentes, variando de 30.000 a 60.000 mg/l, dependendo do processamento utilizado na fabricação de queijos. Comparativamente, 5.000 litros de soro de queijo equivalem aos despejos gerados por 2.000 pessoas (Ponsano & Castro-Gómez, 1995).

Estima-se que a produção mundial de soro de queijo seja de 40×10^6 ton/ano (Tejayadi & Cheryan, 1995). Outra fonte estima que $3,15 \times 10^6$ ton/ano de soro de queijo sejam produzidas no Brasil (Ponsano & Castro-Gómez, 1995).

2.1.1 - Alternativas tecnológicas para o aproveitamento do soro de queijo

Parte da produção mundial de soro de queijo é tratada por ultrafiltração para a produção de concentrados protéicos. Contudo, este processo produz uma grande quantidade de permeado rico em lactose, cuja disposição ainda é um problema (Tejayadi & Cheryan, 1995). No Brasil, o soro é utilizado em sua forma original para alimentação animal (principalmente suínos) e também vem sendo processado visando a produção de soro em pó e bebidas lácteas. Entretanto, a maior parte do soro ainda é incorporada às águas residuárias de laticínios, o que, geralmente, representa um aumento no custo de produção para a maioria dos fabricantes de queijos, devido ao tratamento necessário para a redução de sua alta DBO (Ponsano & Castro-Gómez, 1995). Em vista disso, pesquisas em termos da transformação do soro de queijo para a produção de produtos de maior valor agregado têm sido feitas em todas as partes do mundo.

As enzimas, biocatalisadores utilizados em diversas indústrias, representam, em termos mundiais, um volume anual de negócios de bilhões de dólares e sua produção depende cada vez mais de fontes microbianas. A utilização do soro de queijo como substrato para propagação de biomassa representa uma excelente alternativa tecnológica para a produção de diversas enzimas largamente comercializadas, como a lactase, xilanase, lacase, pectinase e inulinase (Hewitt & GrootWassink, 1984; Bales & Castillo, 1979; Espinoza *et al.*, 1992).

2.2 - Lactose

2.2.1 - Ocorrência

A lactose (4-0- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosose) é um dissacarídeo característico do leite dos mamíferos, o que lhe valeu o apelido de “açúcar do leite”. Praticamente sua única fonte é o leite dos mamíferos. Outras fontes são raras, como constituinte de oligossacarídeos, em flores do gênero *Forsythia* e em *Sapotacea* (Wong *et al.*, 1988).

Tabela 2: Composição do leite de mamíferos domésticos e experimentais.

Mamífero	lipídeos (%)	proteínas (%)	lactose (%)	sólidos totais (%)
Boi	3,7	3,4	4,8	12,7
Homem	3,8	1,0	7,0	12,4
Carneiro	7,4	5,5	4,8	19,3
Dromedário	4,5	3,6	5,0	13,6
Cavalo	1,9	2,5	6,2	11,2
Lhama	2,4	7,3	6,0	16,2
Elefante indiano	11,6	4,9	4,7	21,9
Cachorro	12,9	7,9	3,1	23,5
Gato	4,8	7,0	4,8	17,6
Porco	6,8	4,8	5,5	18,8
Hamster dourado	4,9	9,4	4,9	22,6
Macaco <i>Rhesus</i>	4,0	1,6	7,0	15,4
Coelho	18,3	13,9	2,1	32,8
Mink	3,4	7,5	2,0	21,2

Fonte: Wong *et al.*, 1988. p. 280.

A lactose é encontrada no leite da maioria dos mamíferos, como mostra a Tabela 2. Exceções a esta regra são o leão marinho da Califórnia e outros mamíferos do Pacífico, os quais não possuem lactose nos seus leites. O leite humano é um dos que possui maior quantidade de lactose, em torno de 7%, enquanto que a quantidade média de lactose presente nos leites de

bovinos é 4,8%, que equivale a 50 a 52% dos sólidos totais do leite desnatado (Wong *et al.*, 1988).

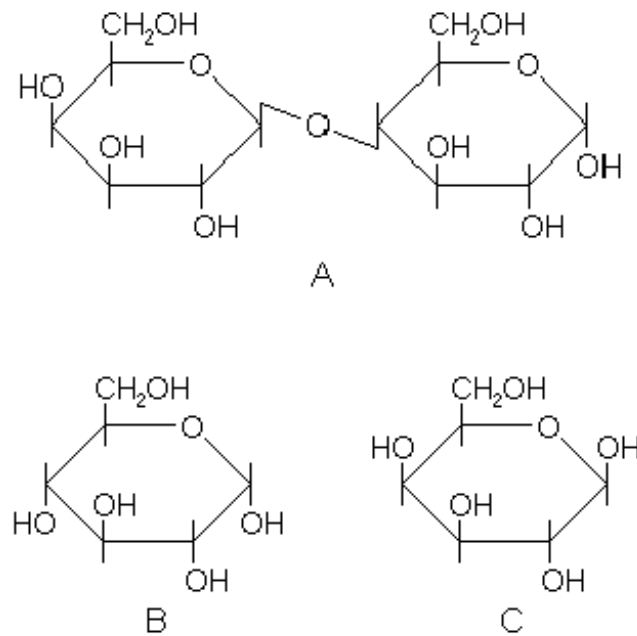


Figura 1: Fórmulas estruturais da lactose (A), glicose (B), galactose (C).

Fonte: Zadow, 1984. p. 2657.

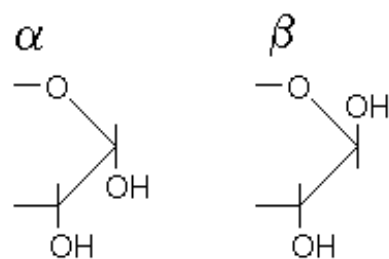


Figura 2: Resíduos α e β da glicose.

Fonte: Zadow, 1984. p. 2658.

Quando hidrolisada, a lactose gera D-glicose e D-galactose, cujas estruturas são mostradas na Figura 1. Os dois monossacarídeos estão ligados através do grupo aldeídico da

D-galactose, assim, a porção aldeídica da lactose encontra-se no resíduo de glicose. Uma configuração diferente dos substituintes do carbono 1 do resíduo de glicose dá origem a duas formas isoméricas de lactose, α e β , ilustrado na Figura 2 (Zadow, 1984).

Existe, ainda, uma série de carboidratos raros cujas estruturas diferem levemente da lactose. A epilactose, 4-0- β -D-galactopiranosil-D-manose, difere na configuração do carbono 2 do resíduo de D-glicose. A lactulose, 4-0- β -D-galactopiranosil-D-frutose, é produzida da lactose durante o processo de aquecimento e de armazenamento de laticínios (Wong *et al.*, 1988).

2.2.2 - Propriedades

2.2.2.1 - Solubilidade e cristalização

A solubilidade das formas α e β é significativamente diferente, como mostra a Tabela 3.

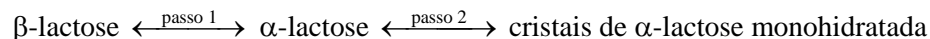
Tabela 3: Solubilidade dos isômeros da lactose

isômero	Solubilidade a 15°C
α -lactose	7 g / 100 g
β -lactose	50 g / 100 g

Fonte: Zadow, 1984. p. 2656

Quando em solução, ocorrem mudanças na configuração da lactose de modo que, no equilíbrio, tem-se uma solução com 63% da lactose na forma isomérica β (Zadow, 1984). Na cristalização de uma solução de lactose, primeiramente se formarão cristais de α -lactose. Então, parte da β -lactose mudará sua conformação para α -lactose, que continuará a cristalizar. Como resultado, ao fim da cristalização, ter-se-á, principalmente, cristais de α -lactose. O rendimento e a taxa de cristalização envolvem duas reações de equilíbrio: a cristalização de α -lactose (passo 2) e a mutorotação de β -lactose em α -lactose (passo 1). Tanto a primeira quanto a segunda

reação podem ser o passo limitante do processo, dependendo das condições. Assim, o processo de cristalização da lactose pode ser resumido pela reação (Wong *et al.*, 1988):



É importante salientar que α -lactose cristaliza como um monohidrato, enquanto que a β lactose não contém água de cristalização. Nenhuma das duas formas é higroscópica (Zadow, 1984).

2.2.2.2 - Poder adoçante

Quanto ao poder adoçante, a lactose é muito menos doce que a glicose, a galactose ou a sacarose, conforme mostra a Tabela 4. Adicionando-se a esta propriedade o problema da baixa solubilidade, a lactose não possui características para ser utilizada como adoçante (Zadow, 1984).

2.2.2.3 - Outras características físico-químicas

A utilização de lactose na indústria de alimentos advém de algumas características físico-químicas particulares. Devido a sua habilidade de carregar sabores e cores, é utilizada na fabricação de biscoitos, recheios e outros produtos de panificação. A natureza redutora da lactose aliada ao fato de que não é fermentada pelas leveduras do pão lhe conferem características únicas para ser usada na indústria de panificação. Por exemplo, a adição de lactose à massa aumenta o dourado da crosta do pão (frequentemente uma característica desejável) (Wong *et al.*, 1988).

A lactose também é utilizada como substrato para o crescimento de microrganismos, sobretudo leveduras, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, óleos, enzimas e extrato de leveduras (Brady *et al.*, 1995; Compagno *et al.*, 1995; Colomban *et al.*, 1993; Tin & Mawson, 1993; Gomez & Castillo, 1983; Mehaia & Cheryan, 1987; Maiorella & Castillo, 1984;

Floetenmeyer *et al.*, 1985; Moresi *et al.*, 1995; Espinoza *et al.*, 1992; Furlan *et al.*, 1995; Hewitt & GrootWassing, 1984).

Tabela 4: Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.

	Poder adoçante relativo	solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
sacarose	100	66	69	73
lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	—	82	87

Fonte: Zadow, 1984, p. 2658.

2.2.3 - Aspectos nutricionais

Estima-se que 70% da população mundial possui intolerância à lactose, a qual é atribuída a baixos níveis de lactase intestinal (Holsinger, 1978). Quando não há hidrólise da lactose, a mesma não é absorvida, chegando à última porção do intestino delgado e ao cólon como molécula intacta. O resultado é uma modificação da flora intestinal gerando uma excessiva produção de gases e ácido na saída de água no interior do cólon, causando distúrbios intestinais (cólicas, flatulência e diarreia) (Kardel *et al.*, 1995).

A diminuição dos níveis de lactase que ocorre gradativamente com a idade, aumenta os sintomas da intolerância, resultando em um desconforto na ingestão da lactose e levando à supressão dos produtos lácteos da dieta alimentar. Contudo, adultos que limitam ou omitem os produtos lácteos da dieta correm o risco de uma baixa ingestão de cálcio e, possivelmente,

outros nutrientes, como a riboflavinina, a tiamina, o fósforo e a vitamina A (Pivarnik *et al.*, 1995).

Estas considerações possuem sérias implicações em programas de reabilitação nutricional baseados em produtos lácteos (Holsinger, 1978).

2.2.4 - Produtos de lactose hidrolisada

2.2.4.1 - Leite

O leite hidrolisado, ou seja, o leite sem lactose, é de grande importância industrial devido sua utilização por algumas populações com intolerância à lactose. A lactose representa de 30 a 60% da energia do leite e, como outros açúcares, é vetora de sais minerais. Sua não absorção implica na utilização das proteínas do leite como fonte de energia e em perdas de cálcio e outros sais minerais. Deste modo, o pré-tratamento do leite com lactase permite uma melhor utilização do grande potencial nutritivo deste alimento, considerado, por muitos anos, como o mais perfeito fabricado pela natureza (Kardel *et al.*, 1995; Pivarnik *et al.*, 1995).

2.2.4.2 - Doces de Leite, Leites Aromatizados e Concentrados Açucarados

Nos leites aromatizados, a hidrólise prévia da lactose permite que se diminua a quantidade de açúcar (sacarose) e aromas adicionados sem que se altere o sabor final do produto.

Nos doces de leite e leites concentrados açucarados o problema é a baixa solubilidade da lactose, que leva ao aparecimento de uma textura arenosa no produto com o passar do tempo. A hidrólise da lactose nestes produtos deve variar entre 30 e 80%, contudo 20% já são suficientes para que o produto não apresente arenosidade após 120 dias de produção (Kardel *et al.*, 1995).

2.2.4.3 - Leites Fermentados

Alguns fabricantes de iogurtes realizam a hidrólise prévia da lactose, obtendo um tempo menor de fermentação, bem como um produto mais doce e com menor pós acidificação (Kardel *et al.*, 1995).

2.2.4.4 - Queijos

A hidrólise de 50% da lactose resulta em um menor tempo de fabricação e um rendimento 10% maior para os queijos do tipo *Cottage* e *Quark* (Kardel *et al.*, 1995).

2.2.4.5 - Soro de Queijo

O soro de queijo é praticamente lactose (68,75% dos sólidos totais), porém esta possui baixo poder adoçante e baixa solubilidade (18% em água a 25°C). Nestas mesmas condições a solubilidade da glicose é 50% e da galactose é 25% (Kardel *et al.*, 1995). A hidrólise da lactose pode transformar o soro oriundo das indústrias de laticínios em produtos de valor agregado como: 1) melão de lactose hidrolisada, que pode ser utilizado na produção de levedo de pão; 2) xarope de lactose hidrolisada, um substituto natural da sacarose em bebidas lácteas, compotas e geléias, entre outros produtos; 3) xarope de soro hidrolisado, utilizado na fabricação de glacês, doces e biscoitos (Baret, 1980). Para algumas destas aplicações o custo de produção deve ser competitivo com o do melão, enquanto que para outra (xaropes de lactose) procura-se competitividade com a sacarose.

2.2.5.6 - Sorvetes

A hidrólise da lactose permite que se substitua todo o leite utilizado na formulação do sorvete por soro, resultando em um produto com maior qualidade (redução do risco de formação

de cristais e aumento da facilidade de corte e cremosidade) e menor custo (Kardel *et al.*, 1995; Pivarnik *et al.*, 1995).

2.3 - A Enzima Lactase

Lactase é o nome comum dado à enzima β -galactosidase, ou mais formalmente, β -D-galactosideo-galactohidrolase (E.C.3.2.1.23)¹. Constitui-se no catalisador da reação que hidrolisa o resíduo terminal β -galactopiranosil de dissacarídeos como a lactose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$) e a lactulose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Fru}$), de oligossacarídeos livres e de glicosídeos do fenol, do 4-nitro-fenol e outras pequenas moléculas. Hidrolisa, também, α -L-arabinosídeos, contudo não hidrolisa α -D-galactosídeos (rafinose, estaquiose, galactinol, melobiose), metil- β -D-galactosídeos e β -D-galactofuranosídeos (anel com cinco carbonos) (Keeseey, 1987).

2.3.1 - Ocorrência na natureza

A lactase é largamente encontrada na natureza, distribuída entre plantas, animais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias, como mostra a Tabela 5 (Gekas & Lopez-Leiva, 1985).

Contudo, para serem utilizadas no processamento de alimentos, as enzimas devem ser provenientes de uma fonte considerada GRAS (*generally recognized as safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA. Hoje, a produção comercial de lactase parece se restringir aos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, e às leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis*. A Tabela 6 mostra uma relação das principais lactases comerciais hoje no mercado e suas características (Pivarnik *et al.*, 1995).

¹ *Enzyme Commission Code*

2.3.2 - Fatores que afetam a atividade enzimática

As propriedades da lactase variam conforme a sua fonte. O peso molecular da enzima, por exemplo, pode variar de 850.000 Daltons para a *E. coli* até 201.000 e 90.000 Daltons para a *K. marxianus* e *A. oryzae*, respectivamente. Já a temperatura e o pH ótimos de operação também diferem de acordo com a preparação comercial particular. Na imobilização, o método de imobilização e o tipo de suporte também podem influenciar estes parâmetros (Gekas & Lopez-Leiva, 1985).

2.3.2.1 - pH

O pH operacional é a característica que define a aplicação de uma dada lactase. Ele controla a atividade enzimática e influencia na estabilidade. Para o processamento de soro ácido, permeado de soro ácido ou produtos lácteos fermentados, as lactases provenientes de fungos filamentosos são mais indicadas, pois possuem o pH ótimo de operação de 3,0 a 5,0, sendo que sua faixa operacional vai de 2,5 a 6,0. Já as lactases provenientes de leveduras possuem pH ótimo próximo do neutro, e sua faixa operacional é bem mais estreita. A atividade máxima da lactase de *K. lactis* é obtida em pH 6,0 a 6,8, e de *K. marxianus* é alcançada em pH entre 6,5 e 7,0. Por este motivo possuem aplicação na hidrólise do soro doce (pH 6,1) e do leite (pH 6,6) (Gekas & Lopez-Leiva, 1985; Pivarnik *et al.*, 1995).

2.3.2.2 - Temperatura

A temperatura ótima de operação de uma lactase comercial também depende da sua origem. As lactases provenientes de fungos filamentosos possuem maior atividade e maior estabilidade a temperaturas elevadas que as lactases de leveduras. As primeiras são utilizadas nas hidrólises de lactose entre 50 e 55°C, enquanto que com as últimas ocorre a desnaturação da enzima acima de 40°C.

A faixa de temperatura operacional de maior atividade de lactase de leveduras é entre 30 e 40°C. No entanto, esta temperatura favorece o crescimento microbiano e a produção de oligossacarídeos. Assim, a hidrólise de produtos lácteos tem sido feita a temperatura de refrigeração, apesar de haver grande redução de atividade enzimática nesta temperatura (Gekas & Lopez-Leiva, 1985; Pivarnik *et al.*, 1995).

2.3.4 - O operon *lac*: mecanismo de síntese microbiana de lactase

As bactérias, assim como os eucariotos unicelulares, possuem a capacidade de responder rapidamente às mudanças do meio externo para sobreviver. A flexibilidade é uma característica do mundo microscópico. Contudo, economia também é importante. Em termos de gasto de energia, é desvantajoso ao microrganismo produzir enzimas de uma via metabólica cujo substrato está ausente. Assim, o metabolismo microbiano evita esta síntese, porém está sempre pronto a produzir as enzimas se determinado substrato tornar-se disponível.

Para explicar o mecanismo de controle genético do metabolismo microbiano, tomaremos como exemplo a bactéria *Escherichia coli*, por ser o microrganismo mais estudado.

Os genes responsáveis por uma determinada via metabólica tendem a se organizar em grupos (*operons*), assim as enzimas necessárias a esta via são representadas por genes adjacentes. Um grupo inteiro de genes adjacentes pode ser transcrito em um único mRNA (RNA mensageiro) policistrônico² e sequencialmente traduzidos pelos ribossomos nas respectivas proteínas. Esta forma de organização permite que todos os genes possam ser regulados coordenadamente pela interação de uma proteína reguladora com o sítio ao lado do gene promotor. Os mecanismos regulatórios de controle genético podem ser negativos ou positivos, como é ilustrado na Figura 3.

² mRNA policistrônico: RNA mensageiro que possui regiões codificadoras para diversas proteínas, além de outras seqüências de controle que permitem que diversas proteínas sejam traduzidas a partir de uma única molécula de mRNA.

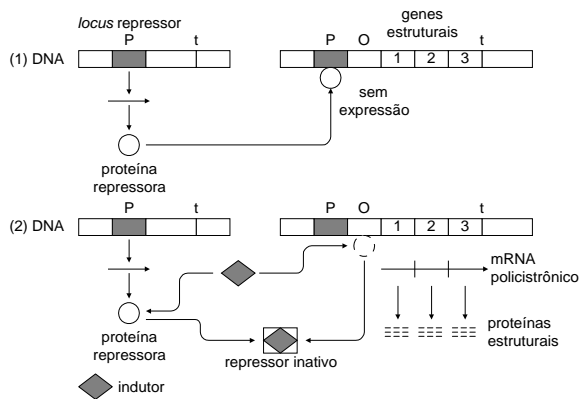
A síntese de β -galactosidase em resposta a presença de lactose é chamada de indução. Quando as células de *E. coli* crescem em ausência de lactose, o número de moléculas de β -galactosidase presentes na célula é pequeno (menor que 5). Quando a lactose torna-se disponível no meio de cultura, rapidamente a enzima é sintetizada e dentro de pouco tempo (minutos) podem existir mais de 5.000 moléculas de enzima por célula (5 a 10% da proteína solúvel da bactéria). Se a lactose é retirada do meio, a síntese da enzima pára tão rápido quanto inicia.

Como mostra a Figura 4A, o *operon* responsável pela utilização de lactose, o *operon lac*, possui três genes estruturais *lac*, *lacZYA*. O gene *lacZ* codifica a enzima β -galactosidase, que quebra a ligação β -1-4 da lactose liberando os monossacarídeos D-galactose e D-glicose. A enzima é um tetrâmero constituído de quatro subunidades idênticas chegando ao total de aproximadamente 500.000 Daltons. A entrada da lactose na célula é mediada pelo produto do gene *lacY*, a β -galactosídeo permease, uma proteína de 30.000 Daltons ligada à membrana citoplasmática. O *lacA* é o gene estrutural para a enzima β -galactosídeo transacetilase, responsável pela transferência do grupo acetil do acetil-CoA para os β -galactosídeos. Os genes promotor e regulador do *operon lac* constituem o *lacP* e o *lacO*, respectivamente. Os genes do *operon lac* são regulados por um controle negativo, isto é, são transcritos até serem “desligados” por uma proteína repressora, produto do gene *lacI*.

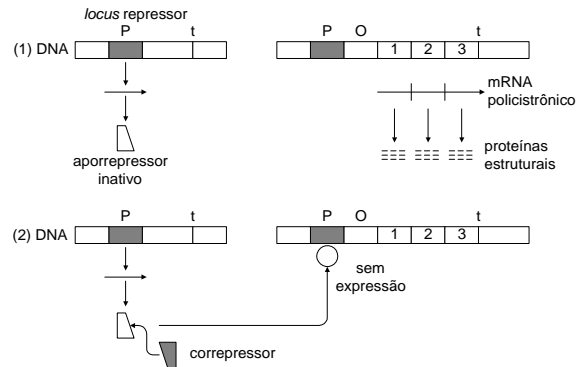
As mutações, tanto no *lacZ* quanto no *lacY* dão origem a genótipos lac^- , isto é, incapazes de utilizar a lactose. Os mutantes $lacZ^-$ não produzem β -galactosidase, impedindo diretamente o metabolismo da lactose. Já os mutantes $lacY^-$ são incapazes de utilizar a lactose do meio. Contudo, nenhum defeito é identificado nos mutantes $lacA^-$ (ausência de fenótipo)

A. Controle negativo

Operon induzido

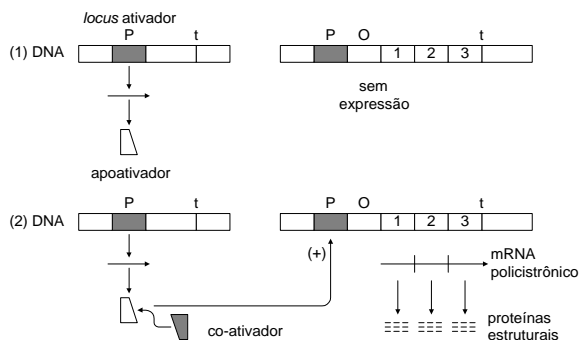


Operon repressivo



B. Controle positivo

Operon induzido



Operon repressivo

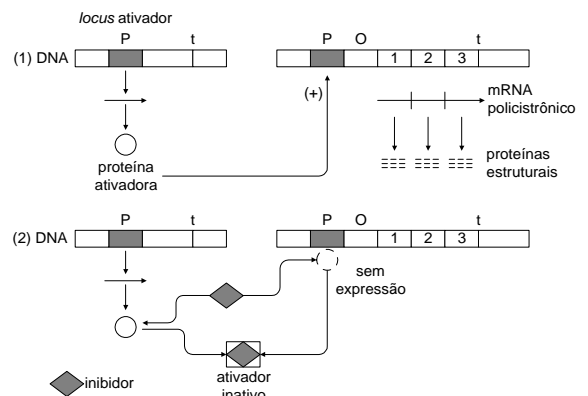


Figura 3: Tipos de mecanismos regulatórios genéticos.

(A) O mecanismo de controle negativo inclui operons induzíveis e reprimíveis. Os sistemas induzíveis envolvem uma molécula regulatória repressora que evita a transcrição dos genes estruturais até que uma molécula indutora ligue-se a esta e inative a repressão. O sistema reprimível também envolve uma proteína regulatória, contudo neste caso a molécula repressora (apo-repressora) é inativa até que uma outra molécula, co-repressora, ligue-se a esta e ative a repressão. (B) Os mecanismos de controle positivos também podem ser com operons induzíveis ou reprimíveis. Os sistemas induzíveis fazem uso de uma molécula ativadora (apo-ativador) que requer a presença de um co-ativador para iniciar a transcrição. Os sistemas reprimíveis produzem uma proteína ativadora que permite a transcrição dos genes estruturais até que uma molécula inibidora passe a atuar. (P = promotor; O = operador; t = terminador).

Fonte: Foster, 1995. p. 155.

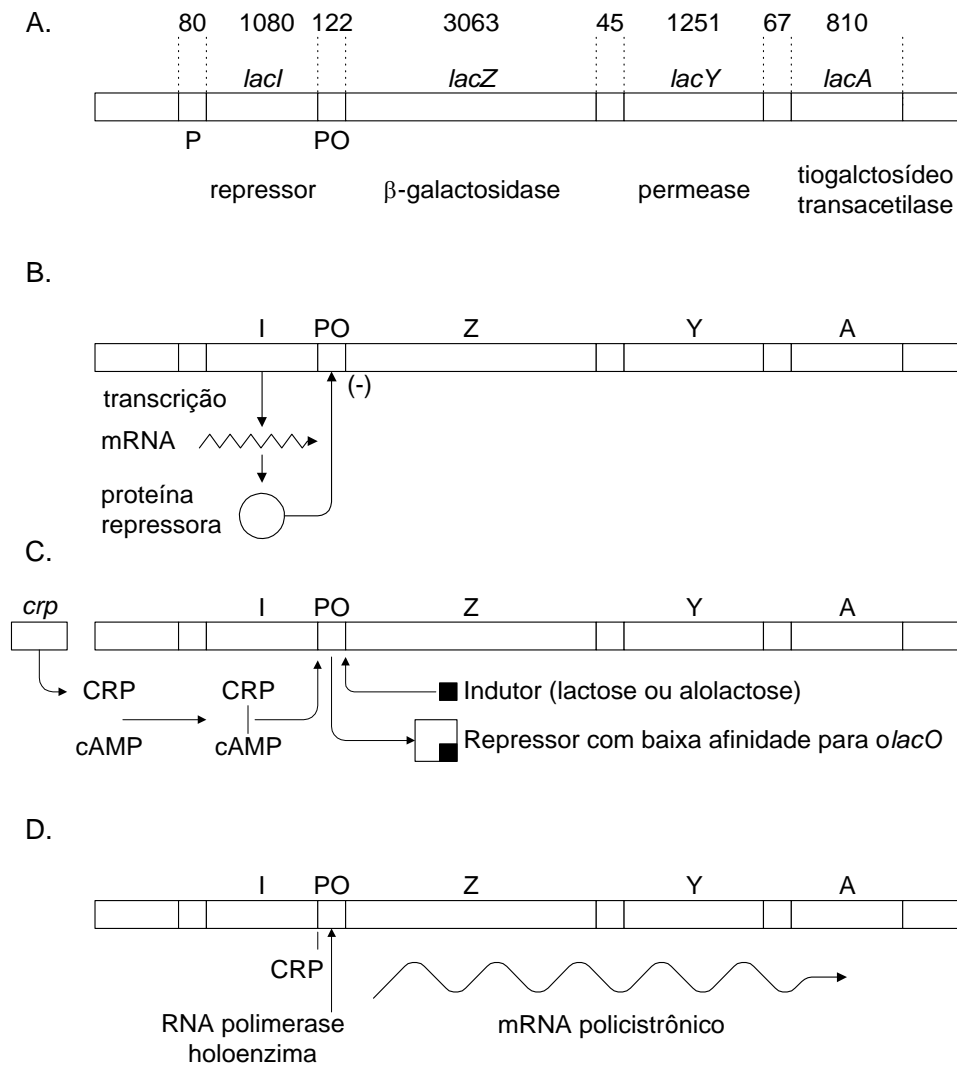


Figura 4: Regulação do *operon lac*.

(A) Organização genética e produtos do *operon lac*. Os números acima da barra horizontal indicam a quantidade de bases pareadas que compõe cada gene. (B) Transcrição e translação. O gene *lacI* produz a proteína repressora que, como um tetrâmero, liga-se na região do operador *lac* e evita a transcrição dos genes estruturais *lac*. (C e D) Na presença do indutor (lactose), este se liga e modifica alostericamente a conformação de repressor tal que este se desliga do operador. Deste modo, ocorrerá a transcrição. Sob condições de alta concentração de cAMP, este se ligará à proteína receptora de cAMP (CRP). Este complexo ligar-se-á, através de sítio específico do CRP, ao *lacP*, estimulando a ligação da polimerase e possivelmente afetando positivamente a transcrição dos genes estruturais *lac*.

Fonte: Foster, 1995. p. 157.

O mecanismo de indução do *operon lac* pela presença de lactose é mostrado nas Figuras 4B, 4C e 4D. A pequena quantidade de β -galactosidase presente constitutivamente na célula converte a lactose em alolactose (o resíduo galactosil está presente na posição 6 ao invés da posição 4 da glicose) , que é a atual molécula indutora. O repressor *lac* é uma molécula com sítios de ligação para o DNA e para o indutor. A ligação com este último modifica a conformação do repressor, tornando baixa a sua afinidade com o DNA. Uma vez que o repressor é removido do *lacO*, acontece a transcrição do *lacZYA*.

Além do seu controle regulatório negativo induzido, o *operon lac* é controlado, também, por um sistema positivo adicional. Este controle previne perdas de energia com a síntese de proteínas para utilização de lactose quando um suprimento de glicose está disponível, pois a glicose é a mais eficiente fonte de carbono e as enzimas necessárias à sua utilização estão presentes constitutivamente na célula. O controle baseia-se no fato de que quando a *E. coli* cresce em glicose, os níveis de cAMP intracelular decrescem, contudo, quando cresce em uma fonte de carbono alternativa, os níveis de cAMP aumentam.

2.4 - Microrganismos produtores de lactase

2.4.1 - A produção de lactase por leveduras a partir do soro de queijo

O número de leveduras capaz de utilizar lactose é limitado. Entre elas as mais expressivas são *Kluyveromyces marxianus* (ou *fragilis*) e *K. lactis* (Sheetz & Dickson, 1980). O mecanismo de absorção e hidrólise da lactose ocorre após o seu transporte através da parede celular, mediado pelo sistema lactose-permease. Dentro da célula o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose pela lactase. Estes açúcares são, então, metabolizados através da via glicolítica normal (Berry *et al.*, 1987). Contudo, os estudos realizados por Carvalho-Silva & Spencer-Martins (1990) mostram que a lactase (β -galactosidase) é uma enzima extracelular ligada a membrana citoplasmática. A lactose é, então, hidrolisada fora da célula resultando em

glicose e galactose que, por sua vez, são transportadas para o interior da célula por *Proton symport* ou por difusão facilitada, conforme a cepa.

No que se refere à produção industrial da lactase, a CHR. Hansen's utiliza cepas selecionadas de *K. fragilis* e comercializa a enzima sob o nome de Ha-Lactase. Já a Gist-Brocades utiliza cepas de *K. lactis* e comercializa a enzima sob o nome de Maxilact. Além destas, a Solvey do Brasil S/A e a Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda. também comercializam a enzima. Estas empresas dominaram o mercado nacional de lactase até o presente, entretanto, com a demanda crescente do setor industrial, o mercado desta enzima está em expansão no Brasil, surgindo, então, a Pfizer Neutral Lactase da Pfizer Inc..

Apesar da concorrência comercial entre estas empresas multinacionais no nosso mercado, a lactase não é produzida no Brasil e os custos de importação incidem diretamente sobre o seu preço de venda.

2.1.2 - A levedura *Kluyveromyces marxianus* como microrganismo experimental

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui características de grande interesse para processos industriais, tais como crescimento a elevadas temperaturas (40°C), diminuindo os custos de resfriamento e os riscos de contaminação, altas velocidades de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,89 \text{ h}^{-1}$), permitindo-lhe sobrepujar microrganismos contaminantes e efeito *Cabtree*³ negativo. São, também, consideradas microrganismos GRAS (*generally recognized as safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA (Furlan *et al.*, 1995).

Entre os substratos que permitem o crescimento deste microrganismo estão polissacarídeos tais como inulina, xilana e pectina, que são degradados por enzimas extracelulares. A lactose é um outro substrato passível de utilização, mas, neste caso, sua utilização é intracelular (Espinoza *et al.*, 1992).

³ Efeito *Cabtree*: repressão catabólica do metabolismo oxidativo da levedura devido à concentração de açúcares (ou outra fonte de carbono) quando esta cresce sob condições de aeração.

A versatilidade da utilização da levedura *K. marxianus* como microrganismo de interesse industrial tem sido amplamente ilustrada pela diversidade de processos industriais propostos pela literatura. Entre eles estão a produção de lactase (Mahoney *et al.*, 1974; Bales & Castillo, 1979), algumas vezes simultaneamente com inulinase (Hewitt & GrootWassink, 1984) e com pectinases (Espinoza *et al.*, 1992). Em todos estes processos destaca-se a utilização do soro de queijo ou sua fração glicídica como meio de cultura. A possibilidade de utilização desta matéria-prima - até agora um poluente da indústria de laticínios - baseia-se no fato de que as leveduras *Kluyveromyces marxianus* são capazes de metabolizar lactose, o açúcar presente no soro.

3 - Teoria

3.1 - Cinética de crescimento celular em processo descontínuo

Em um cultivo descontínuo são observadas diferentes fases na curva de crescimento celular. Estas fases são bem visíveis quando se desenha o gráfico semi-logarítmico da concentração de células viáveis contra o tempo, como é mostrado na Figura 5. Durante a fase lag, a taxa de crescimento é praticamente nula, pois as células estão se adaptando ao novo meio de cultura, sintetizando novas enzimas ou componentes estruturais. Após a fase lag, o crescimento inicia na fase de aceleração e continua durante a fase de crescimento, também denominada fase exponencial. À medida que os nutrientes do meio de cultura vão se esgotando, ou que são formados produtos inibitórios, a taxa de crescimento cai e a curva de crescimento celular entra na fase de declínio. Após este período de transição, as células entram na fase estacionária e o crescimento cessa. Algumas culturas exibem fase de morte, quando as células perdem viabilidade ou são destruídas por lise.

Durante o crescimento, a produção de biomassa é descrita pela equação:

$$r_X = \mu X \quad (1)$$

onde r_X é a velocidade de produção de biomassa com unidades de $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, X é a concentração de células viáveis, em g.l^{-1} , e μ é a velocidade específica de crescimento, com dimensão de h^{-1} . Em um sistema fechado, onde o único fator que afeta a concentração celular é o crescimento, a velocidade de crescimento é dada por:

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

Se μ for constante, substituindo-se a Equação (2) na Equação (1) e integrando-se nas condições iniciais $X = X_0$ e $t = 0$, tem-se:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

onde X_0 é a concentração de células viáveis em $t = 0$. A Equação (3) representa o crescimento exponencial. Para calcular-se μ , lineariza-se a Equação (3):

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} \quad (4)$$

O crescimento celular muitas vezes é expresso em termos de tempo de duplicação, t_d , que pode ser calculado através da Equação (4). Iniciando-se em $t = 0$, com concentração celular X_0 , em $t = t_d$ teremos $X = 2X_0$. Substituindo estes valores na Equação (4) e rearranjando, tem-se:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

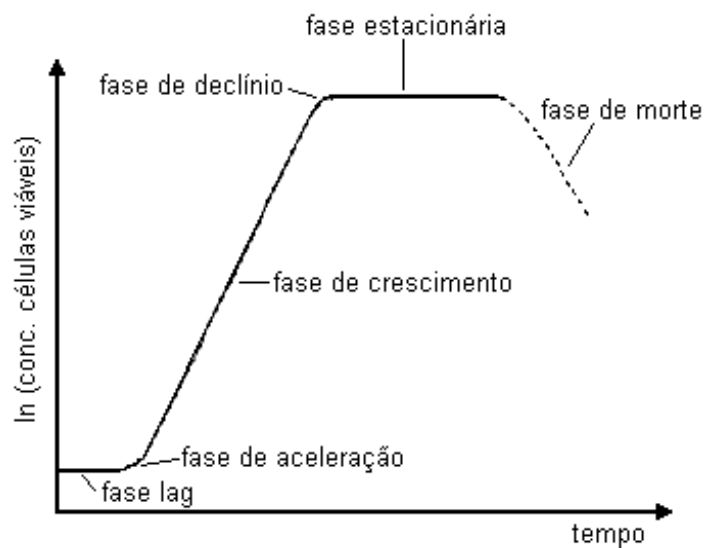


Figura 5: Curva de crescimento em reator batelada

Fonte: Doran, 1995, p. 277.

3.2 - Conversão metabólica

Alguns coeficientes de conversão metabólica, como a conversão de substrato em biomassa, de oxigênio em biomassa e de substrato em produto são bastante utilizados. Os coeficientes de conversão quantificam as características de consumo de nutrientes e as

características de produção dos microrganismos. A definição dos coeficientes de conversão pode ser generalizada na equação a seguir:

$$Y_{FG} = - \frac{\Delta F}{\Delta G} \quad (6)$$

onde Y_{FG} é o coeficiente de conversão de G em F e, G e F , são substâncias envolvidas no metabolismo. ΔF é a massa de F produzida e ΔG é a massa de G consumida.

A Tabela 7 apresenta uma lista dos coeficientes de conversão metabólicos mais freqüentemente utilizados.

Tabela 7: Alguns coeficientes de conversão metabólica.

Símbolo	Definição
Y_{XS}	biomassa formada por unidade de massa de substrato consumido
Y_{PS}	massa de produto gerado por unidade de massa de substrato consumido
Y_{PX}	massa de produto gerado por unidade de biomassa formada
Y_{XO}	biomassa formada por unidade de massa ou mol de oxigênio consumido
Y_{CS}	massa de gás carbônico formado por unidade de massa de substrato consumido
RQ	moles de gás carbônico formado por mol de oxigênio consumido
Y_{ATP}	biomassa formada por mol de ATP formado
Y_{kcal}	biomassa formada por quantidade de calor absorvido durante a fermentação

Fonte: Doran, 1995. p. 275.

3.3 - Consumo de oxigênio em culturas microbianas

O oxigênio é necessário para todas as culturas aeróbias, e manter uma concentração apropriada de oxigênio dissolvido no meio de cultura é importante para a operação eficiente do reator (Fogler, 1992). Uma expressão para a taxa de transferência de oxigênio do gás para o líquido é dada pela equação (7).

$$N = k_L a (C^* - C) \quad (7)$$

onde N é a taxa de transferência de oxigênio por unidade de volume de fluido ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$), k_L é o coeficiente de transferência de massa da fase líquida (m.s^{-1}), a é a área da interface líquido-gás por unidade de volume do fluido ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$), C é a concentração de oxigênio no meio de cultura (mol.m^{-3}), e C^* é a concentração de oxigênio no meio de cultura em equilíbrio com a fase gasosa (mol.m^{-3}), também denominada solubilidade do oxigênio no meio de cultura.

3.3.1 - Transferência de oxigênio da bolha de gás para a célula

Nas culturas aeróbias, as moléculas de oxigênio devem transpor uma série de resistências à transferência antes de serem utilizadas pela célula. O diagrama da Figura 6 apresenta oito etapas envolvidas no transporte de oxigênio do interior da bolha de gás até o interior da célula:

- i) transferência do interior da bolha para a interface gás-líquido;
- ii) movimento através da interface gás-líquido;
- iii) difusão através do filme de líquido estagnado em torno da bolha;
- iv) transporte através da massa de líquido;
- v) difusão através do filme de líquido estagnado em torno da célula;
- vi) movimento através da interface líquido-célula;
- vii) se as células estiverem em flocos ou em partículas sólidas, difusão através do sólido até a célula individual;
- viii) transporte através do citoplasma ao sítio de reação.

Se as células estão suspensas individualmente no meio de cultura, o passo (vii) desaparece.

Quando as células estão dispersas no meio de cultura e este possui mistura perfeita, a maior resistência à transferência de oxigênio é o filme líquido em torno da bolha. Conseqüentemente, o transporte de oxigênio da bolha até a célula é controlado pelo passo (iii) e a taxa de transferência de massa pode ser calculada a partir da Equação (7) (Doran, 1995).

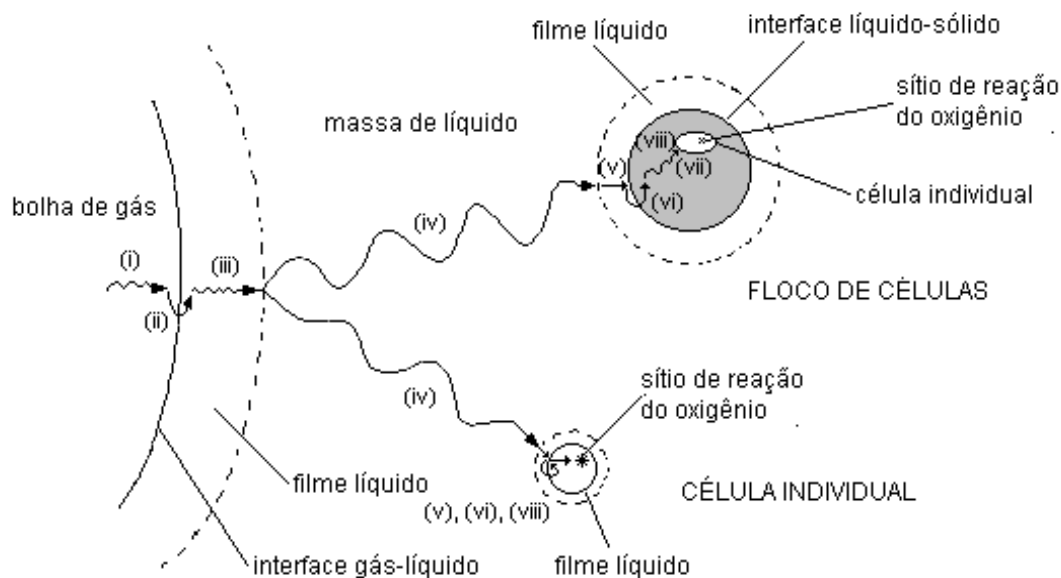


Figura 6: Etapas da transferência de oxigênio da bolha de ar para a célula

Fonte: Doran, 1995. p. 200.

No regime estacionário não há acúmulo de oxigênio em nenhum ponto do biorreator, assim a taxa de transferência de oxigênio das bolhas deve ser igual à taxa de consumo de oxigênio pelas células, resultando na Equação (8).

$$k_L a (C^* - C) = q_{O_2} X \quad (8)$$

onde q_{O_2} é a velocidade de respiração das células ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

3.3.2 - Medida do $k_L a$ - método dinâmico

O método dinâmico para medida de $k_L a$ é baseado em um balanço de massa de oxigênio em estado transiente. Existem diversas versões diferentes do método dinâmico. Neste trabalho será utilizado o método descrito por Ayub (1991).

Primeiramente tem-se um biorreator aerado em estado estacionário. Em dado instante corta-se a entrada de ar do sistema e monitora-se a queda da concentração de oxigênio no meio de cultura. Após um tempo de 20 a 60 segundos, abre-se novamente a entrada de ar do sistema.

Durante este período de tempo pode-se considerar que não há formação de biomassa no biorreator, desta forma a variação da concentração de oxigênio é descrita pela equação abaixo:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) - q_{O_2} X \quad (9)$$

Cessando o suprimento de oxigênio, temos que o primeiro termo do lado direito da Equação (9) torna-se zero, resultando em:

$$\frac{dC}{dt} = -q_{O_2} X \quad (10)$$

Deste modo, $q_{O_2} X$ pode ser facilmente obtido através da inclinação da curva do gráfico C contra t , mostrado na Figura 7. Dividindo-se o valor de $q_{O_2} X$ pela biomassa correspondente, a taxa específica de consumo de oxigênio, q_{O_2} , pode ser calculada.

A aeração é reassumida antes que a concentração de oxigênio dissolvido atinja um valor crítico (em torno de 5 a 10% da saturação), e a Equação (9) pode novamente ser utilizada para descrever o processo. Rearranjando os termos da Equação (9) obtemos:

$$\frac{dC}{dt} = \left[C^* - \left(\frac{q_{O_2} X}{k_L a} \right) - C \right] k_L a \quad (11)$$

Para um sistema particular, C^* e $\frac{q_{O_2} X}{k_L a}$ podem ser considerados constantes e agrupados:

$$C^* - \left(\frac{q_{O_2} X}{k_L a} \right) = C_i \quad (12)$$

onde C_i é a concentração de oxigênio dissolvido original do sistema em estado estacionário.

Substituindo a Equação (12) na Equação (11), obtemos:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_i - C) \quad (13)$$

integrando a Equação (12), o $k_L a$ pode ser isolado e calculado:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{t - t_0} \quad (14)$$

onde C_i , C_0 e C são diferentes valores de concentração de oxigênio dissolvido mostrados na Figura 7.

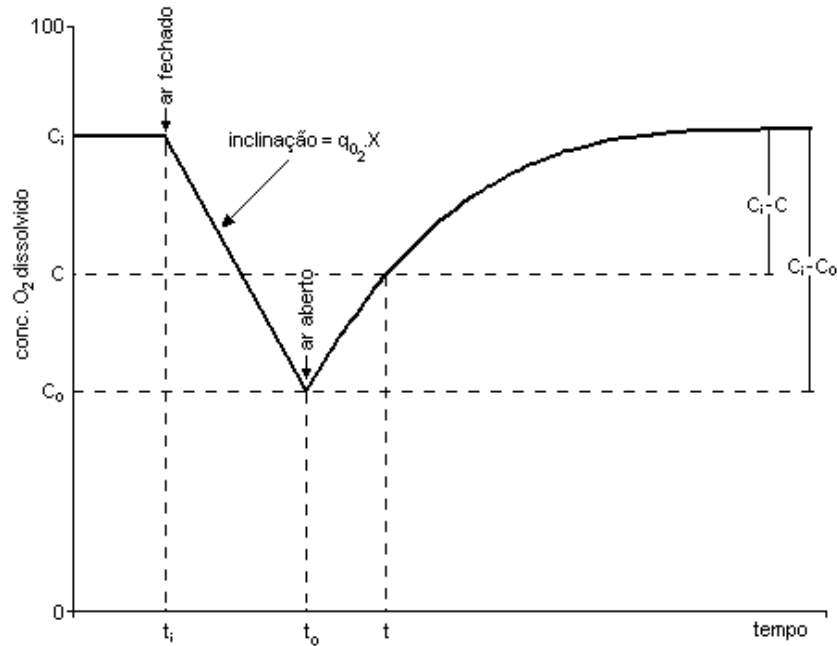


Figura 7: Curva de variação de concentração de oxigênio dissolvido para cálculo de $k_L a$ e q_{O_2} conforme o método dinâmico.

Fonte: Ayub, 1991, p. 60.

4 - Materiais e Métodos

4.1 - Materiais

4.1.1 - Microrganismos

Este trabalho utilizou duas cepas da levedura *Kluyveromyces marxianus*, CBS 712 e CBS 6556, ambas provenientes do *Centraalbureau vor Schimmelcultures* (Holanda) e fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento Biotecnológico / Joinville / SC.

4.1.2 - Meio de cultura e condições de armazenamento para a manutenção das cepas

As cepas foram mantidas a 4°C, em tubos de ensaio com ágar inclinado, contendo meio de cultura composto por extrato de levedura (3 g/l, Oxoid / Hampshire / Inglaterra), extrato de malte (3 g/l, Biobrás / Montes Claros / MG), peptona (5 g/l, Oxoid / Hampshire / Inglaterra), glicose (10 g/l, Synth / Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. / Diadema / SP) e ágar-ágar (15 g/l, Merck / Alemanha) conforme descrito por Furlan *et al.*, 1995.

4.1.3 - Meio de cultura para fermentação

Para o crescimento das leveduras utilizou-se soro de queijo em pó reconstituído (70 g/l) obtido da Elegê Laticínios S.A., extrato de levedura (aproximadamente 10 g/l de proteína solúvel), produzido no próprio laboratório, e uréia (10 g/l, Synth / Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. / Diadema / SP). Para as fermentações no biorreator utilizou-se como anti-espumante polioxietileno-polioxipropileno co-polímeros, Mazu DF 800 S (1 ml/l, Mazer Chemicals Ltd. / Inglaterra).

Antes de ser utilizado nas fermentações, o soro de queijo sofreu um pré-tratamento com Alcalase 2,4L (1 ml/l, Novo Nordisk A/S / Dinamarca), pH 8,5 e temperatura de 55°C por 3 horas. Este tratamento possui o objetivo de hidrolisar as proteínas presentes no soro, evitando a precipitação destas durante o processo de esterilização por autoclavagem do meio de cultura.

4.1.3.1 - Preparo do extrato de levedura

Neste trabalho utilizou-se extrato de leveduras obtido do seguinte modo: suspendeu-se 100 g/l de levedura *Saccharomyces cerevisiae* seca (Produtos Alimentícios Fleischmann Royal / Rio de Janeiro / RJ) em tampão fosfato pH 7,0. As leveduras foram, então, submetidas à autólise por temperatura durante 24 horas a 55°C. Imediatamente centrifugou-se (Centrífuga Janetzki K 60 / Heinz Janetzki / Alemanha) a suspensão durante 20 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante constitui o extrato de leveduras diluído que foi caracterizado determinando-se a quantidade de proteína solúvel presente.

4.1.4 - Soluções tampão

4.1.4.1 - Tampão fosfato

Para lavagem das células, utilizou-se um tampão fosfato - pH 7,0, constituído por fosfato de sódio monobásico (1,794 g/l) cujo pH foi corrigido com uma solução de hidróxido de sódio 5 M. Ambos os reagentes são da marca Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ.

4.1.4.2 - Tampão K

Para análise enzimática de lactase, utilizou-se tampão K - pH 7,6, composto por fosfato de potássio monobásico (1,65 g/l), fosfato de sódio dibásico dihidratado (11,58 g/l), cloreto de magnésio hexahidratado (0,215 g/l) e β -mercaptoetanol (3,67 g/l). O ajuste de pH foi feito com

uma solução de hidróxido de potássio 11 M. Todos os reagentes são da marca Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ.

4.2 - Métodos de cultivo

4.2.1 - Esterilização

Todos os equipamentos, meios de cultura e vidrarias utilizados foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix Equipamentos Científicos / Araraquara / SP) por 15 minutos, a 121°C e 1 atm.

4.2.2 - Pré-inóculo

Colônias isoladas de levedura foram assepticamente transferidas a um frasco Erlenmeyer aletado de 300 ml contendo 50 ml de meio de cultura. O frasco foi, então, incubado em incubadora rotatória (mod. NT711 / Nova Técnica Equipamentos para Laboratórios / Piracicaba / SP) a 200 rpm por 15 a 20 horas. O meio e as condições de cultivo utilizados no pré-inóculo foram sempre os mesmos do experimento para o qual este foi preparado.

4.2.3 - Cultivo em incubadora rotatória

A primeira fase dos experimentos foi realizada em incubadora rotatória (mod. NT711 / Nova Técnica / Piracicaba / SP), com o objetivo de determinar as condições ótimas de crescimento microbiano (meio de cultura, pH e temperatura) para ambas as cepas de *Kluyveromyces marxianus* utilizadas.

O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer aletados de 300 ml, com 50 ml de meio de cultura. Os frascos foram inoculados com o volume de pré-inóculo necessário para uma concentração celular inicial entre 0,05 e 0,1 g/l. Os frascos foram incubados a 200 rpm por 24

horas. Nos tempos de 5, 10 e 24 horas de fermentação foram retirados dois frascos de cada experimento, onde mediu-se a quantidade de biomassa, de açúcares totais e o pH do meio.

A Tabela 8 mostra os experimentos realizados nesta fase da pesquisa.

Tabela 8: Experimentos realizados em incubadora rotatória.

nº:	Microrganismo	meio de cultura	pH	temperatura
1	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Soro de queijo 7%	4,5	30 °C
2	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Soro de queijo 7%	5,5	30 °C
3	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Soro de queijo 7% + uréia 1%	5,5	30 °C
4	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	S. de queijo 7% + ext. de levedura 1%	5,5	30 °C
5	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Soro de queijo 7%	5,5	37 °C
6	<i>K. marxianus</i> CBS 712	Soro de queijo 7%	4,5	30 °C
7	<i>K. marxianus</i> CBS 712	Soro de queijo 7%	5,5	30 °C
8	<i>K. marxianus</i> CBS 712	Soro de queijo 7% + uréia 1%	5,5	30 °C
9	<i>K. marxianus</i> CBS 712	S. de queijo 7% + ext. de levedura 1%	5,5	30 °C
10	<i>K. marxianus</i> CBS 712	Soro de queijo 7%	5,5	37 °C

4.2.4 - Cultivo no biorreator

A segunda fase dos experimentos, realizada no biorreator, possuiu o objetivo de analisar a cinética de crescimento microbiano para ambas a cepas nas condições de cultivo selecionadas anteriormente. Calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento, o tempo de duplicação e os fatores de conversão. Também destinou-se à escolha da melhor cepa produtora de lactase e a otimização da produção da enzima.

Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de tanque agitado (New Brunswick Scientific Co./ New Brunswick / N.J. / USA) cujo esquema é mostrado na Figura 8.

O biorreator consiste em um vaso cilíndrico de vidro com volume de 2 litros, fechado por uma tampa de aço-inoxidável com portas para entrada de inóculo, saída de amostra, entrada

e saída de gás, para termômetro e termostato. O controle de temperatura é feito por uma serpentina interna, onde circula água de aquecimento/refrigeração. Dentro do reator, quatro aletas posicionadas radialmente e o sistema de agitação, constituído por duas turbinas *Rushton*, proporcionam uma eficiente mistura e aeração do meio de cultura. A Tabela 9 mostra as condições de operação do biorreator.

A coleta de amostras para análise de biomassa, açúcares totais, lactase, etanol e pH foi feita periodicamente utilizando-se a saída de amostra do biorreator. Uma porção inicial de amostra foi sempre descartada e, após, foi recolhida a quantidade requerida de amostra.

Tabela 9: Condições de operação do biorreator.

Volume útil.....	1,5 l
Velocidade de agitação.....	500 rpm
Vazão de ar.....	2 vvm
anti-espumante	1,5 ml

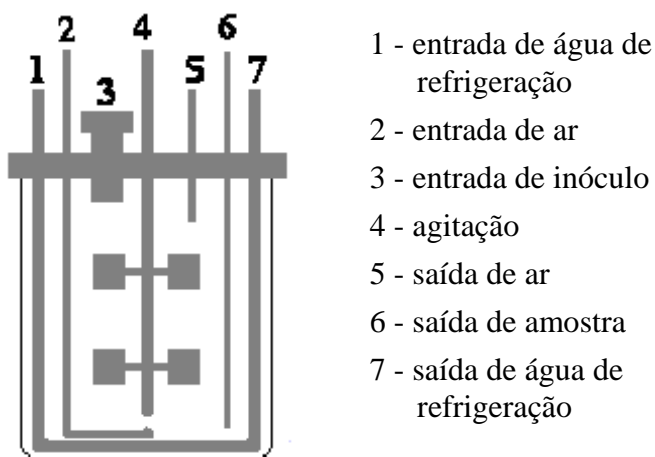


Figura 8: Desenho esquemático do biorreator utilizado na segunda fase dos experimentos.

4.3 - Técnicas analíticas

4.3.1 - Medida de biomassa

A análise de biomassa durante as fermentações foi feita por densidade ótica, conforme descrito à seguir.

Recolheu-se entre 0,25 e 1,0 ml (conforme a diluição necessária) de amostra da cultura em tubo Eppendorf. Centrifugou-se em centrífuga de bancada para Eppendorf 5410 (Brinkmann Instruments Inc. / Alemanha) a 14.000 rpm, por 3 minutos e desprezou-se o sobrenadante. As células então foram lavadas duas vezes com tampão fosfato gelado, ou até o sobrenadante apresentar-se límpido, e ressuspendidas em 1,0 ml do tampão. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV/visível (CG-UV 8000 / CG Analítica / São Paulo / SP) a $\lambda = 620$ nm.

O cálculo final da concentração celular foi feito conforme a curva de calibração feita com peso-seco, mostrada na Figura 9.

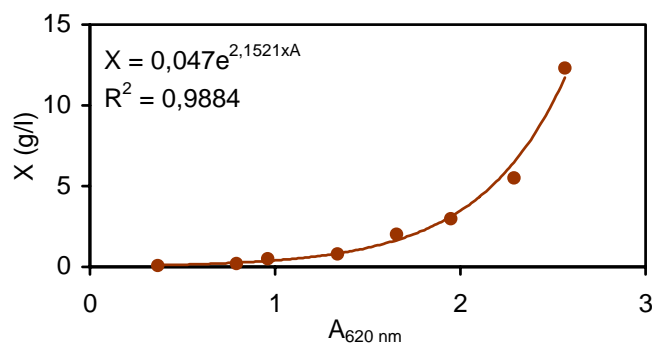


Figura 9: Curva de calibração OD - peso-seco para cálculo de concentração de biomassa para *Kluyveromyces marxianus*.

Para o peso-seco, recolheu-se, em tubo de centrífuga, 10 ml de amostra e centrifugou-se por 20 minutos (Centrifugador Excelsa 2 / Fanem Ltda.). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em água destilada gelada. Filtrou-se a suspensão em suporte de

filtração SM 16.510 (Sartorius / Goettingen / Alemanha), com membrana com tamanho de poro 0,45 µm (Millipore / São Paulo / SP) previamente pesada, lavando-se cinco vezes o tubo de centrífuga e duas vezes a membrana com água destilada. Secou-se em forno de microondas a 700 W por 20 minutos ou até massa constante.

4.3.2 - Açúcares totais medidos como lactose

A análise de açúcares totais medidos como lactose foi realizada através do método fenol-ácido sulfúrico, descrito por Barale (1985).

Para análise do soro de queijo, primeiramente realizou-se a diluição necessária das amostras (1:100) e depois procedeu-se o teste da seguinte maneira: em um tubo de ensaio colocou-se 100 µl de amostra diluída, 700 µl de água destilada, 48 µl de solução de fenol 80% e 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, ambos os reagentes da marca Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ. Após agitar e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro UV/visível (CG-UV 8000 / CG Analítica / São Paulo / SP) a $\lambda = 490$ nm. Para o branco, foi feito o mesmo procedimento colocando-se água destilada em lugar da amostra.

Juntamente com a análise realizou-se sempre a curva de calibração com concentrações de lactose (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. / Rio de Janeiro / RJ) entre 10 e 60 mg/l.

4.3.3 - Concentração de etanol

A concentração de etanol presente no meio de cultura foi determinada através de cromatografia em fase gasosa. Utilizou-se cromatógrafo a gás (Varian Star 3400 CX / EUA) com coluna cromatográfica capilar LM-100 (L&M / São Carlos / SP) com 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O cromatógrafo foi programado da seguinte

forma: injetor à 250°C; detector à 250°C; coluna à 50°C por dois minutos, seguido de aquecimento até 200°C à taxa de 5°C/min, totalizando 32 minutos de análise.

Para quantificar o etanol detectado, realizou-se uma curva de calibração com soro de queijo, diferentes quantidades de etanol e uma quantidade fixa de *n*-propanol, como padrão. A curva de calibração, mostrada na Figura 10, foi construída com os dados de $\frac{m_{EtOH}}{m_{PrOH}}$ e $\frac{A_{EtOH}}{A_{PrOH}}$, onde m_{EtOH} é a massa de etanol presente na amostra, m_{PrOH} é a massa de *n*-propanol presente na amostra, A_{EtOH} é a área do pico de etanol, A_{PrOH} é a área do pico de *n*-propanol. Em cada amostra a ser analisada adicionou-se uma quantidade conhecida de *n*-propanol.

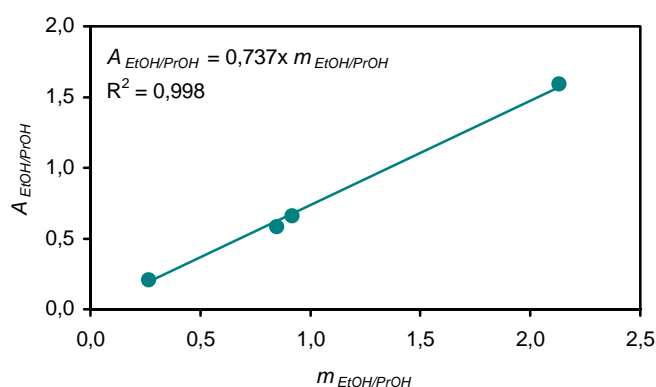


Figura 10: Curva de calibração para o cálculo da concentração de etanol.

4.3.4 - Atividade de lactase

A determinação da atividade de lactase foi feita através do método do ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) descrito por Lederberg, 1950.

Em tubo de Eppendorf colocou-se 780 μ l de tampão K e 110 μ l de amostra contendo a enzima (diluir se necessário) e deixou-se as amostras por 10 minutos em banho-maria (Cole-Parmer Instrument Company / Vermon Hills / Illinois / EUA) a 30°C para equilibrar a

temperatura. Depois, adicionou-se 110 μl de ONPG 35 mM (Sigma / St. Louis / EUA). Após 1 minuto a reação foi interrompida com 220 μl de Na_2CO_3 1M (Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV/visível (CG-UV 8000 / CG Analítica / São Paulo / SP) a $\lambda = 405$ nm. Para o branco, foi feito o mesmo procedimento colocando-se água destilada em lugar da amostra.

4.3.4.1 - Cálculo da atividade de lactase

Para o cálculo de atividade lactase utiliza-se a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{ONPG} \cdot L \cdot C_{ONPG} \quad (15)$$

onde A é a absorbância da amostra lida contra um branco, ε_{ONPG} é coeficiente de extinção molar do ONPG ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), L é o caminho ótico (cm) e C_{ONPG} é a concentração de ONPG ($\mu\text{mol}/\text{ml}$). Considerando que, no volume final do teste, há sempre uma diluição da amostra contendo a enzima, tem-se um fator de diluição V_a/V_f , onde V_f é o volume final do teste e V_a é o volume inicial da amostra. Se a amostra for diluída ou concentrada antes do teste, deve-se multiplicar por este fator (F):

$$C_{ONPG} = \frac{A \cdot V_f}{\varepsilon_{ONPG} \cdot L \cdot V_a} \times F \quad (16)$$

A atividade enzimática volumétrica é dada por:

$$A_v = \frac{C_{ONPG}}{t} \quad (17)$$

onde t é o tempo de reação dado em minutos e A_v é atividade enzimática volumétrica em U_{ONPG}/ml . A unidade de ONPG, U_{ONPG} , é definida como a quantidade de μmoles de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação.

No caso da lactase, temos que $t = 1$ min, $V_f = 1,22$ ml, $V_a = 0,11$ ml, $\varepsilon_{ONPG} = 3,1$ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ e $L = 1$ cm. Então a atividade volumétrica fica:

$$A_v = 3,576 \cdot A \cdot F \quad (18)$$

A atividade específica da enzima é:

$$A_e = \frac{A_v}{X} \quad (19)$$

onde A_e é a atividade específica da enzima dada em $U_{\text{ONPG}}/\text{mg}$ de células e X é a concentração celular no fermentador dada em $\text{mgcél}/\text{ml}$.

4.3.5 - Proteína solúvel

As análises de proteína solúvel, feitas no extrato de leveduras, foram realizadas conforme o método descrito por Révillion *et al.* (1995).

Primeiramente, preparou-se as seguintes soluções:

- a) Solução Padrão de BSA (500 mg/l): 0,050 g de BSA, Bovine Serum Albumine (Sigma / St. Louis / EUA), em 100 ml de água destilada.
- b) Solução A: 0,250 g de Sulfato de Cobre I pentahidratado e 0,500 g de Citrato de Sódio em 50 ml de água destilada. Ambos reagentes da marca Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ.
- c) Solução B: 2 g de Hidróxido de Sódio e 10 g de Carbonato de Sódio em 500 ml de água destilada. Ambos reagentes da marca Reagen / Quimbrás Indústrias Químicas do Brasil S.A. / RJ.
- d) Solução C: 1 ml de Solução A e 50 ml de Solução B
- e) Solução D: solução de Fenol de Folin-Ciocalteau 2N (Merck / Alemanha) com água destilada (1:1).

A curva-padrão para a análise foi feita conforme descrito da Tabela 10. Para as amostras, realizou-se a diluição necessária e adicionou-se 2,5 ml de solução C. Após misturar os reagentes e incubar por 5 a 10 min à temperatura ambiente, adicionou-se 250 μl de solução D com rápida agitação. Incubou-se por 20 min à temperatura ambiente e fez-se a leitura da

absorbância em espectrofotômetro UV/visível (CG-UV 8000 / CG Analítica / São Paulo / SP) a $\lambda = 750 \text{ nm}$.

Tabela 10: Valores para montagem da curva-padrão de BSA para análise de proteína solúvel.

n ^o	Conc. Prot. (mg/l)	Sol. BSA (μl)	H ₂ O dest. (μl)	Sol. C (ml)
0	0	0	500	2,5
1	100	100	400	2,5
2	200	200	300	2,5
3	300	300	200	2,5
4	400	400	100	2,5
5	500	500	0	2,5

4.4 - Medida do k_{LA} e do q_{O_2}

Para o cálculo do k_{LA} e do q_{O_2} utilizou-se um biorreator de 2,5 l (Biostat B / B Braun Biotech International / Alemanha) similar ao biorreator descrito na seção 4.2.2, dotado de um eletrodo polarográfico de oxigênio dissolvido (O₂-sensor 12/220 / Mettler-Toledo / Alemanha). O cultivo foi realizado em soro de queijo (2 l) com anti-espumante (2 ml), agitação de 500 rpm e aeração de 2 vvm. A medida do k_{LA} e do q_{O_2} foi feita quando a concentração de oxigênio dissolvido no reator estava em torno de 50% da saturação e a concentração de biomassa era 0,44 g.l⁻¹. O experimento foi realizado conforme descrito na seção 3.3.2.

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Estudo das condições de crescimento de *Kluyveromyces marxianus*

5.1.1 - Estudo do pH inicial do meio de cultura

Este estudo comparou o crescimento das leveduras *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e CBS 6556 em soro de queijo reconstituído com pH 4,5 e 5,5. As curvas de crescimento, ilustradas nas Figuras 11 e 12, mostram que o pH inicial 5,5 possibilita melhor velocidade inicial de crescimento para as cepas testadas. Este resultado está de acordo com o trabalho publicado por Furlan *et al.* (1995).

5.1.2 - Estudo da temperatura do meio de cultura

A fim de determinar-se a melhor temperatura de crescimento das leveduras, realizou-se fermentação em soro de queijo a 30 e 37°C.

Conforme as Figuras 13 e 14, que ilustram o crescimento das cepas CBS 712 e CBS 6556 respectivamente, observa-se que não há diferença significativa de produção de biomassa entre as temperaturas de 30 e 37°C. Estes resultados mostram que as duas cepas de *Kluyveromyces marxianus* testadas neste experimento são termotolerantes, uma grande vantagem em termos industriais e que possibilita, também, a obtenção de enzimas mais resistentes à temperatura. Estes resultados contrariam as observações feitas por Furlan *et al.* (1995) para as mesmas cepas, que determinam 30°C como melhor temperatura de crescimento e que conclui que o aumento da temperatura desfavorece, em geral, o crescimento.

5.1.3 - Estudo da suplementação do soro de queijo

Este experimento testou o crescimento das leveduras em soro de queijo à 7% (M1), suplementado com uréia 1% (M2) ou com extrato de levedura 1% (M3).

Os resultados, ilustrados nas Figuras 15 e 16, mostram que as leveduras apresentam pouco crescimento em soro de queijo suplementado com uréia (M2). Este resultado talvez se deva à forte alcalinização do meio de cultura para pH 8,5 durante o processo de autoclavagem. Em consequência do fraco crescimento, o consumo de açúcares foi praticamente nulo para ambas as cepas.

As curvas também mostram que o maior crescimento ocorre em soro de queijo suplementado com extrato de leveduras (M3), concordando com resultados publicados anteriormente (Sonawat *et al.*, 1981; Wendorff *et al.*, 1970), onde o extrato de levedura apresenta um efeito positivo no crescimento das cepas de *Kluyveromyces marxianus* testadas (também denominada *Kluyveromyces fragilis* ou *Saccharomyces fragilis*). No meio M3 as leveduras consomem todo o substrato (açúcares) presentes no meio de cultura. Comparando-se o meio M3 com o meio M1, as cepas CBS 712 e CBS 6556 apresentam, no meio M3, crescimento 64% e 92% maior, respectivamente.

Em relação ao meio M1, as cepas testadas apresentam diferentes comportamentos quanto a curva de consumo de açúcares. A cepa CBS 712 cessa seu crescimento mesmo com 30 g/l de substrato ainda presentes no meio de cultura. Este resultado leva a crer que falta ao soro de queijo algum nutriente essencial à cepa CBS 712 existente no extrato de leveduras. Já a cepa CBS 6556 consome todos os açúcares presentes no meio quando cresce em soro de queijo puro. Este comportamento mostra que, para ela, o soro de queijo é um meio rico e completo, contendo os nutrientes necessários para suportar o crescimento desta levedura.

Estes resultados também mostram que existe uma grande diferença fisiológica entre as cepas testadas.

5.2 - Estudo cinético da produção de lactase em biorreator

Nesta etapa dos experimentos analisou-se o crescimento das leveduras em biorreator aerado objetivando a produção de lactase. As condições utilizadas no crescimento das leveduras foram determinadas na etapa anterior: pH 5,5, temperatura de 37°C e soro de queijo *in natura* para a cepa CBS 6556 e suplementado com extrato de levedura para a cepa CBS 712.

Ambas leveduras não apresentaram diferença significativa entre os crescimentos a 30 e 37°C, deste modo, a escolha da temperatura para o cultivo em biorreator foi feita com vista nas vantagens econômicas e industriais de uma temperatura mais alta (menor custo de resfriamento e menor risco de contaminação).

Com base nos resultados apresentados no item 5.1.3, o meio M1 (soro de queijo) foi escolhido para realizar-se o crescimento da cepa CBS 6556 em biorreator, pois é um meio barato e suficientemente rico para suportar o crescimento da cepa. Já para a cepa CBS 712, escolheu-se o meio M3 (soro de queijo com extrato de leveduras), pois o meio M1 não apresentou-se adequado para esta levedura.

O crescimento das leveduras em biorreator é mostrado nas Figuras 17 e 18. Os resultados referentes ao crescimento de biomassa mostram que ambas as cepas atingem o final da fase exponencial de crescimento após, aproximadamente, 11 horas de cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{máx}$, o tempo de duplicação, t_d , os fatores de conversão de lactose em biomassa, Y_{XS} , de biomassa em produto, Y_{PX} , e de substrato em produto, Y_{PS} , calculados ao final da fase exponencial de crescimento, são mostrados na Tabela 11.

Comparando-se os dados da Tabela 11, observa-se que a cepa CBS 712 apresenta os valores de Y_{XS} e Y_{PS} mais de duas vezes maior que a cepa CBS 6556. Quanto à atividade específica de lactase, Y_{PX} , ambas as cepas não apresentam grande diferença no valor deste parâmetro. A cepa CBS 6556, quando comparada à cepa CBS 712, apresenta a vantagem de crescer em um meio de cultura mais barato e possuir maior velocidade específica de crescimento.

Tabela 11: Parâmetros de fermentação calculados para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo para 11 horas de fermentação.

Cepa	CBS 712	CBS 6556	unidades
$\mu_{máx}$	0,49	0,61	h^{-1}
t_d	1,42	1,15	h
Y_{XS}	0,707	0,287	g cél / g lactose
Y_{PX}	458,5	441,8	U_{ONPG} / g cél
Y_{PS}	333,8	129,7	U_{ONPG} / g lactose

Olhando-se as Figuras 17 e 18, observa-se um comportamento semelhante entre as cepas testadas com relação a curva de atividade específica de lactase. A curva apresenta dois picos bem distintos no início e no final da fase exponencial de crescimento microbiano. Já a curva de atividade volumétrica de lactase acompanha a curva de crescimento microbiano. É importante salientar que durante a fase estacionária de cultivo, a atividade de lactase permanece aproximadamente constante, apresentando até um leve crescimento para a cepa CBS 6556. Este resultado é diferente do que observaram Mahoney *et al.* (1974) para *Kluyveromyces marxianus* e Gonzales-Siso (1994) para *Kluyveromyces lactis*, onde a atividade de lactase cai após atingida a fase estacionária de crescimento. Este fato sugere que as enzimas produzidas por estas cepas, nas condições deste trabalho, são mais resistentes à desnaturação quando comparadas às estudadas pelos autores acima citados.

Nas curvas de atividade de lactase apresentadas, observa-se uma pequena queda nas curvas a partir de 25 horas de fermentação. Nestes pontos ocorreram problemas com a aeração do biorreator. Na curva referente à cepa CBS 6556, após restabelecida a aeração, a atividade enzimática voltou ao normal. Este resultado sugere uma relação direta entre a capacidade respiratória da levedura e a produção de lactase.

Observando-se os gráficos de atividade volumétrica de lactase das figuras 17 e 18

5.3 - Crescimento em soro de queijo concentrado

Para tentar a otimização do processo produtivo de lactase, testou-se o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em soro de queijo concentrado a 21% de sólidos totais, mostrado na Figura 19. A Tabela 12 compara os parâmetros de crescimento e as conversões obtidas para o crescimento desta cepa em soro de queijo 7% e 21%.

Tabela 12: Parâmetros de fermentação calculados para o crescimento de *K. marxianus* CBS 6556 em soro de queijo para 11 horas (soro 7%) e 14,6 horas (soro 21%) de fermentação.

cepa	Soro 7%	Soro 21%	Unidades
$\mu_{máx}$	0,61	0,65	h^{-1}
t_d	1,15	1,08	H
Y_{XS}	0,287	0,320	g cél / g lactose
Y_{PX}	441,8	480,3	U_{ONPG} / g cél
Y_{PS}	129,7	156,1	U_{ONPG} / g lactose

Com vista na Tabela 12, observa-se que os parâmetros calculados não apresentam diferenças significativas para os dois meios de cultura testados. Já a Figura 19 mostra que, quando a levedura atinge concentração celular de 30 g/l, cessa o crescimento, apesar de existirem 60 g/l de substrato ainda presentes no meio de cultura após 30 horas de cultivo. Este fato provavelmente acontece devido à alguma deficiência nutricional do soro de queijo, pois a formação de etanol não atinge valores prejudiciais ao crescimento.

5.4 - Cálculo do k_{La} e do q_{O_2}

Para uma melhor caracterização da cepa CBS 6556 e do meio de cultura, mediu-se a velocidade de respiração da levedura, q_{O_2} , e a taxa volumétrica de transferência de oxigênio da bolha de ar até a célula, k_{La} . Ambos coeficientes foram medidos em cultivo batelada em soro de leite, na fase exponencial de crescimento microbiano, quando a concentração celular no biorreator era igual a $0,44 \text{ g.l}^{-1}$. O experimento resultou em $q_{O_2} = 0,14 \text{ mgO}_2.\text{gcél}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $k_{La} = 0,015 \text{ s}^{-1}$.

Devido à ausência de dados de literatura referentes a estas medidas, não é possível realizar comparações. Contudo, segundo Doran (1995), valores típicos de k_{La} em fermentadores industriais variam entre $0,02$ e $0,25 \text{ s}^{-1}$, levando-nos a concluir que o valor do k_{La} obtido nesta fermentação está abaixo do que seria desejável.

Contudo, sabe-se que o valor k_{La} é profundamente dependente da geometria do biorreator e, considerando-se o fato que o cálculo do k_{La} foi realizado em um biorreator diferente do utilizado para a obtenção dos dados publicados nas Figuras 17, 18 e 19 deste trabalho, é importante salientar que o valor obtido para este parâmetro é apenas indicativo da ordem de grandeza do valor real do k_{La} das fermentações realizadas.

5.5 - Caracterização parcial da enzima produzida

A lactase produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foi testada com relação à variação da sua atividade enzimática com a temperatura e a sua estabilidade em temperatura de armazenamento (4°C , -4°C e -18°C). Utilizou-se a enzima produzida em soro de queijo 7% e temperatura de 37°C .

O gráfico mostrado na Figura 20 mostra a variação da atividade enzimática da lactase com a temperatura. Percebe-se nitidamente que a maior atividade enzimática ocorre em torno da temperatura de 37°C , a temperatura de produção da enzima, sendo que acima de 40°C a

atividade enzimática cai drasticamente. Este resultado mostra que a lactase produzida pela *K. marxianus* CBS 6556 é menos ativa a altas temperaturas que a lactase produzida pela cepa IBM3 que apresenta atividade relativa máxima entre 45 e 50°C, conforme publicado por Brady *et al.* (1995).

É interessante salientar que a 4°C a enzima ainda apresenta 40% da sua atividade máxima, o que permite que a hidrólise da lactose do leite, para a produção de leites com teor reduzido de lactose, seja feita a baixas temperaturas (temperatura de armazenamento do leite).

O teste de estabilidade enzimática à temperatura ambiente, considerada 30°C, é mostrado na Figura 21. O experimento mostra que nesta temperatura a atividade enzimática da lactase cai linearmente com o tempo e, após dez horas, a lactase apresenta apenas 40% da sua atividade inicial. Este resultado mostra a necessidade de se pesquisar uma solução tampão adequada que evite esta perda de atividade.

O gráfico da Figura 22 ilustra a estabilidade enzimática da lactase ao armazenamento nas temperaturas de 4°C (geladeira), -4°C (congelador) e -18°C (*freezer*). A 4°C a atividade enzimática cai linearmente com o tempo, chegando a 65% do valor inicial após nove semanas de armazenamento. Já as curvas das temperaturas de -4°C e -18°C não apresentaram diferença entre si e também apresentaram pouca perda de atividade enzimática durante as nove semanas de armazenamento.

Comparando-se os dados aqui publicados com o ensaio de estabilidade enzimática realizado por Bales & Castillo (1979) com lactase liofilizada de *Candida pseudotropicalis* crescida em soro de queijo, observamos que a enzima liofilizada é mais estável ao armazenamento do que a enzima em solução, e que esta diferença de estabilidade é maior à medida que a temperatura aumenta.

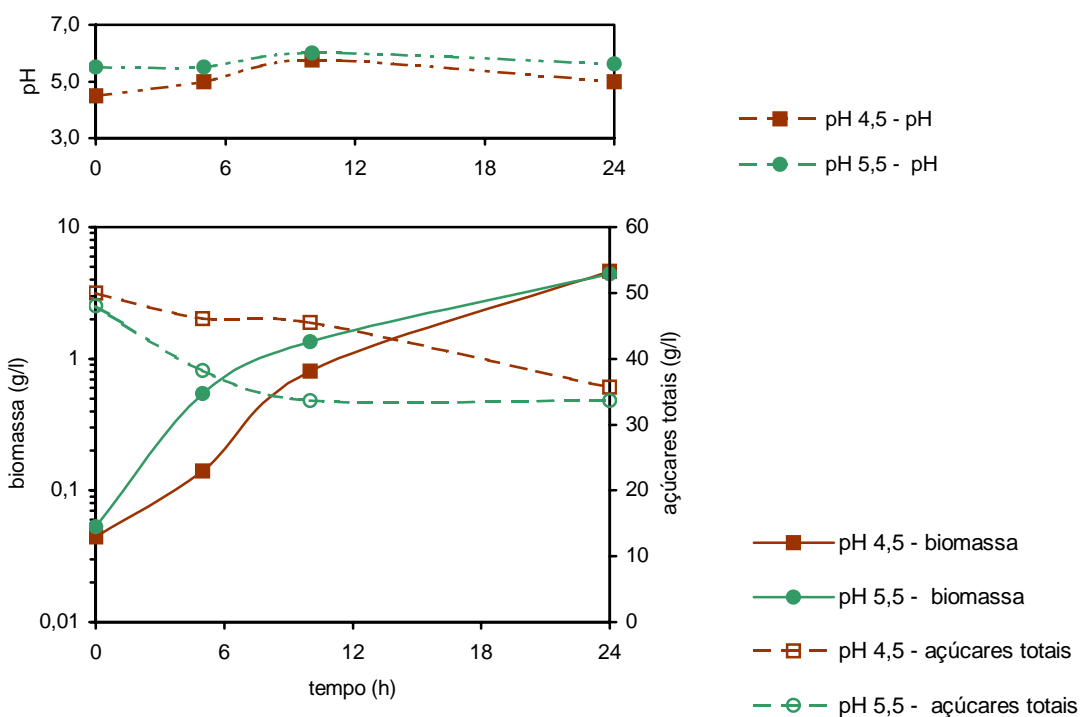


Figura 11: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 em incubadora rotatória. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, temperatura 30°C e agitação 200 rpm. Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

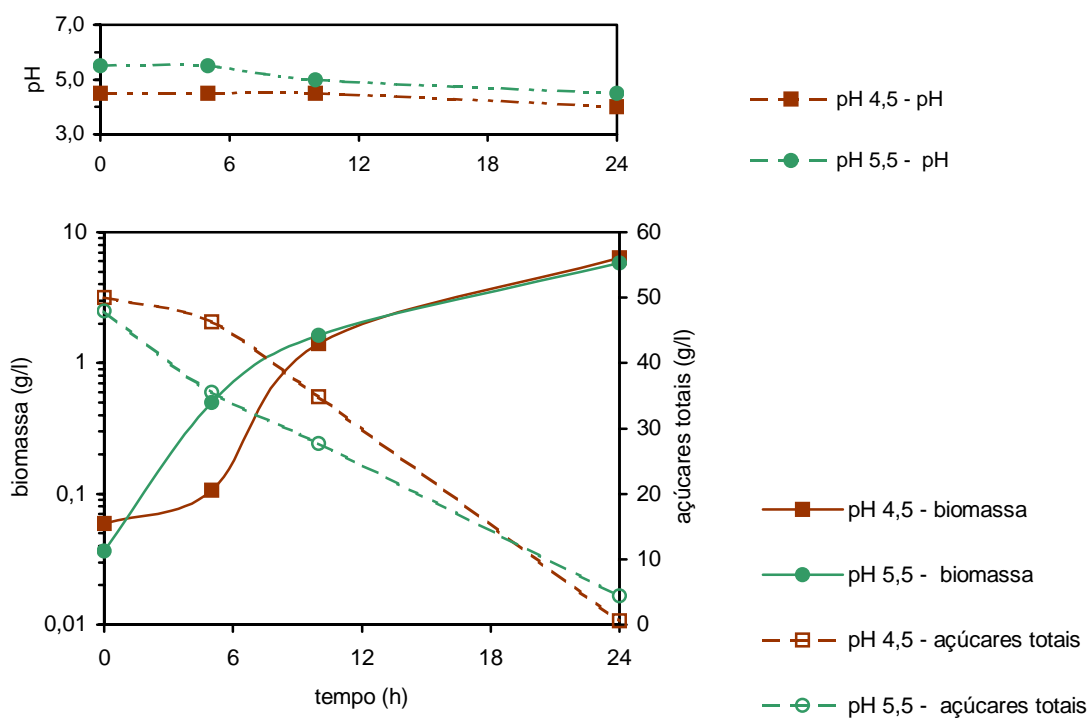


Figura 12: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em incubadora rotatória. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, temperatura 30°C e agitação 200 rpm.

Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

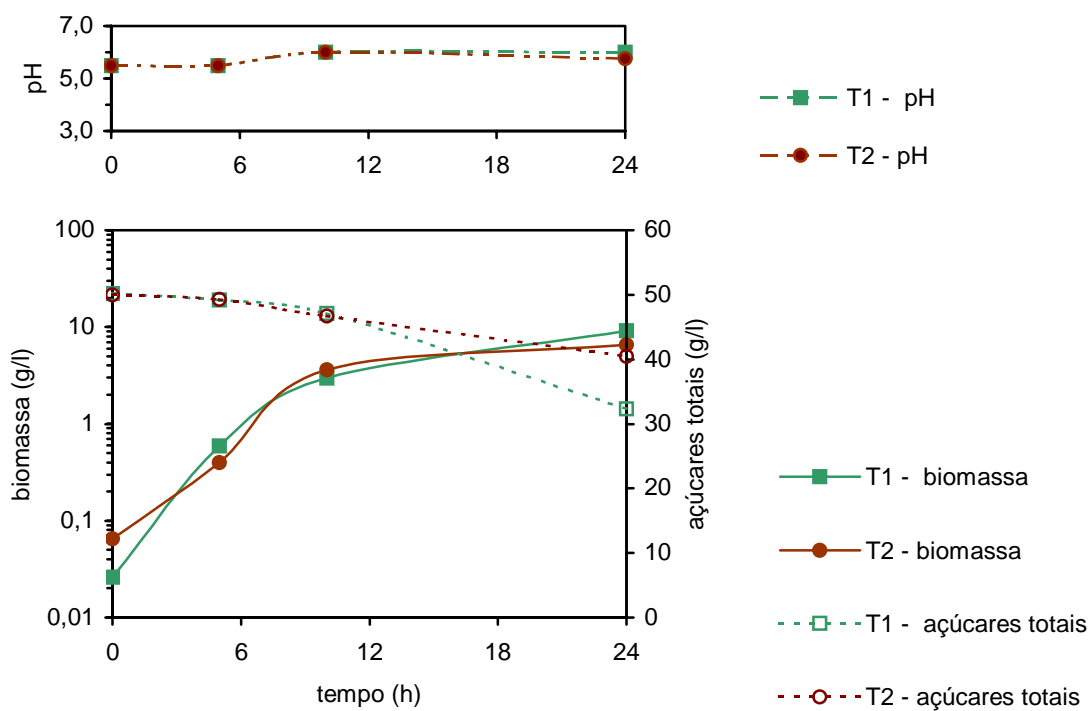


Figura 13: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 em incubadora rotatória, onde T1 = 30°C e T2 = 37°C. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5 e agitação 200 rpm. Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

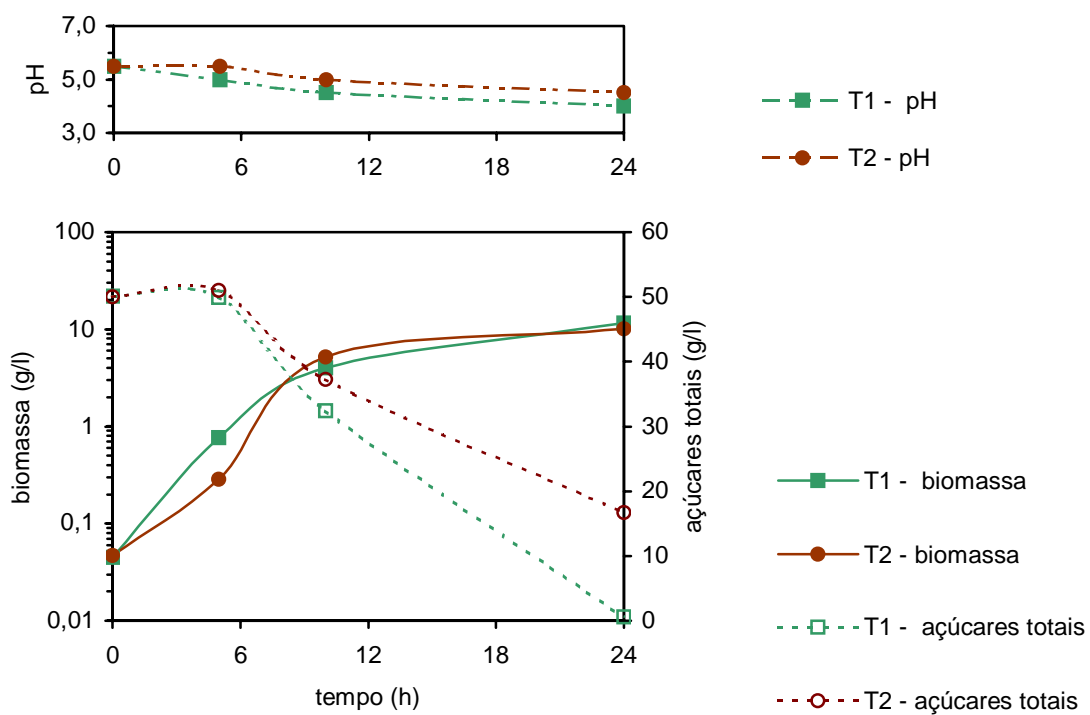


Figura 14: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em incubadora rotatória, onde T1 = 30°C e T2 = 37°C. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5 e agitação 200 rpm.

Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

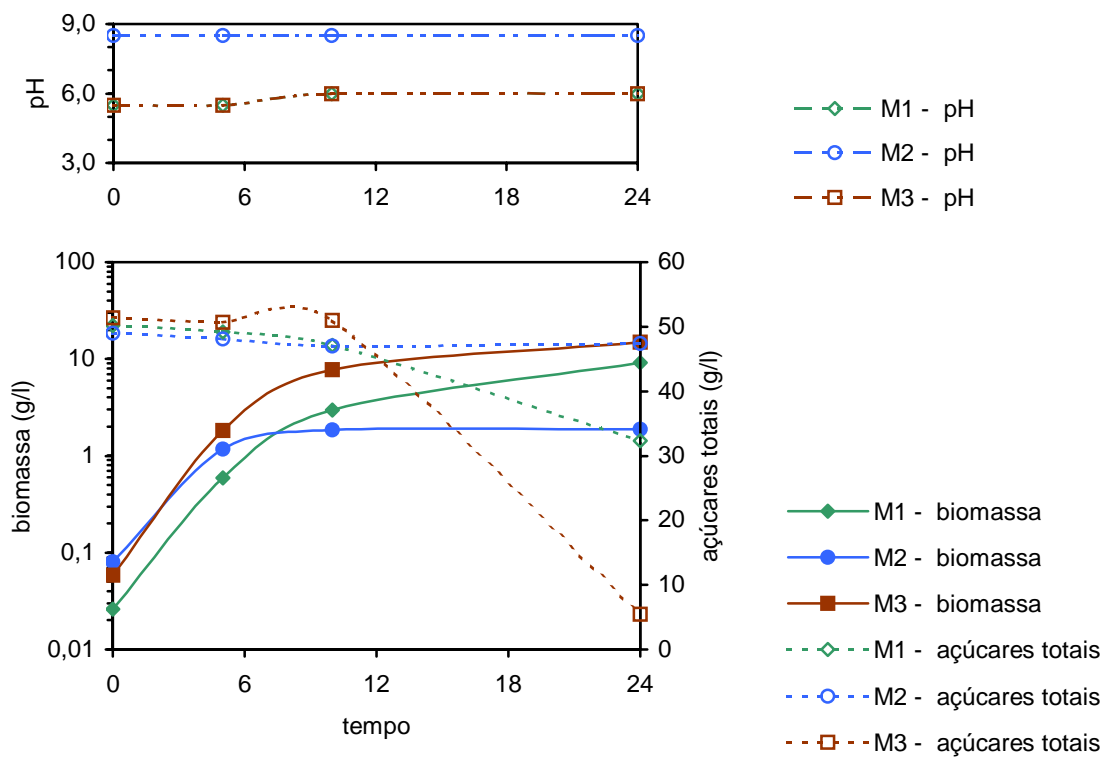


Figura 15: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 em incubadora rotatória, onde: M1 = soro de queijo 7%; M2 = soro de queijo 7% + uréia 1%; M3 = soro de queijo 7% + extrato de levedura 1%. Condições de cultivo: pH 5,5, temperatura 30°C e agitação 200 rpm. Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

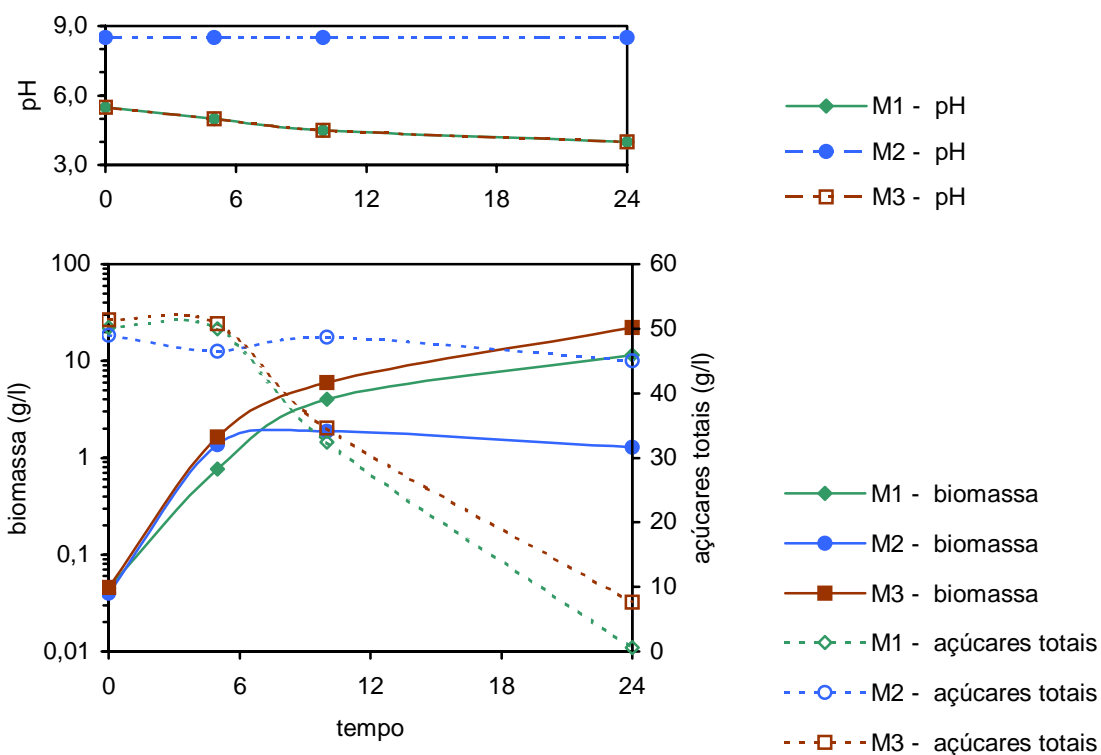


Figura 16: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em incubadora rotatória, onde: M1 = soro de queijo 7%; M2 = soro de queijo 7% + uréia 1%; M3 = soro de queijo 7% + extrato de levedura 1%. Condições de cultivo: pH 5,5, temperatura 30°C e agitação 200 rpm. Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

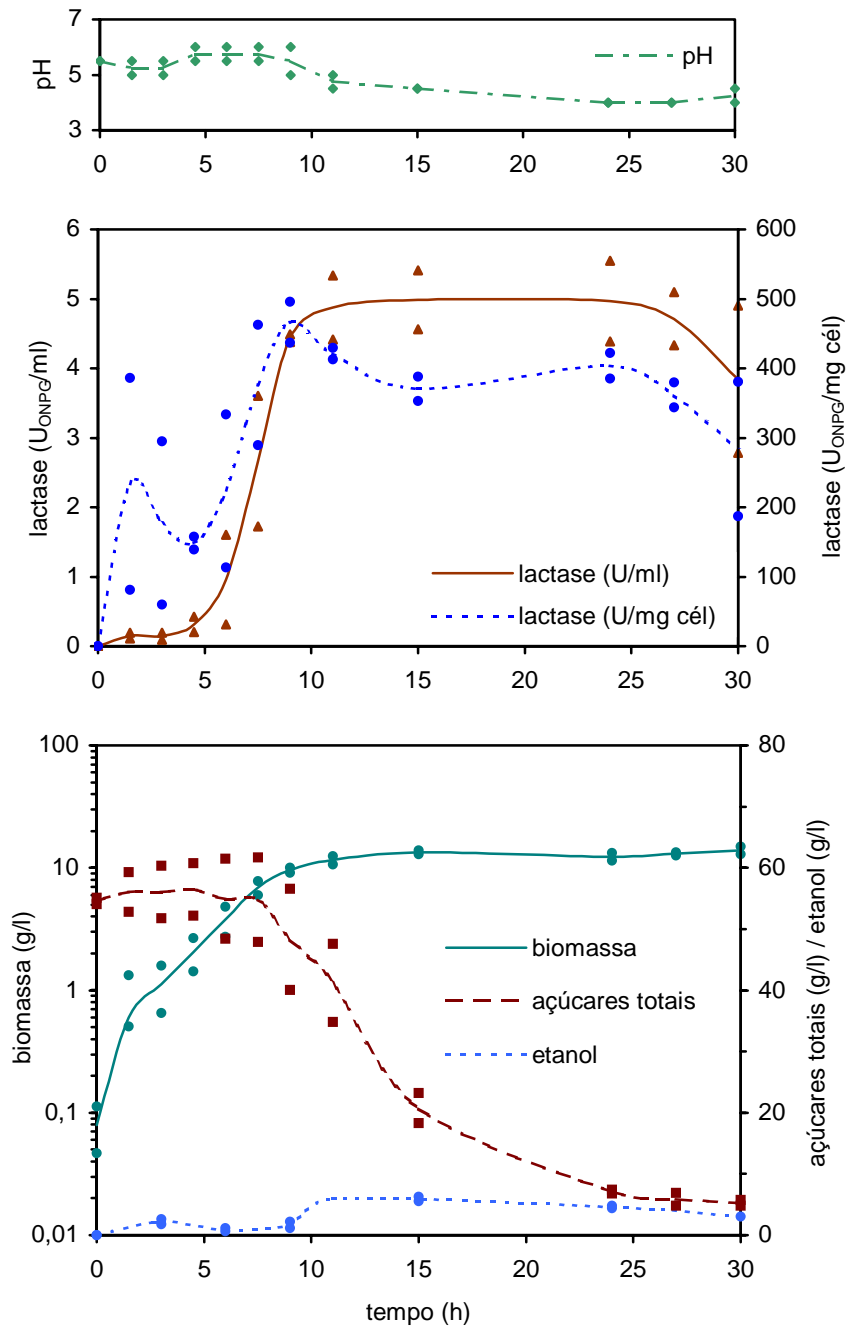


Figura 17: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, extrato de levedura 1%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.

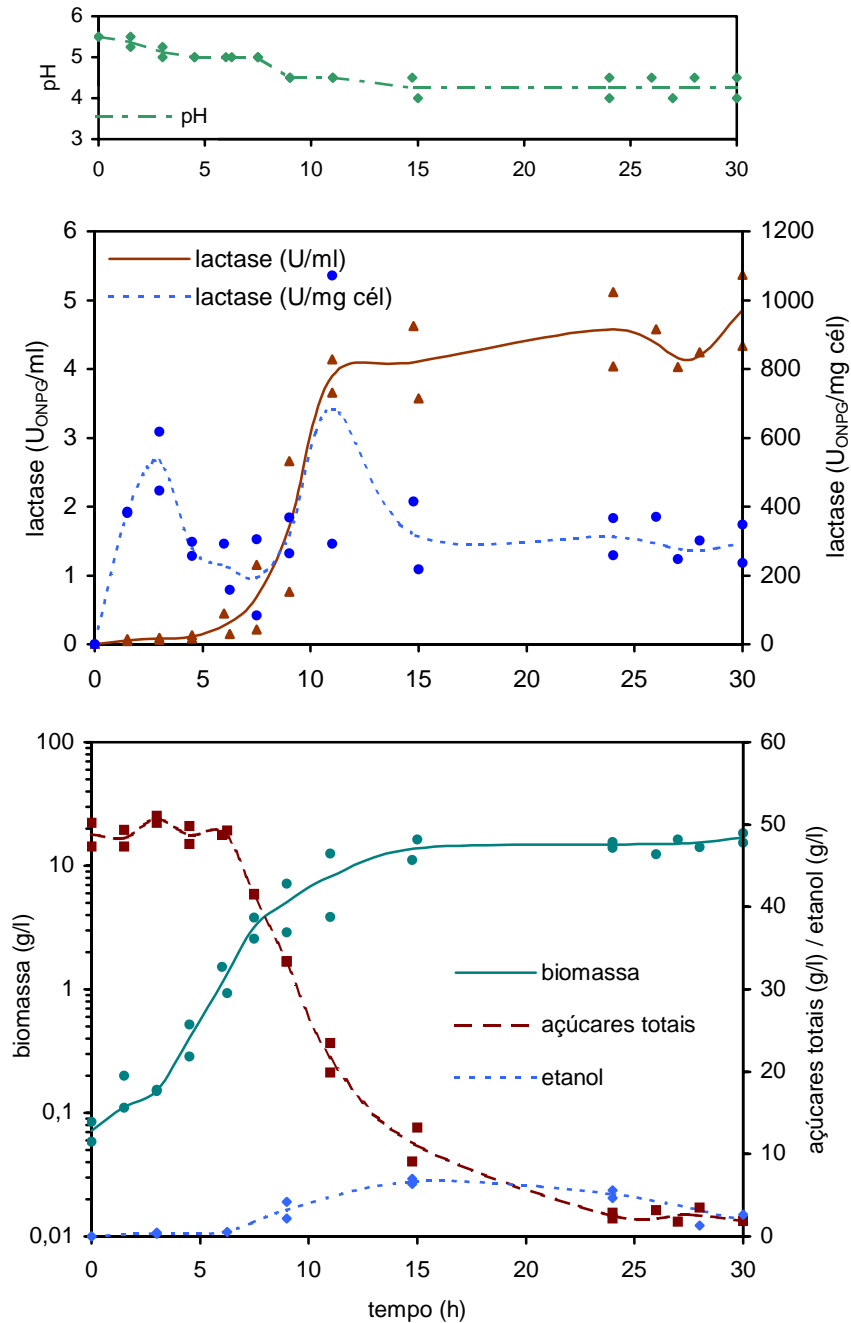


Figura 18: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 7%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.

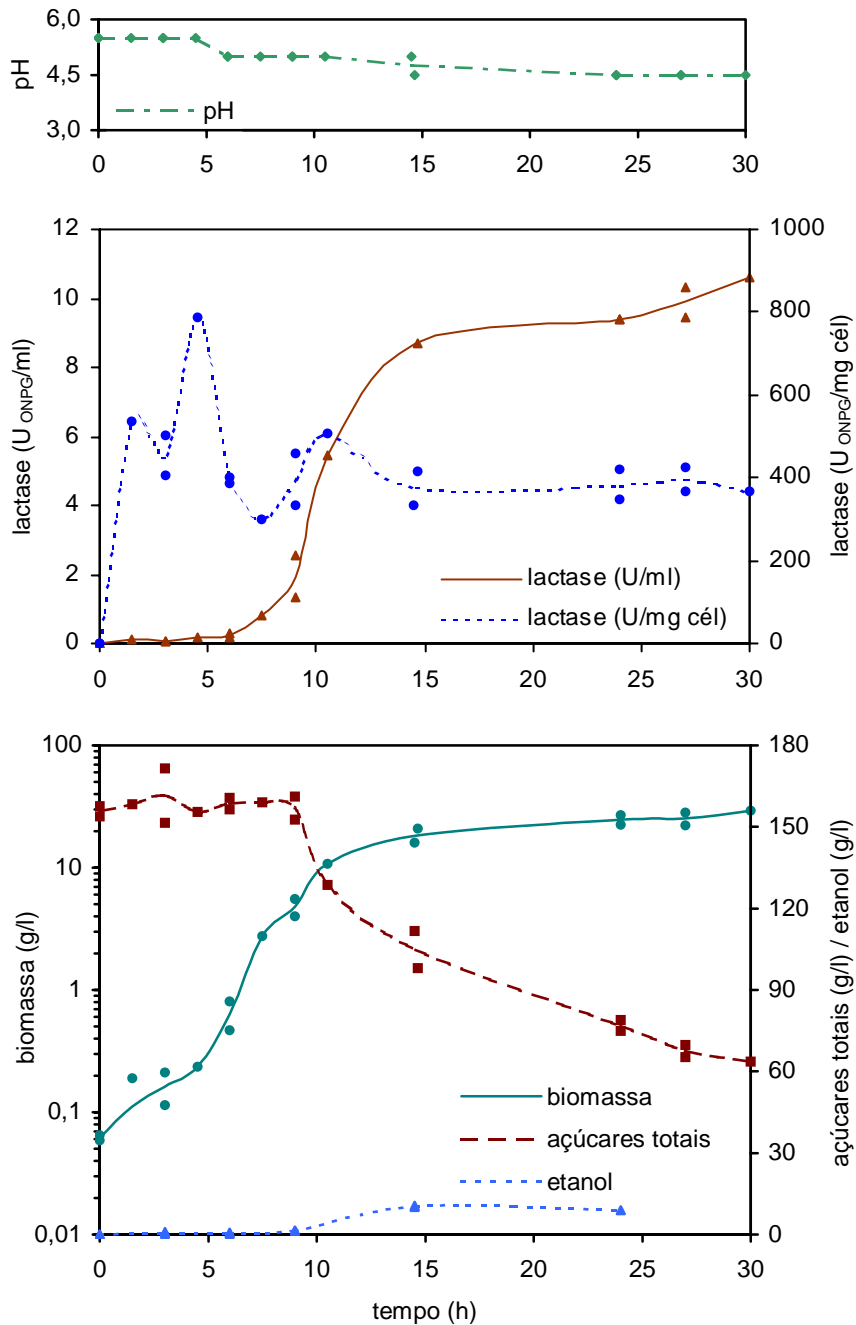


Figura 19: Crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em biorreator. Condições de cultivo: soro de queijo 21%, pH 5,5, temperatura 37°C, aeração 2 vvm e agitação 500 rpm.

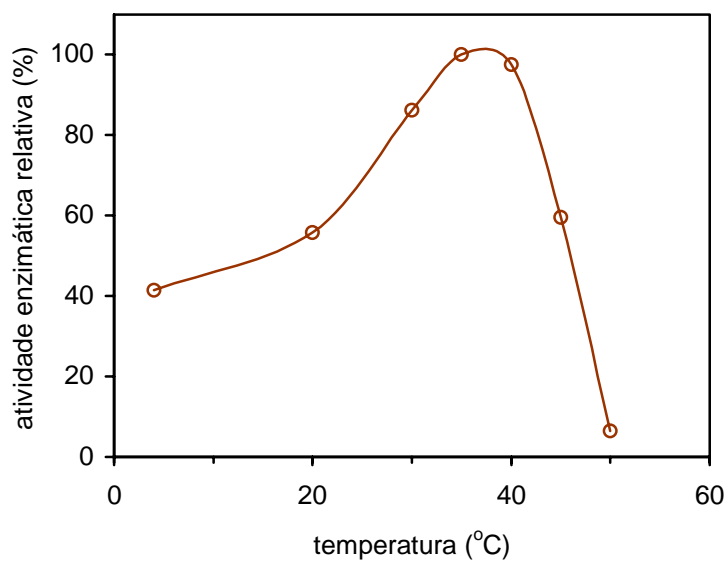


Figura 20: Variação da atividade enzimática da lactase de *K. marxianus* CBS 6556 com a temperatura.

Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

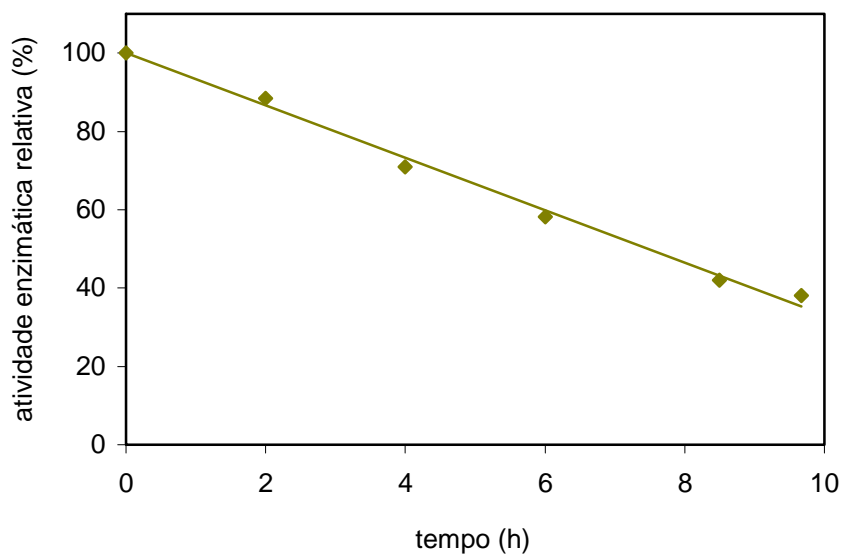


Figura 21: Ensaio de estabilidade enzimática da lactase de *K. marxianus* CBS 6556 em temperatura ambiente (30°C).

Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

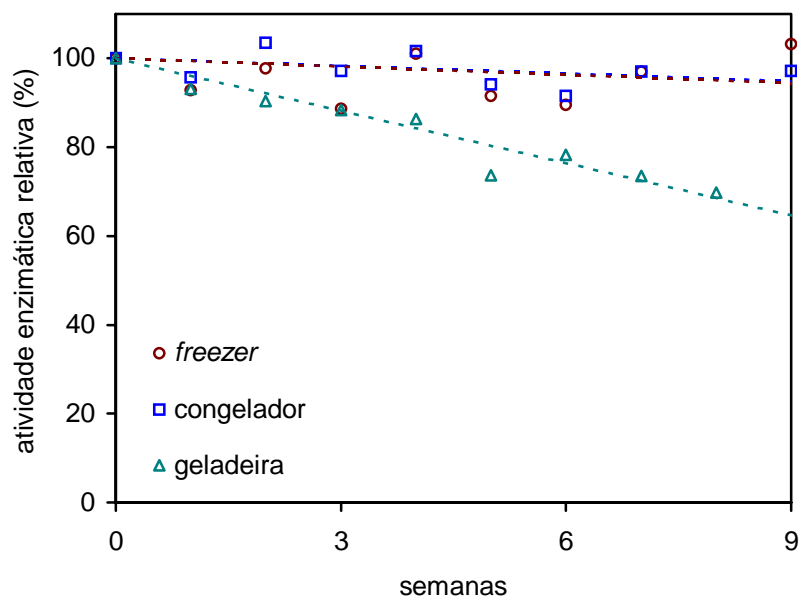


Figura 22: Ensaio de estabilidade enzimática da lactase de *K. marxianus* CBS 6556 em temperatura de armazenamento: -18°C (*freezer*), -4°C (congelador) e $+4^{\circ}\text{C}$ (geladeira).

Os resultados apresentados representam a média de duas repetições.

6 - Conclusões

Diante dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que o soro de queijo constitui-se em um subproduto com grande potencial para ser utilizado como meio de cultura para propagação de biomassa em processos que visam a produção de enzimas ou outros produtos de maior valor agregado. Este potencial decorre de dois fatores principais: a) o grande volume de soro que é produzido anualmente por indústrias de laticínios do mundo inteiro; b) o fato do soro de queijo *in natura* constituir-se um meio de cultura completo para determinados microorganismos, não necessitando de complementação de fontes de carbono e nitrogênio, conforme foi apresentado neste trabalho.

Com relação às duas cepas de *Kluyveromyces marxianus* testadas, este estudo mostra claramente as vantagens da cepa CBS 6556, pois esta apresenta bom crescimento em soro de queijo não suplementado por extrato de levedura, o que constitui em grande vantagem, se pensarmos no custo de produção industrial da enzima.

O crescimento em soro de queijo concentrado apresentou uma maior produção de etanol pela levedura quando comparado ao soro *in natura*. Sendo o etanol um subproduto celular tóxico, houve inibição do crescimento microbiano, tornando este processo pouco interessante para a produção de lactase.

A caracterização enzimática parcial realizada neste trabalho mostra a necessidade de realizar-se um estudo mais aprofundado da enzima. É importante desenvolver estudos sobre a influência do pH do meio na atividade enzimática e da atuação de íons ativadores e inibidores sobre a enzima. Quanto à estabilidade ao armazenamento, é necessário pesquisar uma solução tampão que conserve a atividade enzimática nas temperaturas de 4°C a 8°C (armazenamento em geladeira) e temperatura ambiente.

De um modo geral, os resultados aqui obtidos levam a crer que a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 utilizando soro de queijo como meio de cultura

apresenta grande potencial para ser utilizada em processos industriais. O meio de cultura utilizado, soro de queijo, é um subproduto da indústria de laticínios, o que torna seu custo praticamente nulo. A levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 possui alta velocidade específica de crescimento, diminuindo o tempo de fermentação e aumentando a produtividade do processo. Segundo os resultados apresentados neste trabalho, a produção seria feita com a cepa CBS 6556, crescendo em soro de queijo a pH 5,5, 37°C, durante aproximadamente 12 horas.

7 - Perspectivas Futuras

O principal objetivo ao projetar-se um biorreator ou qualquer outro componente de um processo biotecnológico é minimizar o custo na produção de um produto ou serviço de alta qualidade. Contudo, torna-se relevante separar os processos biotecnológicos em dois grupos, aqueles em que a conversão do produto (reação) é a parte mais cara do processo e aqueles em que a recuperação e purificação do produto (*downstream*) é a parte mais cara. Nos primeiros, é necessário preocupar-se com a produtividade, Q_P ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), do processo, enquanto nos últimos, a concentração de produto, P (g.l^{-1}), é o critério dominante para minimização do custo do processo (Cooney, 1983). A produção de enzimas em geral encontra-se no grupo em que o maior custo de processo encontra-se na recuperação dos produtos.

Os biorreatores podem ser de três tipos: contínuos, semi-contínuos (*fed-batch*) e batelada. Os contínuos ainda podem ser do tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) ou PFR (*Plug-Flow Reactor*) (Cooney, 1983).

Os métodos convencionais de fermentação que utilizam células livres em processos batelada possuem muitas limitações, como baixa produtividade, inibição pelo produto e variação do produto proveniente de diferentes bateladas. Por outro lado, as fermentações contínuas, apesar de contornar alguns problemas relativos às bateladas, são limitadas pelo arrastamento contínuo das células na corrente da saída do biorreator (Tejayadi & Cheryan, 1994) e pela baixa concentração no produto final (Cooney, 1983).

Contudo, estudos mais recentes e tecnologia de ponta estão conseguindo superar os problemas apresentados através do HCDC (*High-Cell-Density Cultivation*) realizando fermentações em batelada (Castrillo *et al.*,1995) e *fed-batch* (Korz *et al.*,1994). Segundo Reisenberg *et al.* (1991) as vantagens do HCDC são:

- volumes reduzidos de biorreatores;
- mais facilidade nos processos de *upstream* e *downstream*;

- produtividades volumétricas essencialmente maiores;
- maior facilidade na separação das células e rendimento na recuperação do produto;
- menor gasto de água;
- menores custos de produção e
- menor custo de investimento em equipamentos.

Estudos realizados por González-Siso (1993), concluem que as culturas *fed-batch* são um sistema interessante para a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* em soro de queijo, pois permitem a extensão da fase de máxima produção da enzima.

Diante das idéias acima apresentadas, sugere-se que a continuação do trabalho seja realizada em termos de otimizar o processo fermentativo, desenvolvendo tecnologia para o cultivo de *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo, utilizando técnicas que visam obter alta densidade celular no fermentador.

8 - Referências Bibliográficas

- AYUB, M.A.Z. **Effects of recombinant DNA and environmental conditions on superoxide dismutase production by yeast.** Manchester, 1991. 300p. Tese (Doutorado em Tecnologia) - University of Manchester, Institute of Science and Technology, 1991.
- BALES, S.A.; CASTILLO, F.J. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1201-1205, 1979.
- BARALE, S.B. **Contribuição ao estudo da fermentação de soro de leite por *Lactobacillus bulgaricus* em processo descontínuo,** São Paulo, 1985. p. 15-16. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Escola Paulista de Medicina, 1985.
- BARET, J.L. Lactose hidrolisys by immobilized lactase. **Industries Alimentares et Agricoles**, Paris, v. 97, p. 1051-1055, 1980.
- BERRY, D.R.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. **Yeast Biotechnology.** Londres, Unwin, 1987. p. 160-199.
- BRADY, D.; MARCHANT, R.; McHALE, L.; McHALE, A.P. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 17, p. 696-699, 1995.
- CARVALHO-SILVA, M.; SPENCER-MARTINS, I. Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 57, p. 77-81, 1990.
- CASTRILLO, J.I.; KALITERNA, J.; WEUSTHUIS, R.A.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. High cell cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 49, p. 621-628, 1996.
- COLOMBAN, A.; ROGER, L.; BOYAVAL, P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 42, p. 1091-1098, 1993.

- COMPAGNO, C.; PORRO, D.; SMERALDI, C.; RANZ, B.M. Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 43, p. 822-825, 1995.
- COONEY, C.L. Bioreactors: Design and operation. **Science**, Zancaster, v. 219, p. 728-733, 1983.
- DIJKEN, van J.P.; HENSING, M.; SCHEFFERS, W.A.; ROUWENHORST, R.J.; VERBAKEL, J.M.A. Physiology of *Kluyveromyces marxianus* in relation to production of extracellular proteins. In: **Meeting on Biology of Kluyveromyces**, 4., Düsseldorf, 1991. p. 21-22.
- DORAN, P.M. **Bioprocess engineering principles**, San Diego, Academic Press, 1995. p. 196-278.
- ESPINOZA, P.; BÁRZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 14, p. 1053-1058, 1992.
- FLOETENMEYER, M.D.; GLATZ, B.A.; HAMMOND, E.G. Continuous culture fermentation of whey permeate to produce microbial oil. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 633-637, 1985.
- FOGLER, H.S. **Elements of chemical reaction engineering**, 2. ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1992. p. 675-698.
- FOSTER, M.F. **Microbial physiology**, 3 ed. New York, Wiley-Liss, 1995. p. 153-158.
- FURLAN, S.A.; CARVALHO-JONAS, M.F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B.; JONAS, R. Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de microrganismos produtores de β -galactosidase. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, p. 1261-1268, 1995.
- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose. **Process Biochemistry**, Londres, v. 20, p. 2-12, 1985.

- GOMEZ, A.; CASTILLO, F.J. Production of biomass and β -galactosidase by *Candida pseudotropicalis* in continuous culture on whey. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, p. 1341-1357, 1983.
- HEWITT, C.M.; GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 6, p. 263-270, 1984.
- HOLSINGER, V.H. Lactose-modified milk and whey. **Food Technology**, Chicago, p. 35-40, 1978.
- KARDEL, G.; FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. Lactase na Indústria de Laticínios (Parte 1) **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 50, n. 294, p. 15-17, 1995.
- KEESEY, J. **Biochemica information**, Indianópolis, Boehringer Mannheim Biochemicals, 1987. p. 167.
- KORZ, D.J.; RINAS, U. HELLMUTH, K.; SANDERS, E.A.; DECKWER, W.D. Simple *fed-batch* technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 39, p. 59-65, 1995.
- LEDERBERG, J. The β -galactosidase of *Escherichia coli*, strain K12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 60, p. 381-392, 1950.
- LORENZEN, P. What's to be done with whey? **Food Engineering International**, New York, p. 41-42, 1987.
- MAHONEY, R.R.; NICKERSON, T.A.; WHITAKER J.R. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, p. 1620-1629, 1974.
- MAIORELLA, B.L.; CASTILLO, F.J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. **Process Biochemistry**, Londres, v. 19, p.157-161, 1984.

- MEHAIA, M.A.; CHERYAN, M. Production of acid latic from sweet whey permeate concentrates. **Process Biochemistry**, Londres, v. 22, p. 185-188, dez, 1987.
- MORESI, M.; ORBAN, E.; QUAGLIA, G.B.; CASINI, I. Effect of some physico-chemical treatments on kinetics of autolysed-yeast extract production from whey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 67, p. 347-357, 1995.
- PIVARNIK, L.F.; SENEGAL, A.G.; RAND, A.G. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 38, p. 1-102, 1995.
- PONSANO, E.H.G.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa tecnológica para a redução de sua capacidade poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, 170-173, 1995.
- REISENBERG, D.; SCHULTZ, V.; KNORRE, W.A.; POHL, H.D.; KORZ, D.; SANDERS, E.A.; ROß, A.; DECKWER, W.D. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, p. 17-28, 1991.
- RÉVILLION, J.P.P.; PIBERNAT, C.C.; GIULIANI FILHO, J.; AYUB, M.A.Z. Utilização de extrato de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinhos espumantes. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 16, p. 196-205, 1996.
- SCOTT, R. **Fabricación de queso**, 2. ed. Zaragoza, Acríbia, 1993. p. 313-322.
- SHEETZ, R.M.; DICKSON, R.C. Mutations affecting synthesys of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, Chapell Hill, v. 95, p. 877-890, 1980.
- SILVA, M.C.; MARTINS, I.S. Modes of lactose uptake in the yeasts species *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 57, p. 77-81, 1990.
- SISO, M.I.G. β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. **Process Biochemistry**, Londres. v. 29, p. 565-568, 1994.

- SONAWAT, H.M.; AGRAWAL, A.; DUTTA, S.M. Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Folia Microbiológica**, Delft, v. 26, p. 370-376, 1981.
- TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 43, p. 242-248, 1995.
- THIGEL, A.A.; DEAK, T. Selection of strains and extraction procedures for optimum production of galactosidase from *Kluyveromyces* yeast. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, Jena, v. 144, p. 465-471, 1989.
- TIN, C.S.F.; MAWSON, A.J. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. **Process Biochemistry**, Londres, v. 28, p. 217-221, 1993.
- WENDORFF, W.L.; AMUNDSON, C.H.; OLSON, N.F. Nutrient requirements and growth conditions for production of lactase enzyme by *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v. 33, p. 451-455, 1970.
- WONG, P.N.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. **Fundamentals of Dairy Chemistry**, 3. ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1988. p. 279-342.
- ZADOW, J.G. Lactose: properties and uses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 2654-2679, 1984.

Apêndices

Apêndice 1

Tabela 13: Composição do soro de queijo em pó utilizado neste trabalho.

Lactose	71,23%
Proteína solúvel	11,07%
Gordura	0,72%
Umidade	2,94%
Cinzas	7,22%

Apêndice 2

Cálculo de k_{La} e do q_{O_2} através do método dinâmico.

a) Cálculo de q_{O_2} :

Para o cálculo de q_{O_2} utiliza-se a Equação (9):

$$\frac{dC}{dt} = -q_{O_2} X$$

onde $\frac{dC}{dt}$ é a inclinação da reta. Sendo:

$$\frac{dC}{dt} = -0,0652 \text{ mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$X = 0,442 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Resulta em:

$$q_{O_2} = -\frac{dC/dt}{X} = -\frac{-0,0652}{0,442} = 0,148 \text{ mgO}_2 \cdot \text{gcél}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

b) Cálculo do k_{La} :

O cálculo do k_{La} é feito através da Equação (14):

$$k_{La} = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{t - t_0}$$

Onde, segundo o gráfico da Figura 23, tem-se que:

$$C_i = 3,573 \text{ mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$$

$$C_0 = 0,775 \text{ mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1} \quad t = 59,2 \text{ s}$$

$$C = 2,374 \text{ mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1} \quad t = 114 \text{ s}$$

Resultando em:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{3,573 - 0,775}{3,573 - 2,374}\right)}{114 - 59,2} = 0,01546 \text{ s}^{-1} = 55,67 \text{ h}^{-1}$$

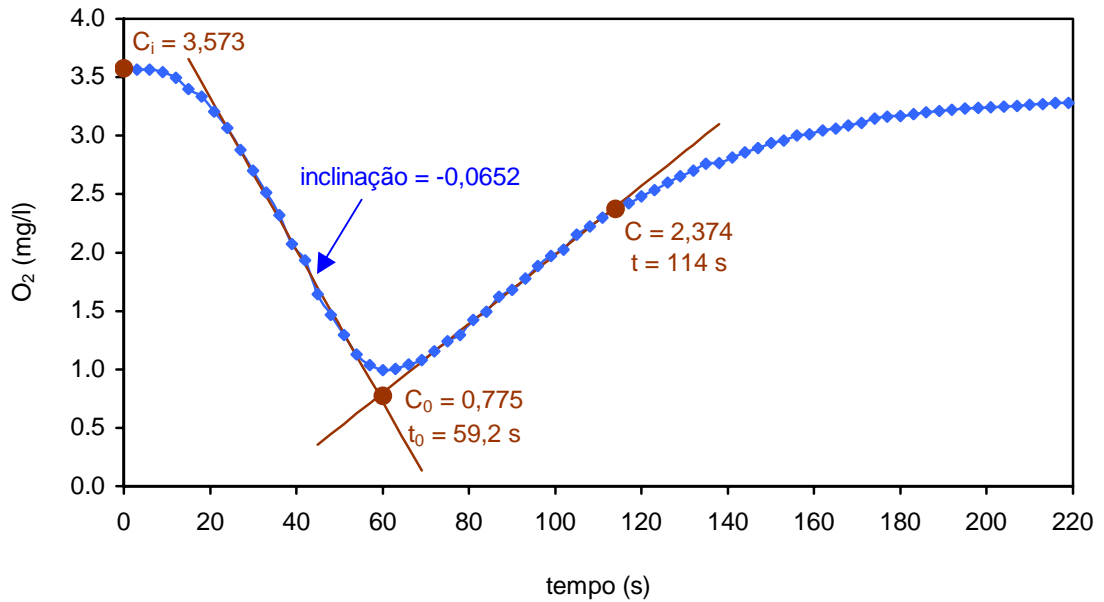


Figura 23: Gráfico da concentração de oxigênio contra o tempo para o cálculo do k_{LA} e do q_{O_2} .

Apêndice 3

Tabelas de dados experimentais

Nas próximas páginas são mostrados as tabelas de dados experimentais referentes aos gráficos apresentados neste trabalho. Todos os dados apresentados representam a média de duas repetições do experimento.

Tabela 14: Dados referentes ao gráfico da Figura 11:

Tempo (h)	pH 4,5			pH 5,5		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)
0	0,044	4,5	50,00	0,053	5,5	48,00
5	0,140	5,0	46,07	0,547	5,5	38,18
10	0,805	5,8	45,48	1,349	6,0	33,67
24	4,634	5,0	35,71	4,410	5,6	33,67

Tabela 15: Dados referentes ao gráfico da Figura 12:

tempo (h)	pH 4,5			pH 5,5		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)
0	0,059	4,5	50,00	0,036	5,5	48,00
5	0,107	4,5	46,30	0,498	5,5	35,48
10	1,414	4,5	34,80	1,628	5,0	27,67
24	6,336	4,0	0,61	5,804	4,5	4,39

Tabela 16: Dados referentes ao gráfico da Figura 13:

tempo (h)	T = 30°C			T = 37°C		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)
0	0,026	5,5	50,16	0,065	5,5	50,00
5	0,594	5,5	49,22	0,399	5,5	49,32
10	2,973	6,0	47,07	3,637	6,0	46,74
24	9,160	6,0	32,35	6,539	5,8	40,49

Tabela 17: Dados referentes ao gráfico da Figura 14:

tempo (h)	T = 30°C			T = 37°C		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)
0	0,045	5,5	50,16	0,047	5,5	50,00
5	0,763	5,0	49,95	0,288	5,5	51,00
10	4,017	4,5	32,45	5,205	5,0	37,22
24	11,515	4,0	0,63	10,121	4,5	16,66

Tabela 18: Dados referentes ao gráfico da Figura 15:

Tempo (h)	M1			M2			M3		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	PH	S (g/l)
0	0,026	5,5	50,16	0,080	8,5	49,03	0,059	5,5	51,37
5	0,594	5,5	49,22	1,176	8,5	48,08	1,835	5,5	50,65
10	2,973	6,0	47,07	1,840	8,5	47,02	7,803	6,0	50,93
24	9,160	6,0	32,35	1,894	8,5	47,40	15,022	6,0	5,47

Tabela 19: Dados referentes ao gráfico da Figura 16:

Tempo (h)	M1			M2			M3		
	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	pH	S (g/l)	X (g/l)	PH	S (g/l)
0	0,045	5,5	50,16	0,040	8,5	49,03	0,046	5,5	51,37
5	0,763	5,0	49,95	1,371	8,5	46,52	1,645	5,0	50,76
10	4,017	4,5	32,45	1,886	8,5	48,67	5,982	4,5	34,65
24	11,515	4,0	0,63	1,294	8,5	45,05	22,097	4,0	7,66

Tabela 20: Dados referentes ao gráfico da Figura 17:

tempo (h)	X (g/l)	pH	S (g/l)	EtOH (g/l)	lac (U/ml)	lac (U/mgcel)
0	0,08	5,50	54,58	0,00	0,00	0,00
1,5	0,60	5,25	56,04		0,15	233,69
3	1,11	5,25	56,05	2,19	0,14	177,35
4,5	2,05	5,75	56,48		0,31	148,36
6,125	3,78	5,75	54,91	0,86	0,96	223,77
7,5	6,87	5,75	54,78		2,66	375,92
9	9,54	5,50	48,30	1,68	4,44	466,54
11	11,56	4,75	41,21		4,88	421,04
14,875	13,42	4,50	20,75	5,91	4,99	370,79

24	12,27	4,00	7,13	4,64	4,97	403,43
27,5	13,01	4,00	5,88		4,71	361,62
30	13,88	4,25	5,28	3,03	3,84	283,77

Tabela 21: Dados referentes ao gráfico da Figura 18:

tempo (h)	X (g/l)	pH	S (g/l)	EtOH (g/l)	lac (U/ml)	lac (U/mgcél)
0	0,07	5,50	48,78	0,00	0,00	0,00
1,5	0,11	5,38	48,33		0,06	382,72
3	0,15	5,13	50,64	0,37	0,08	531,99
4,5	0,40	5,00	48,76		0,11	276,99
6,125	1,23	5,00	49,00	0,58	0,30	225,71
7,5	3,18	5,00	41,53		0,68	194,11
9	5,04	4,50	33,36	3,17	1,71	316,96
11	8,20	4,50	21,71		3,90	682,14
14,875	13,76	4,25	11,17	6,69	4,10	316,75
24	14,74	4,25	2,52	5,13	4,57	313,31
27,5	15,19	4,25	2,64		4,13	274,01
30	16,88	4,25	1,83	1,99	4,85	292,25

Tabela 22: Dados referentes ao gráfico da Figura 19:

tempo (h)	X (g/l)	pH	S (g/l)	EtOH (g/l)	lac (U/ml)	lac (U/mgcél)
0	0,06	5,50	155,7	0,00	0,00	0,00
1,5	0,11	5,50	158,3		0,10	538,28
3	0,16	5,50	161,6	0,53	0,07	454,11
4,5	0,24	5,50	155,6		0,19	786,29
6	0,64	5,00	158,6	0,40	0,25	392,52
7,5	2,74	5,00	159,1		0,82	299,08
9	4,79	5,00	156,9	1,39	1,94	395,22
10,5	10,80	5,00	128,5		5,45	505,05
14,58	18,36	4,75	104,9	10,37	8,67	375,27
24	24,67	4,5	76,9	8,89	9,39	384,03
27	25,22	4,5	67,6		9,89	395,77
30	29,10	4,50	63,7		10,64	365,46

Tabela 23: Dados referentes ao gráfico da Figura 20:

temperatura (°C)	ativ. relativa (%)
4	41,5
20	55,8
30	86,3
35	100
40	97,6
45	59,6
50	6,5

Tabela 24: Dados referentes ao gráfico da Figura 21:

tempo (h)	ativ. relativa (%)
0	100
2	88,4
4	70,9
6	58,2
8,5	42,0
9,67	38,0

Tabela 25: Dados referentes ao gráfico da Figura 22:

Semanas	freezer	congelador	geladeira
	-18°C	-4°C	4°C
0	100	100	100
1	92,8	95,7	93,1
2	97,8	103,5	90,4
3	88,7	97,1	88,4
4	101,1	101,6	86,3
5	91,5	94,1	73,7
6	89,5	91,5	78,3
7	97,1	97,1	73,5
8			69,8
9	103,2	97,1	

Tabela 26: Dados referentes ao gráfico da Figura 23:

t (s)	O ₂ (mg/l)	t (s)	O ₂ (mg/l)	t (s)	O ₂ (mg/l)
0	3,57	75	1,24	150	2,93
3	3,57	78	1,30	153	2,96
6	3,57	81	1,42	156	3,00
9	3,54	84	1,49	159	3,01
12	3,50	87	1,62	162	3,04
15	3,40	90	1,68	165	3,06
18	3,33	93	1,78	168	3,09
21	3,21	96	1,89	171	3,11
24	3,07	99	1,97	174	3,15
27	2,88	102	2,02	177	3,16
30	2,70	105	2,15	180	3,17
33	2,51	108	2,22	183	3,18
36	2,32	111	2,30	186	3,20
39	2,07	114	2,37	189	3,21
42	1,93	117	2,42	192	3,22
45	1,65	120	2,48	195	3,23
48	1,46	123	2,54	198	3,24
51	1,30	126	2,60	201	3,24
54	1,13	129	2,65	204	3,25
57	1,04	132	2,70	207	3,25
60	0,99	135	2,76	210	3,27
63	1,01	138	2,77	213	3,27
66	1,04	141	2,81	216	3,28
69	1,08	144	2,86	219	3,28
72	1,16	147	2,89		

Abstract

The aim of this study was the development of technology for the utilization of cheese whey as growth medium for the yeasts *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 and *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 intending to produce lactase.

The experiment first stage was developed in orbital shaker to determine the ideal conditions of microbial growth (pH, temperature and culture medium). Results shown best growth at pH 5,5 and temperature 37⁰C. With regard to culture medium, the yeast *K. marxianus* CBS 6556 grew in cheese whey *in natura* (7%), while the yeast *K. marxianus* CBS 712 needed cheese whey enriched with yeast extract (1%).

With de growth conditions determined in the previous stage, the yeasts cultures were grown in a bioreactor, and the lactase activity of these cultures were determinated. Both strains produced equivalent amounts of lactase enzyme activity. The strain CBS 6556 was chosen for process optimization, since it grows in a more simple and cheaper medium.

For the optimization process, the strain CBS 6556 was grown in concentrated cheese whey (21%). Results shown higher specific lactase productivity and enhanced ethanol production.

The enzyme characterization shows that the produced lactase has its maximum activity at 37⁰C, has lower stability at room temperature (30⁰C) as well as at storage temperature of 4⁰C to 8⁰C. At -4⁰C and -18⁰C, the produced lactase mantains its activity foreover 9 weeks.