

## **Produção de Beta-galactosidase Utilizando Lactose e Glicerol na Composição do Meio de Cultivo.**

**Juliana Ribeiro Machado<sup>1</sup>, Marina Born Behling<sup>1</sup>, Anna Rafaela Cavalcante Braga<sup>1</sup> e Susana Juliano Kalil<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande– Escola de Química e Alimentos  
Caixa Postal 474 – CEP 96203-900 Rio Grande – RS - E-mail: j\_rmachado@hotmail.com

### **RESUMO**

*A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima aplicada na catálise da reação de hidrólise da lactose do leite. Considerando a redução de custos para a produção  $\beta$ -galactosidase, o uso de meios contendo substratos alternativos, como o glicerol é uma alternativa promissora. O objetivo deste trabalho foi a produção de  $\beta$ -galactosidase utilizando glicerol e lactose como substratos. Foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em meio contendo lactose e glicerol nas condições de cultivo de 150 rpm e 30°C durante 96 horas. Foi realizado um planejamento experimental completo, totalizando 11 ensaios onde as variáveis foram: as concentrações de lactose, e glicerol e o pH e como resposta a atividade enzimática. Amostras do cultivo foram retiradas para determinação da atividade enzimática, biomassa e pH a cada 24 horas. A atividade enzimática mais elevada foi obtida no ensaio 7 alcançando 23,8 U/mL em pH 5,5 e concentrações de lactose e glicerol de 21g/L.*

**Palavras-chave:** lactose,  $\beta$ -galactosidase, glicerol.

### **INTRODUÇÃO**

O elevado número de pessoas intolerantes à lactose aumentou o interesse da indústria de alimentos em aplicar tecnologias capazes de diminuir o teor desse açúcar em produtos lácteos<sup>1</sup>. O emprego da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohidrolase, E.C. 3.2.1.23) vem sendo aplicado como uma alternativa para redução do teor de lactose através do processo de hidrólise enzimática da lactose. Dentre as principais fontes da enzima  $\beta$ -galactosidase podemos citar as leveduras do gênero *Kluyveromyces*, esse gênero de leveduras é reconhecido como GRAS (Generally Recognized As Safe) o que favorece a aplicação da enzima obtida em alimentos<sup>2</sup>. O glicerol é o componente estrutural de diversos lipídeos abundante na natureza e diversos micro-organismos possuem a capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono e energia o que justifica a sua utilização como matéria-prima para fermentações industriais<sup>3</sup>. A bioconversão do glicerol é uma alternativa para substituir a utilização de carboidratos tradicionais, como glicose, sacarose e amido em alguns processos de fermentação industriais, reduzindo os custos para a produção de bioprodutos e agregando valor ao glicerol<sup>4</sup>. O objetivo deste trabalho foi a produção de  $\beta$ -galactosidase utilizando glicerol e lactose como substratos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Micro-organismo e inóculo**

Para a produção da  $\beta$ -galactosidase foi utilizada a linhagem CCT 7082 de *Kluyveromyces marxianus*. A levedura foi mantida a 4°C em ágar YM inclinado e posteriormente transferida para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo do mesmo meio, e incubada a



30°C, 180 rpm por 24 h (pré-inóculo). O meio do inóculo foi composto por lactose e glicerol inoculado com 10% (v/v) do pré-inóculo e incubado a 30°C e 150 rpm por 48 horas<sup>5</sup>. O inóculo foi padronizado utilizando câmara de Neubauer para a contagem de células, de modo a iniciar todos os cultivos com a mesma concentração celular, igual a  $1,0 \times 10^7$  células/mL<sup>6</sup>.

#### **Extração da enzima**

A extração da enzima foi realizada em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro de 0,6 e 0,8 mm de diâmetro<sup>7,8</sup>.

#### **Planejamento Experimental**

Para a produção da enzima foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com 3 pontos centrais totalizando 11 ensaios. Nos ensaios foi verificada a influência do pH (5,5 a 7,5), da concentração de lactose (7-21 g/L) e da concentração de glicerol (7-21 g/L), fixando as concentrações dos demais componentes do meio em (g/L): extrato de levedura (17,0),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (8,8),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5,0) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,4)<sup>9</sup>. Todos os cultivos foram conduzidos em agitador orbital a 30°C e 150 rpm por 96 horas. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para a determinação da biomassa<sup>10</sup>, atividade enzimática<sup>11</sup> e pH<sup>12</sup>. A análise dos dados foi realizada software STATISTICA 5.0 ao nível de confiança de 95%.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

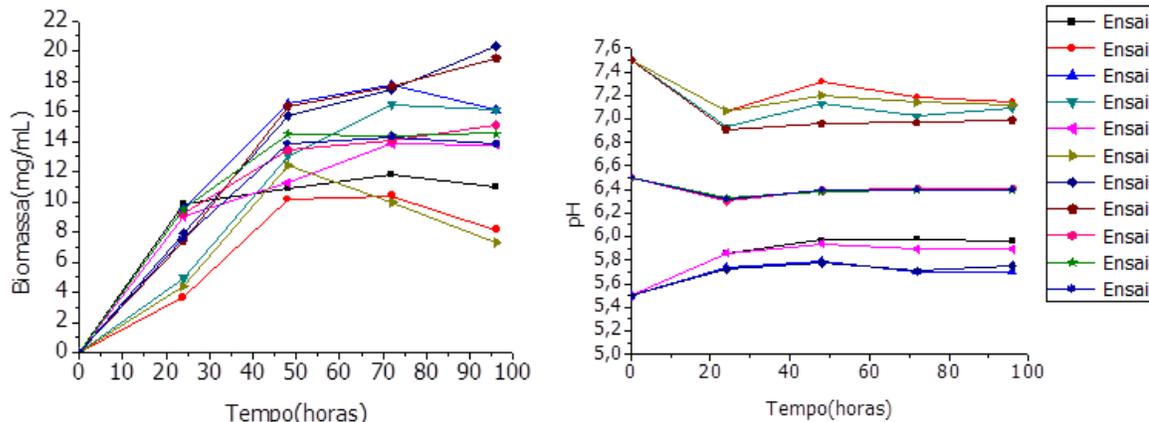
A matriz do planejamento está demonstrada na Tabela 1. Os valores de atividade enzimática variaram de 9,3 U/mL a 23,8 U/mL.

Tabela 1: Matriz do planejamento  $2^3$  com pontos centrais utilizada para a realização dos ensaios.

Ensaio	pH	Lactose (g/L)	Glicerol (g/L)	Atividade enzimática (U/mL)
1	-1(5,5)	-1(7,0)	-1(7,0)	10,8
2	1(7,5)	-1(7,0)	-1(7,0)	12,1
3	-1(5,5)	1(21,0)	-1(7,0)	21,2
4	1(7,5)	1(21,0)	-1(7,0)	13,6
5	-1(5,5)	-1(7,0)	1(21,0)	19,0
6	1(7,5)	-1(7,0)	1(21,0)	9,3
7	-1(5,5)	1(21,0)	1(21,0)	23,8
8	1(7,5)	1(21,0)	1(21,0)	23,7
9	0(6,5)	0(14,0)	0(14,0)	16,0
10	0(6,5)	0(14,0)	0(14,0)	16,8
11	0(6,5)	0(14,0)	0(14,0)	17,4

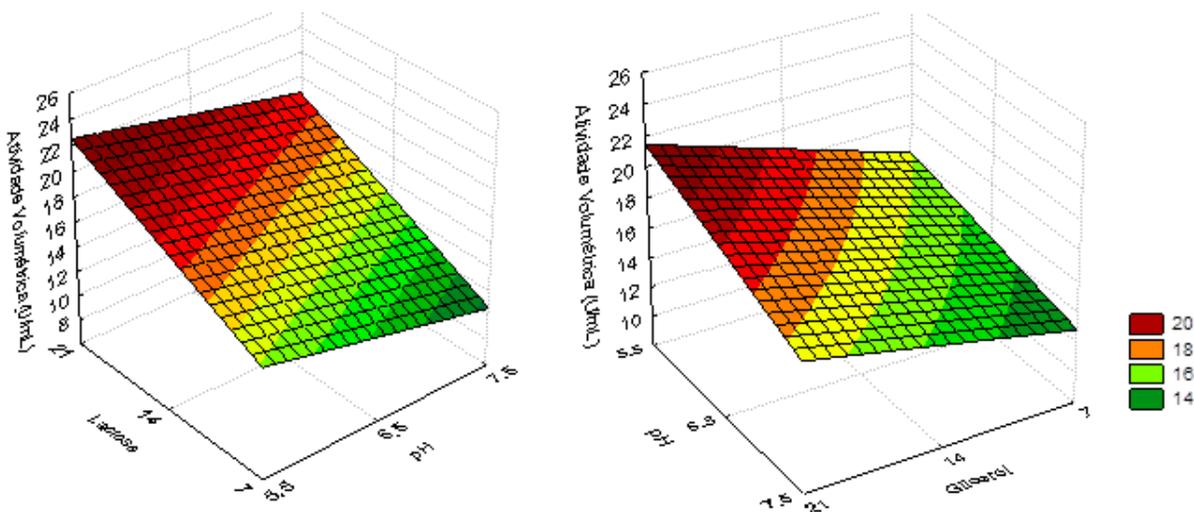
Dentre os ensaios realizados, a maior atividade enzimática foi obtida no ensaio 7, onde utilizou-se concentrações de 21g/L de lactose e de glicerol em pH 7,5. Com relação à biomassa determinada, os valores obtidos variaram de 7,9 a 20,4 mg/mL. Quanto ao pH avaliado observou-se ligeira queda nas primeiras 24 horas nos cultivos em pH 6,5 e 7,5 permanecendo constante após esse período. Porém nos ensaios em pH 5,5 verifica-se um aumento no mesmo período. A Figura 2 apresenta os valores de biomassa e pH obtidos nos ensaios.

Figura 2: Gráficos da variação de biomassa e pH durante 96 horas.



A Figura 3 demonstra que para alcançar maiores valores de atividade enzimática, a tendência mostrada nas superfícies de resposta, é que seria necessário aumentar as concentrações de lactose e glicerol e diminuir o pH. Os valores encontrados nesse trabalho foram superiores aos obtidos por estudos anteriores utilizando a lactose e glicerol no meio de cultivo no qual alcançou-se o valor de atividade enzimática máxima de 6,5 U/mL<sup>13</sup>.

Figura 3: Superfície de resposta para a atividade enzimática em função (a) concentração de lactose e pH (b) concentração de glicerol e pH.



### CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível obter uma elevada atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase, alcançando valores de 23 U/mL, confirmando a capacidade da enzima de utilizar o glicerol e lactose como fontes de carbono.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e à FAPERGS e o pelo apoio financeiro.



**III SIMBBTEC**  
Londrina 2013

## Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

### REFERÊNCIAS

- (1) HARJU. M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v.22, p.104-109, 2012.
- (2) MARTINS, A. R.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F.M.; BURKERT, C. A. V. Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 36, n. 5, p. 551-559, 2012.
- (3) WANG, Z.; ZHUGEA J.; FANGA H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 201–223, 2001.
- (4) SILVA G. P.; MACK M.; CONTIERO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 30–39, 2009.
- (5) PINHEIRO R., BELO I. MOTA M. Growth and  $\beta$ -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p.438–442, 2003.
- (6) SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, p. 567-572, 2004.
- (7) MEDEIROS, F. O.; ALVES F. G.; LISBOA C.R.; MARTINS D. S.; BURKERT C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, vol. 31, p. 336-339, 2008.
- (8) MEDEIROS, F.O.; BURKERT, C.A.V.; S.J. KALIL. Purification of  $\beta$ -galactosidase by ion exchange chromatography: A study of the elution using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, p. 911–918, 2012.
- (9) MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology and Biotechnology*, v.46, p.66-72, 2008.
- (10) RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A.; AYUB, M. A.Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p. 91–96, 1999.
- (11) INCHAURRONDO, V. A.; YAUTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.
- (12) AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis (OMA). 17. ed. AOAC International: Gaithersburg, 2000.
- (13) CHEN K.; LEE T.; HOUNG, J. Search method for the optimal médium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 14, 1992.