

## **Obtenção de Bioprodutos de Interesse por Cultivo Submerso com *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082**

**Elida Simone Guido<sup>1</sup>, Juliana Ribeiro Machado<sup>1</sup>, Marina Born Behling<sup>1</sup>, Ana Paula Manera<sup>2</sup>, Susana Juliano Kalil<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos  
Caixa Postal 474 – CEP 96.203-900 – Rio Grande – RS – E-mail: [elidaguido23@hotmail.com](mailto:elidaguido23@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa – Engenharia de Alimentos – CEP 96.413-170 – Bagé – RS.

### **RESUMO**

*No presente estudo utilizou-se a levedura *K. marxianus* CCT 7082 para produção simultânea de  $\beta$ -galactosidase e inulinase, e a biomassa obtida foi caracterizada quanto ao conteúdo proteico visando sua aplicação para fins alimentícios. Os resultados mostraram a viabilidade do processo já que em 72 h foram alcançados  $17,8 \pm 1,5$  e  $47,5 \pm 2,9$  U.mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -galactosidase e inulinase, respectivamente. A produção de biomassa atingiu  $11,0 \pm 0,7$  mg.mL<sup>-1</sup> em 96 h de cultivo, e o teor proteico da mesma, após a extração da enzima, foi de  $28,8 \pm 0,8\%$  (p/p).*

**Palavras-chave:**  $\beta$ -galactosidase, inulinase, produção simultânea, biomassa, teor proteico.

### **INTRODUÇÃO**

Dentre as leveduras, o gênero *Kluyveromyces* é de grande interesse do ponto de vista industrial, devido a suas características fisiológicas e o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*). *K. marxianus*, por exemplo, pode ser utilizada para a produção de enzimas, como  $\beta$ -galactosidas e inulinas, e de biomassa ou proteína unicelular (*Single Cell Protein* - SCP)<sup>1</sup>. O termo proteína unicelular (SCP) designa as células microbianas cultivadas para serem adicionadas a alimentação humana e de animais.

A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima intracelular usada industrialmente na hidrólise da lactose do leite e soro de leite, principalmente na elaboração de produtos destinados a pessoas que têm intolerância a lactose<sup>2</sup>, além disso, sintetiza os galacto-oligossacarídeos (GOS) que atuam como alimentos funcionais causando diversos efeitos benéficos na saúde<sup>3</sup>.

A inulinase é uma enzima extracelular potencialmente útil na produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) e xaropes com elevado teor de frutose (95%)<sup>4</sup>. Os FOS são classificados como prebióticos e podem ser utilizados como ingredientes alimentares<sup>5</sup>.

Embora a literatura apresente inúmeros estudos relacionados a produção individual de enzimas, poucos enfocam a obtenção conjunta das mesmas. A produção simultânea de  $\beta$ -galactosidase e inulinase resulta em um melhor aproveitamento do processo. A separação da biomassa do meio submerso, seguido do rompimento das células, possibilita recuperar a  $\beta$ -galactosidase, enquanto a inulinase pode ser diretamente precipitada do sobrenadante. Além das duas enzimas, existe a possibilidade de usar a biomassa do cultivo como suplemento alimentar, devido a sua riqueza nutricional. Neste contexto, o estudo teve como principais objetivos produzir simultaneamente



$\beta$ -galactosidase e inulinase de *K. marxianus* CCT 7082, além de determinar o conteúdo proteico da biomassa obtida no cultivo submerso.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Micro-organismo e Inóculo**

Foi utilizada a levedura *K. marxianus* CCT 7082 mantida a 4°C em ágar YM (extrato de malte e levedura) inclinado. A cultura foi reativada em caldo YM e posteriormente transferida (10% v/v) para o meio de inóculo, contendo lactose e inulina (10 g.L<sup>-1</sup>)<sup>6</sup>. O meio foi incubado a 30°C e 150 rpm por 48 h. O inóculo foi padronizado pela contagem de células em câmara de Neubauer<sup>7</sup>.

#### **Cultivo submerso**

Empregou-se o meio de cultivo otimizado, com a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): lactose (16,9), inulina (11,3), extrato de levedura (17,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8,8), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,0) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,4), em pH 7,0<sup>6</sup>. Foram usados erlenmeyers aletados contendo 150 mL do meio, onde foi adicionado o inóculo padronizado. Os cultivos em quadruplicada foram conduzidos a 30°C e 150 rpm por 96 h (Fig. 1A). A atividade de inulinase foi medida no sobrenadante do meio, e a  $\beta$ -galactosidase foi primeiro extraída por rompimento celular (Fig. 1B), seguido da análise de atividade.

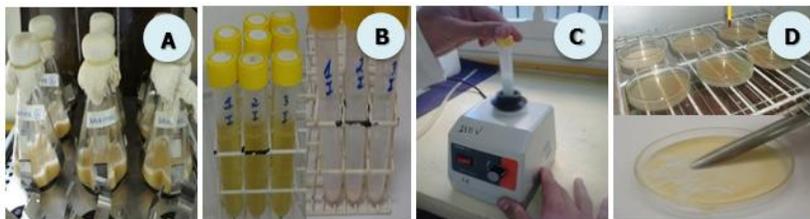
#### **Extração da $\beta$ -galactosidase**

As células foram rompidas através de abrasão, utilizando vórtex e pérolas de vidro (Fig. 1C). A relação foi de 1 mL de suspensão celular para 1,1 g de pérolas<sup>8</sup>.

#### **Preparo da biomassa**

A biomassa íntegra e a submetida ao processo de extração foram transferidas para placas de Petri, secas em estufa a 60°C, até peso constante, e removidas com espátula (Fig. 1D).

Figura 1. Etapas desenvolvidas para obtenção das enzimas e da biomassa seca: A-cultivos, B-separação das frações, C-extração da enzima e D-secagem da biomassa.



#### **Concentração de biomassa e pH**

A concentração celular foi estimada por leitura da absorvância a 620 nm e convertida em massa de célula seca (mg.mL<sup>-1</sup>) através de uma curva padrão de biomassa<sup>9</sup>. O pH do sobrenadante da amostra foi analisado usando um medidor de pH<sup>10</sup>.

#### **Atividades enzimáticas**

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada empregando-se o substrato *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG)<sup>11</sup>, onde uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de *o*-nitrofenol por min, sob as condições do ensaio. A atividade de inulinase foi medida em sacarose a 2%<sup>12</sup>, e os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de DNS<sup>13</sup>. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a capacidade da enzima liberar 1  $\mu$ mol de glicose por min, sob as condições do ensaio.

#### **Conteúdo proteico**

O teor de proteínas da biomassa foi estimado pelo método de Kjeldahl, usando um fator de 6,25 para converter nitrogênio em conteúdo proteico<sup>10</sup>. Foi realizada a determinação de proteínas da



biomassa antes e após a extração da enzima para verificar os efeitos deste processo sobre a sua composição.

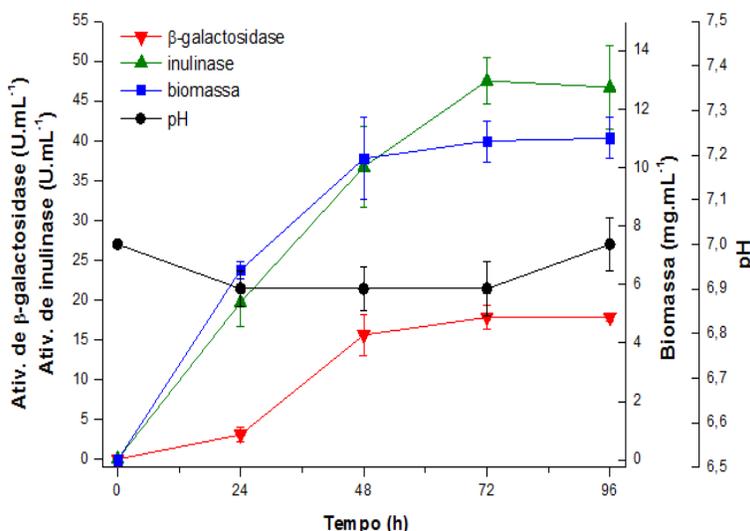
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra que a máxima produção conjunta ocorreu em 72 h de cultivo, onde obteve-se  $17,8 \pm 1,5$  U.mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -galactosidase e  $47,5 \pm 2,9$  U.mL<sup>-1</sup> de inulinase. A produção de biomassa se manteve praticamente constante após as 48 h e atingiu  $11,0 \pm 0,7$  mg.mL<sup>-1</sup> em 96 h. Houve um pequeno decréscimo no pH do meio entre 24 e 72 h, voltando a aumentar às 96 h. Observa-se também que somente a produção de  $\beta$ -galactosidase foi associada a biomassa, já que a máxima atividade de inulinase foi obtida quando o crescimento microbiano era negligenciável.

Em trabalhos anteriores foi verificado que a lactose e a inulina favoreceram a produção de  $\beta$ -galactosidase e inulinase, respectivamente, o que levou a otimização do meio com substratos mistos (lactose + inulina)<sup>6</sup>, e conforme pode ser visto no presente estudo, a combinação destas fontes de carbono contribuiu para os valores promissores em termos de produção simultânea.

De acordo com alguns autores, a produção conjunta de dois bioprodutos em uma única etapa de cultivo é de grande interesse do ponto de vista econômico, com destaque para a obtenção concomitante de  $\beta$ -galactosidase e inulinase de *K. marxianus*<sup>14</sup>.

Figura 2. Acompanhamento do cultivo de *K. marxianus* CCT 7082 no meio com lactose e inulina.



Além da produção simultânea das enzimas, foram alcançados bons resultados para o conteúdo proteico da biomassa do cultivo (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo proteico da biomassa de *K. marxianus* CCT 7082.

Amostra	Conteúdo proteico (% p/p)
Biomassa íntegra	$43,7 \pm 0,3$
Biomassa após extração	$28,8 \pm 0,8$

Acredita-se que a redução no teor de proteínas da biomassa submetida ao processo de extração da  $\beta$ -galactosidase, seja devido ao rompimento celular e a consequente liberação de proteínas, inclusive enzimas, para o exterior das células. Apesar da perda de proteínas, o aproveitamento da biomassa após a ruptura torna essa abordagem promissora, já que deste modo podem ser



obtidos diferentes bioprodutos na mesma etapa de cultivo. Convém ressaltar, que os valores aqui alcançados são semelhantes ao da biomassa de *K. marxianus* KCTC 7118 (31% p/p)<sup>15</sup>.

### CONCLUSÕES

Com base no exposto é possível afirmar que a levedura *K. marxianus* CCT 7082 é capaz de produzir  $\beta$ -galactosidase e inulinase simultaneamente e com atividades promissoras. Além disso, a biomassa do cultivo, mesmo após extração da enzima, apresenta um bom conteúdo proteico ( $28,8 \pm 0,8\%$ ). Porém, para ampliação de escala são necessários estudos adicionais relacionados a purificação das enzimas e a caracterização da biomassa visando sua utilização em alimentos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, a FAPERGS e o CNPq pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- (1) LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17-26, 2010.
- (2) GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.
- (3) MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, p. 1-15, 2010.
- (4) KIM, D. H.; CHOI, Y. J.; SONG, S. K.; YUN, J. W. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 369-371, 1997.
- (5) VANKOVÁ, K.; ONDERKOVA, Z.; ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIC, M. Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 375-381, 2008.
- (6) Guido, E. S. **Produção simultânea de  $\beta$ -galactosidase e inulinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2012.
- (7) 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**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.
- (8) 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**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.
- (9) RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. 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.
- (10) AOAC. **Official Methods of Analysis**. 17 ed. AOAC International, Gaithersburg, 2000.
- (11) INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO 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) ROUWENHORST, R. J.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1131-1137, 1988.
- (13) MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- (14) ESPINOZA, P.; BÁRZANA, E.; GÁRCIA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 11, p. 1053-1058, 1992.



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

(15) CHOI, M.H.; JI, G.E.; KOH, K.H.; RYU, Y.W.; JO, D.H.; PARK, Y.H. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 3, p. 251-253, 2002.