



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS**

CAROLINE DOS SANTOS VIANA

**PRODUÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE POR
ASPERGILLUS ORYZAE CULTIVADO EM SORO DE
QUEIJO**

Londrina
2017

CAROLINE DOS SANTOS VIANA

**PRODUÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE POR
ASPERGILLUS ORYZAE CULTIVADO COM SORO DE
QUEIJO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto

Londrina

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
UNOPAR
Biblioteca Unidade Piza**

V667p Viana, Caroline dos Santos

Produção de beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* cultivado com soro de queijo. / Caroline dos Santos Viana. Londrina: UNOPAR, 2017. 57f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados).
Universidade Pitágoras Unopar.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto.

1- Leite - Dissertação de Mestrado - UNOPAR 2- Atividade enzimática.
3- Biomassa. 4- Fermentação. 5- Lactase. 6- Suplementação. I- Suguimoto,
Hélio Hiroshi; orient. II- Universidade Pitágoras Unopar.

CDU 641:577.15

CAROLINE DOS SANTOS VIANA

PRODUÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE POR *ASPERGILLUS ORYZAE* CULTIVADO EM SORO QUEIJO

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área e concentração em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferido pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
UNOPAR

Prof. Dr. Luiz Rodrigo Ito Morioka
UNOPAR

Prof^a. Dr^a. Alessandra Bosso
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de março de 2017.

Dedicatória

À Deus e ao meu marido pelo apoio,
compreensão e força. Sem isso, nada seria
possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar os meus passos até o presente momento e ter me amparado nos momentos mais difíceis, dando-me discernimento e paciência, tornando esse sonho em realidade.

Ao meu esposo pelo apoio, paciência e motivação nas horas de angústias e de escuridão, e principalmente por sempre acreditar em mim e em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto pela orientação, apoio e confiando este trabalho a mim.

Ao Prof. Dr. Luiz Rodrigo Ito Morioka pelo apoio, confiança, conselhos e orientações.

A minha amiga Joyce pelos momentos de desabafos e de desesperos vividas juntas, além das risadas, conversas e descontração.

**“A ciência pode determinar o que é, não o
que deveria ser.”**

Albert Einstein

VIANA, Caroline dos Santos. **Produção de beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* cultivado em soro de queijo**. 2017. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Unidade Piza, UNOPAR, Londrina, 2017.

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea que possui baixo valor comercial e pode ser utilizado para o cultivo de microrganismos. Os produtos derivados desta fermentação como a enzima beta-galactosidase tem elevado valor agregado e é amplamente usada na elaboração de produtos destinados aos indivíduos intolerantes à lactose. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* utilizando como meio de o soro de queijo. Na primeira etapa avaliou-se as condições de cultivo do *Aspergillus oryzae* visando a produção de beta-galactosidase em meio de fermentação contendo soro de queijo desproteínizado suplementado com lactose, glicerol, peptona e extrato de levedura em diferentes pH e temperatura. Na etapa seguinte determinou-se as condições de permeabilização celular e extração de beta-galactosidase do fungo filamentosos. Foi avaliado o efeito do solvente etanol, tempo e temperatura para a permeabilização celular. Já para a extração foram avaliados os níveis do solvente clorofórmio e temperatura. Nos resultados, a melhor condição de cultivo para a produção de beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* em soro de queijo foram: lactose 0,1 g/L; glicerol 1,0 mL/L; peptona 3,0 g/L; e extrato de levedura 0,1 g/L, em pH 6,0 a 28 °C, obtendo 1,75 U/mL de atividade enzimática na biomassa permeabilizada. No processo de permeabilização as melhores condições foram: temperatura de 30 °C, tempo de 90 minutos e concentração de etanol de 25%, obtendo uma atividade enzimática de 0,44 U/mL. Para a extração da enzima com solvente a temperatura ideal foi de 48 °C e 5,3% de clorofórmio, que resultou na atividade enzimática de 0,17 U/mL. Conclui-se que o *Aspergillus oryzae* possui a capacidade de produzir beta-galactosidase quando cultivado em soro de queijo.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Biomassa. Fermentação. Lactase. Suplementação.

VIANA, Caroline dos Santos. **Produção de beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* cultivado em soro de queijo**. 2017. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Unidade Piza, UNOPAR, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Cheese whey is a by-product of the dairy industry that has low commercial value and can be used for the cultivation of microorganisms. The products derived from this fermentation as the enzyme beta-galactosidase has high added value and is widely used in the manufacture of products intended for lactose intolerant individuals. Thus, the objective of this work was to study the production of beta-galactosidase by *Aspergillus oryzae* using as the medium the cheese whey. In the first stage the conditions of *Aspergillus oryzae* cultivation were evaluated aiming the production of beta-galactosidase in fermentation medium containing deproteinized cheese whey supplemented with lactose, glycerol, peptone and yeast extract at different pH and temperature. In the next stage the conditions of cellular permeabilization and beta-galactosidase extraction of the filamentous fungus were determined. The effect of solvent ethanol, time and temperature for cell permeabilization was evaluated. For the extraction, the chloroform solvent levels and temperature were evaluated. In the results, the best culture condition for the production of beta-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in cheese whey were: lactose 0,1 g/L; glycerol 1,0 mL/L; peptone 3,0 g/L; and yeast extract 0,1 g/L, at pH 6,0 at 28 °C, obtaining 1,75 U/mL of enzymatic activity in the permeabilized biomass. In the process of permeabilization the best conditions were: temperature of 30°C, time of 90 minutes and concentration of ethanol of 25%, obtaining an enzymatic activity of 0,44 U / mL. For the extraction of the enzyme with solvent the ideal temperature was 48 °C and 5,3% of chloroform, which resulted in the enzymatic activity of 0.17 U/mL. It is concluded that *Aspergillus oryzae* possesses the ability to produce beta-galactosidase when grown in cheese whey.

Keywords: Biomass. Enzymatic activity. Fermentation. Lactase. Supplementation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
1. OBJETIVOS.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Soro de queijo.....	14
2.2 <i>Aspergillus</i> sp.	14
2.3 Beta-galactosidase.....	15
2.4 Meio de cultivo.....	16
REFERÊNCIAS	18
ARTIGO CIENTÍFICO1	23
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	38
ARTIGO CIENTÍFICO2	41
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um subproduto da fabricação de queijos, que consiste na fração aquosa resultante da precipitação das caseínas, principal proteína do leite. Na composição, o soro possui componentes com elevada carga orgânica, como a lactose, vitaminas, sais minerais, proteínas, cálcio, fosfatos, gerando impactos ambientais (KOSSEVA et al., 2009).

Na indústria, o soro de queijo gera altos custos para o seu tratamento, pois contém elevadas cargas de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio) (PATEL; MURTHY, 2012; KOŚMIDER et al., 2010; ZOU et al., 2013).

A lactose, principal carboidrato presente no leite e no soro de queijo, é classificado como um dissacarídeo, formado por glicose e galactose. Esse açúcar é hidrolisado no intestino delgado, pela beta-galactosidase (PATEL; MURTHY, 2012; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A beta-galactosidase, também conhecida como lactase, hidrolisa o beta-galactopiranosil (Gal β 1-4Glc), resíduo terminal da lactose, liberando os dois monossacarídeos. Esta enzima possui alto potencial para o uso industrial, possuindo aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica. É utilizada para a elaboração de produtos alimentícios com reduzido teor de lactose, melhorando a digestibilidade do leite e de seus derivados. Tanto na indústria farmacêutica como na alimentícia, o seu uso é destinado a pessoas intolerantes à lactose (HUSAIN, 2010).

A produção da beta-galactosidase é realizada por microrganismos específicos em meio de cultura adequado. A suplementação do meio pode ser feita com fontes de carbono, nitrogênio e sais. Variáveis como temperatura, pH, agitação e tempo de incubação são importantes parâmetros para a produção da enzima (BRZOWSKI; LEWANDOWSKA, 2014; NASCIMENTO et al., 2007).

Depois da fermentação, há uma sequência de etapas chamadas de *downstream*, que deve ser realizada para a eliminação das impurezas e purificação do produto. Quando o metabólito é de origem intracelular, a ruptura da célula é a primeira etapa realizada no *downstream*, que permite separar o material sintetizado, para posterior purificação. Vários métodos podem ser utilizados, porém depende da localização e estabilidade das enzimas. Há métodos mecânicos, como homogeneizadores de alta pressão, ondas ultrassônicas e pérolas de vidro. Os

métodos de rompimento químico usam álcalis, detergentes e solventes. Já os enzimáticos consistem da lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular (MEDEIROS, et al., 2008; STRED'ANSKÝ, et al., 1993; KILLIKAN; JÚNIOR, 2001).

É comum o uso de solventes durante a permeabilização celular e a extração enzimática, sendo aplicadas após o processo de clarificação. A permeabilização é um método simples e rápido que permite mensurar a atividade enzimática e sua respectiva hidrólise, tornando as enzimas insolúveis (PANESAR et al., 2007). A extração de enzimas pelo rompimento químico da parede celular, é um método simples e eficiente, não deixa fragmentos de células e não requer altos investimentos com os métodos mecânicos, porém demanda mais tempo, devido às reações químicas (SOMKUTI; STEINBERG, 1994).

Os solventes mais utilizados como agentes permeabilizantes são: o tolueno, éter etílico, etanol e clorofórmio (FLORES; VOGET; ERTOLA, 1994). Esses solventes modificam as estruturas celulares de modo que ocorram desorganizações em seus poros permitindo a passagem de pequenas moléculas, como substratos ou outras moléculas presentes no meio fermentativo que necessita de hidrólise (SOMKUTI; STEINBERG, 1994).

1. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Selecionar uma cepa de *Aspergillus oryzae* e determinar as condições de cultivo para a produção, permeabilização celular e extração da enzima beta-galactosidase.

Objetivo específico:

- Selecionar a cepa de *Aspergillus oryzae* com maior produção de beta-galactosidase;
- Determinar um meio de cultura com soro de queijo suplementado com fontes de carbono e nitrogênio no processo fermentativo para a produção enzimática;
- Determinar as melhores condições de permeabilização das células e extração da enzima beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Soro de queijo

O soro de queijo é um resíduo da fabricação do queijo, é a fração aquosa obtida após a coagulação das caseínas (FOX; McSWEENEY, 1998). Possui baixo valor comercial e pode ser utilizado para o cultivo de microrganismo para fins biotecnológicos (GHALY et al., 2003; LUIZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2008).

O soro possui em média 93% de água, 5% de lactose, 0,7 a 0,9% de proteínas, 0,3 a 0,5% de gorduras. As proteínas do soro são constituídas de, em média, 50% β -lactoglobulina, 25% α -lactalbumina e 25% de outras proteínas. Também possuem minerais e alguns peptídeos hidrolisados de k-caseína (FOX; McSWEENEY, 1998; KOUSHKI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

O componente em maior concentração no soro de queijo é a lactose, dissacarídeo constituído de glicose e galactose, que pode ser encontrada na forma α -lactose e β -lactose. Sua síntese ocorre nas vesículas de Golgi, das células mamárias em lactação na presença da proteína α -lactoalbumina (PATEL; MURTHY, 2012; WALSTRA et al., 2006).

A ingestão desse açúcar pelo ser humano, depois da primeira infância ocorre pelo consumo de leite e derivados. A lactose é hidrolisada pela beta-galactosidase produzida no intestino delgado (FENEMA, 1996; FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA et al., 2006). Em pessoas intolerantes à lactose ocorre uma insuficiência na produção da β -galactosidase e esse dissacarídeo passa para o intestino grosso, causando diarreias, além de fermentações por microrganismos, gerando flatulências, dores abdominais, náuseas e diarreias (SUAREZ et al., 2016).

2.2 *Aspergillus* sp.

Diversos microrganismos são utilizados para a produção de enzimas, como os fungos. A temperatura ótima para crescimento desses microrganismos, fungos filamentosos e leveduras, é entre 25-37°C. Temperaturas acima ou abaixo dessa faixa pode gerar um stress, gerando baixa produção de enzima (ABDEL-BANAT et al., 2010; FOX; McSWEENEY, 1998).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados em processos fermentativos. Além de saprófitos e termotolerantes, são capazes de se desenvolver em temperaturas entre 12 °C a 50 °C. Não são exigentes quanto ao seu habitat e

podem ser encontrados em ambientes com baixa umidade, em solos, substratos orgânicos e inorgânicos (FOLEY et al., 2014; KRIJGSHELD et al., 2013)

O gênero *Aspergillus* possui inúmeras espécies. Há os patogênicos, como *A. fumigatus* e *A. terreus*, e os produtores de toxinas *A. flavus* e *A. parasiticus*. Já as espécies industriais incluem o *A. niger*, *A. aculeatus* e *A. oryzae*, sendo esta última a mais utilizada (MEIJER et al., 2011). A grande utilização do *Aspergillus oryzae* é devido a habilidade de secretar várias enzimas hidrolíticas como a beta-galactosidase, a celulase, a xilanase e a pectinase (HU et al., 2011). Essas enzimas podem ser utilizadas na fabricação de produtos farmacêuticos e na elaboração de alimentos lácteos com baixo teor de lactose, além de promover a fermentação de alguns alimentos, como molho de soja, sake e vinagre (BAZARAA et al., 2016; MACHIDA et al., 2008).

2.3 Beta-galactosidase

A enzima beta-galactosidase (β -D-galactoside-galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é uma proteína que pode ser produzida por microrganismos em fermentações utilizando o soro de queijo como meio de cultivo. É conhecida também como lactase e classificada como hidrolases, sendo capaz de catalisar o β -galactopiranosil (Gal β 1-4Glc), resíduo terminal da lactose (SANTIAGO, 2004).

A lactase pode ser encontrada em plantas, animais, e em vários microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Porém a Resolução RDC nº 26, de 26/05/2009, estabelece que esta enzima só possa ser utilizada na indústria alimentícia quando extraídas dos microrganismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ou *Saccharomyces sp.* (AEHLE, 2004; BRASIL, 2009).

Além de hidrolisar a lactose, a beta-galactosidase é capaz de produzir oligossacarídeos ou metabólitos secundários. É amplamente utilizado pela indústria com aplicações no setor alimentício e farmacêutico, destinado a pessoas intolerantes à lactose (HUSAIN, 2010).

A beta-galactosidase é um catalisador de processos biológicos, portanto é necessário conhecer o pH ótimo e a sua estabilidade. Os fatores como temperatura, agitação e concentração de componentes ou íons, podem gerar inativação da enzima e alterar a sua estabilidade (AEHLE, 2004; JURADO et al.,

2004).

A utilização de enzimas fúngicas possuem vantagens para a indústria láctea, quando comparadas com as enzimas produzidas por leveduras, pois são mais eficiente em pH menor, portanto mais eficazes na hidrólise da lactose em produtos ácidos (HUSAIN, 2010; PANESAR et al., 2010).

2.4 Meio de cultivo

O cultivo de microrganismos requer meios adequados e nem sempre o meio com maior crescimento celular é o mais adequado para a produção de enzimas (GHATAK, 2016).

A suplementação do meio pode ser realizada com produtos simples e de baixo custo, como resíduos industriais. São exemplos de resíduos o soro de queijo, água de maceração de milho, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo da semente do algodão, resíduo líquido da fabricação de cervejas (BRZOZOWSKI; LEWANDOWSKA, 2014; CASTRO et al., 2016; MAITI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2007; OBEROI et al., 2008).

Há outras fontes de suplementação muito utilizadas, como a dextrose, maltose, sacarose, que são fontes de carbono. A peptona, glicina, nitrato de potássio e de sódio, fontes de nitrogênio. De acordo com Montarroyos et al. (2007) e Brzozowski e Lewandowska (2014), trabalharam com fungo fitopatogênico e cepas de bactérias produtoras de ácido láctico, respectivamente. Os autores observaram um maior crescimento quando foi utilizada a maltose combinada com peptona. Já Montarroyos et al. (2007) obtiveram bons resultado de crescimento microbiano utilizando a dextrose e a sacarose.

A utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio quando combinadas ao soro de queijo tem demonstrado pouca eficiência para o crescimento de microrganismos e também na produção da enzima beta-galactosidase. Por outro lado a utilização de extrato de levedura e extrato de carne (fontes orgânicas de nitrogênio) tem provado ser uma alternativa eficiente para a produção da enzima (MANERA et al., 2011; RAO; DUTTA, 1977; SONAWAT et al., 1981, SOPANDI et al., 2013).

O pH do meio de cultivo é importante e tem uma influência significativa no crescimento e produção de enzimas, e pode afetar as células dos microrganismos desde o funcionamento de suas enzimas até ao transporte de nutrientes para as células (PANESAR et al., 2010).

A temperatura ideal para máxima atividade da lactase irá depender de sua origem. Beta-galactosidases provenientes de fungos filamentosos possuem uma temperatura ideal entre 50-55 °C, enquanto as de leveduras possuem a faixa de temperatura ideal próximo de 25-30 °C, sendo que acima de 40 °C pode haver desnaturação enzimática (ANSARI; HUSAIN, 2012).

REFERÊNCIAS

ABDEL-BANAT, B. M. A. et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861 – 867, 2010.

AEHLE, W. Industrial enzymes. In: AEHLE, W. **Enzymes in industry: production and application**. 2. ed. Mörlenbach: Wiley-VCH, 2004. p. 143-145

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilizes *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 351-359, 2012.

BAZARAA, W. et al. Purification and characterization of extracellular glutaminase from *Aspergillus oryzae* NRRL 32567. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 76-81, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria colegiada. Resolução RDC Nº 26. Enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano, conforme a sua origem - enzimas de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 maio 2009.

BRZOZOWSKI, B.; LEWANDOWSKA, M. Prolylendopeptidase: optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 204 – 210, 2014.

CASTRO, R. J. S. et al. Biochemical characterization of solvent, salt, surfactant and oxidizing agent tolerant proteases from *Aspergillus niger* produced in different agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 94-98, 2016

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Taylor & Francis, 1996.

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

FOLEY, K. et al. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 203-210, 2014.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; AVERY, A. Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 741-749, 2003.

GHATAK, A. β -Galactosidase from *Enterobacter cloacae*: production, characterization and purification. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 492-502, 2016.

HU, H. L. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248-252, 2011.

HUSAIN, Q. β -Galactosidase and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

JURADO, E. et al. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33-40, 2004.

KOŚMIDER, A. et al. Propionic Acid Production by *Propioni bacterium freudenreichii* spp. *Shermanii* Using Crude Glycerol and Whey Lactose Industrial Wastes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 6, p. 1249 – 1253, 2010.

KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 614-619, 2012.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.

LUIZ, L. M. P. et al. Conservação à temperatura ambiente de uma bebida a base de soro de leite envasada a quente. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2090-2094, 2014.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. **DNA Research**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MAITI, S. et al. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 217-226, 2016.

MANERA, A. P. et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 155 - 161, 2011.

MEDEIROS, F. O. et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para o uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEIJER, M. et al. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p. 19-30, 2011.

MONTARROYOS, A. V. V. et al. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 86-89, 2007.

NASCIMENTO, W. C. A. et al. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.

OBEROI, H. S.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1499-1504, 2008.

OLIVEIRA, C. M. et al. Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. **Boletim do Ceppa**, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2008.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, 2012.

PANESAR, P. S. et al. Permeabilization of yeast cells with organic solvents for β -galactosidase activity. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2007.

PANESAR, P. S. et al. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PATEL, S. R.; MURTHY, Z. V. P. Lactose Recovery Processes from Whey: A comparative Study Based on Sonocrystallization. **Taylor & Francis. Separation & Purification Reviews**, v. 41, n. 4, p. 251-266, 2012.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

RAO, M. V. R.; DUTTA, S. M. Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 185-188, 1977.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

STRED'ANSKÝ, M. et al. Optimization of β -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 12, p. 1063-1065, 1993.

SOMKUTI, G. A.; STEINBERG, D. H. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of beta-galactosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 573-576, 1994.

SONAWAT, H. M.; AGRAWAL, A.; DUTTA, S. M. Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* Grown on Whey. **Folia Microbiologica**, v. 26, n. 5, p. 370-376, 1981.

SOPANDI, T. et al. Utilization and optimization of a waste stream cellulose culture medium for pigment production by *Penicillium* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 733-745, 2013.

SUAREZ, F. et al. Food intolerance: Lactose intolerance. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 2634-2642, 2016.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

ZOU, J. et al. Construction of lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* for lactose fermentation into ethanol fuel. **Genetics and Molecular Biology of Industrial organisms**, v. 40, n. 3, p. 353-363, 2013.

ARTIGO CIENTÍFICO1

PRODUÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO SORO DE QUEIJO

VIANA, C. S^{1.}; MORIOKA, L. R. I.^{2.}; SUGUIMOTO, H. H.^{3*}

1 Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR.

2 Doutor em Ciência dos Alimentos. PNPd do Programas de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR.

3 Doutor em Ciência de Alimentos. Docente do Programas de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR. *Autor correspondente. E-mail: helio.suguimoto@unopar.br

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea que possui baixo valor comercial e pode ser utilizado no cultivo de microrganismos para fins biotecnológicos. Os produtos derivados desta fermentação, como a enzima beta-galactosidase tem elevado valor agregado e é amplamente usada na elaboração de produtos destinados aos indivíduos intolerantes à lactose. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do meio de cultivo contendo soro de queijo e suplementos na produção da enzima beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae*. A composição do meio de cultivo foi estabelecida utilizando o delineamento experimental de Box, Hunter & Hunter. O meio foi composto por soro de queijo desproteínizado, lactose, glicerol, peptona e extrato de levedura em diferentes pHs. Para determinar os efeitos dos tratamentos na produção da beta-galactosidase, foi determinada a atividade enzimática pelo método das taxas de hidrólise. A melhor condição para a beta-galactosidase por *Aspergillus oryzae* em soro de queijo suplementado foram: lactose e extrato de levedura (0,1 g/L), glicerol (1,0 mL/L), peptona (3,0 g/L) em pH 6,0 a 28 °C, obtendo uma produção de biomassa de 7,70 g/L e uma atividade enzimática na biomassa permeabilizada de 1,75 U/mL, o que correspondeu 68,1% de hidrólise de uma solução de lactose. A cepa selecionada para estudo, *Aspergillus oryzae* CCT 0977, demonstrou-se produtora da enzima beta-galactosidase, sendo esta capaz de proporcionar hidrólise da lactose.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Biomassa. Fermentação. Lactase. Suplementação.

ABSTRACT

Cheese whey is a by-product of the dairy industry that has low commercial value and can be used in the cultivation of microorganisms for biotechnology purposes. Products derived from this fermentation, such as the beta-galactosidase enzyme, have high added value and are widely used in the manufacture of products intended for lactose intolerant individuals. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of temperature and culture medium containing whey and supplements on the production of the enzyme beta-galactosidase of *Aspergillus oryzae*. The composition of the culture medium was established using the experimental design of Box, Hunter & Hunter. The medium was composed of deproteinized cheese whey, lactose, glycerol, peptone and yeast extract at different pH. To determine the effects of the treatments on beta-galactosidase production, the enzymatic activity was determined by the hydrolysis rate method. The best condition for *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase in whey supplemented were: lactose and yeast extract (0,1 g/L), glycerol (1,0 mL/L), peptone (3,0 g/L) at pH 6,0 at 28 °C, obtaining a biomass production of 7,70 g/L and an enzymatic activity in the permeabilized biomass of 1,75 U/mL, corresponding to 68,1% hydrolysis of a solution of lactose . The strain selected for study, *Aspergillus oryzae* CCT 0977, was shown to be a producer of the enzyme beta-galactosidase, which is capable of providing hydrolysis of lactose.

Keywords: Biomass. Enzymatic activity. Fermentation. Lactase. Supplementation.

1. INTRODUÇÃO

O soro é o resíduo da fabricação do queijo, formado por uma fração aquosa, devido à coagulação da caseína (FOX; McSWEENEY, 1998). Estima-se que mundialmente são produzidos 165 milhões de toneladas de soro. A elevada carga orgânica o torna altamente poluente aumentando os custos de tratamento para a indústria (CARVALHO et al., 2013).

Nas últimas décadas as indústrias lácteas têm usado diversas tecnologias para processar o soro e separar os componentes de interesse comercial, como ingrediente funcional, uso em produtos médicos e farmacêuticos, além da utilização para fins biotecnológicos (MACWAN et al., 2016). O uso na biotecnologia é atrativo por ser uma matéria-prima de baixo custo e elevado valor nutricional, podendo ser utilizado como fonte de crescimento de microrganismo (DRAGONE et al., 2011).

O soro de queijo é utilizado como matéria prima em processos fermentativos para a produção de diversos metabólitos. A enzima beta-galactosidase é um exemplo amplamente usado na indústria láctea para a elaboração de produtos de baixo teor de lactose (OBEROI et al., 2008). Esta enzima pode ser encontrada em plantas, animais, e em vários microrganismos como bactérias, leveduras e alguns fungos (ANSARI; HUSAIN, 2012).

A produção de enzimas requer um meio de cultivo adequado contendo fonte de carbono, nitrogênio, sais e pH. Contudo nem sempre o meio para a produção enzimática será o mesmo para o crescimento celular (GHATAK, 2016).

A suplementação é uma alternativa para melhorar a fermentação e pode ser realizada com produtos simples e de baixo custo, como resíduos industriais. Assim, o soro de queijo, água de maceração de milho, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo da semente do algodão, resíduo líquido da fabricação de cervejas, são resíduos adequados para fermentação (BRZOZOWSKI; LEWANDOWSKA, 2014; CASTRO et al., 2016; MAITI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2007; OBEROI et al., 2008).

Assim, pela importância da enzima beta-galactosidase na indústria alimentícia e de fármacos, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção da enzima beta-galactosidase obtida pela fermentação por *Aspergillus oryzae* em meio de fermentação contendo soro de queijo com adição de nutrientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas oito cepas de *Aspergillus oryzae* obtidas da Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropicais (CCT), denominadas 0976, 0977, 0978, 0979, 0980, 4359, 5321 e 5677.

As culturas foram mantidas em tubos inclinados com PDA (Potato Dextrose Ágar, Acumedia®, Brasil) e armazenadas a 4 °C. Para o preparo do inóculo foi transferido 1×10^6 esporos/mL em uma solução salina 0,85% com 1% de Tween 80.

O soro de queijo em pó dissolvido em água destilada na concentração de 5% (p/v), seguido da adição de ácido láctico 85% até pH 4,6 e aquecido por 30 minutos a 90 °C. Em seguida, foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1 para a remoção da fração proteica. Quando necessário a correção do pH, foi utilizada uma solução de NaOH 50%. A pasteurização foi realizada a 65 °C por 30 minutos. Após resfriar foi adicionado 1% (v/v) de inóculo.

2.1 Seleção das cepas de *Aspergillus oryzae*

O estudo visou selecionar a cepa de *Aspergillus oryzae*, capaz de produzir níveis mais elevados da beta-galactosidase. Os cultivos das oito cepas foram em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio com soro de queijo desproteínizado, durante 5 dias, a 28 °C e 120 rpm. Após a adição do inóculo os frascos foram incubados em agitador orbital a 120 rpm (Tecnal®, TE-420, Brasil). O cultivo foi realizado em duplicata. Decorrido o tempo de fermentação foram realizadas as análises de determinação de lactose e glicose residual, atividade enzimática e biomassa.

2.2 Efeito da temperatura no crescimento de *Aspergillus oryzae* e na produção da enzima beta-galactosidase

O *Aspergillus oryzae* CCT 0977 foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de soro de queijo desproteínizado com pH 5,0. Após, foi adicionado 1% (v/v) de inóculo e incubados em agitador orbital (Tecnal®, TE-420, Brasil) a 120 rpm durante 5 dias, nas temperaturas de 28 °C e 32 °C, em duplicata. As coletas das amostras foram realizadas a cada 24 horas para determinações de lactose residual, atividade enzimática e produção de biomassa.

2.3 Suplementação do soro de queijo para o cultivo de *Aspergillus oryzae* e produção da enzima beta-galactosidase

Na suplementação do soro de queijo para o cultivo do *Aspergillus oryzae* CCT 0977 foram utilizados a lactose, glicerol, peptona, extrato de levedura, em diferentes pH, conforme descritos na Tabela 1. O delineamento utilizado foi o Box, Hunter & Hunter.

Tabela 1. Cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio de fermentação contendo 5% de soro de queijo e suplementado, onde X₁ (lactose), X₂ (glicerol), X₃ (peptona), X₄ (extrato de levedura), X₅ (pH), tendo como variáveis resposta produção da enzima beta-galactosidase, biomassa e consumo de lactose.

Variáveis codificadas e decodificadas					
	X ₁ (g/L)	X ₂ (mL/L)	X ₃ (g/L)	X ₄ (g/L)	X ₅
Níveis	Lactose	Glicerol	Peptona	Extrato de Levedura	pH
-1	0,1	5,0	0,4	0,3	5,0
0	0,3	7,0	0,6	0,6	6,0
+1	0,5	9,0	0,8	0,9	7,0

O cultivo foi realizado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio. As condições de fermentação foram: 28 °C, 120 rpm durante 5 dias. Ao final da fermentação, a cultura foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1, e a biomassa e o sobrenadante foram utilizadas nas análises de lactose residual, atividade enzimática e biomassa.

2.4 Cultivo de *Aspergillus oryzae* e produção da enzima beta-galactosidase em meio padronizado

Baseado nos resultados do experimento anterior foi aplicado o método Steepest ascent (descent), para estabelecer as condições ótimas de fermentação para as variáveis: produção da enzima beta-galactosidase, consumo de lactose e produção de biomassa.

Foram estabelecidas as seguintes concentrações: lactose (0,1 g/L), glicerol (0,1 mL/L), peptona (3,0 g/L), extrato de levedura (0,1 g/L) e pH (6,0). O cultivo foi novamente realizada durante 5 dias, com agitação de 120 rpm na temperatura de 28°C, em duplicata. A coleta das amostras foi realizada a cada 24 horas e realizadas

as determinações analíticas de lactose residual, atividade enzimática e biomassa.

2.5 Determinações analíticas

2.5.1 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática requer, numa primeira etapa, a permeabilização das células do fungo, onde as células foram ressuspensa em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,8), utilizando etanol 25% (v/v) e incubadas a 30 °C durante 90 minutos em banho-maria. Após o tempo de incubação, as células permeabilizadas foram centrifugadas por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas e ressuspensa no tampão. Após esse processo a biomassa permeabilizada foi utilizada na determinação da atividade enzimática.

Na segunda etapa a atividade enzimática foi determinada em uma solução de lactose a 10,0 g/L, preparada em tampão citrato-fosfato 0,1M e pH 6,5. Foi adicionado 30% (v/v) de biomassa permeabilizada e incubado a 47 °C “overnight”, seguido de inativação da enzima a 90 °C por 5 minutos. A quantificação da glicose foi realizado pelo kit glicose-oxidase enzimático-colorimétrico (Bioliqid®). O cálculo da atividade enzimática (AE): $AE = \frac{CGA}{180} \times 1000 \div TH$

Onde: AE= atividade enzimática (UGI/mL)
 CGA = concentração de glicose na amostra
 TH = tempo de hidrólise (minutos)

A unidade de atividade usada no trabalho foi Unidade de Glicose produzida por minuto, por mililitro de suspensão enzimática (UGI/mL), definida como sendo μ mol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática.

2.6.2 Determinação da lactose

O método utilizado foi descrito por Nickerson, Vujicic e Lin (1975) que é baseado na reação colorimétrica da lactose com a metilamina em uma solução alcalina quente, formando um composto vermelho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540nm. Foi analisado o teor de lactose inicial e final, após a fermentação.

2.6.3 Determinação da biomassa

Ao término da fermentação, foi realizada uma filtração a vácuo,

obtendo-se a biomassa. A biomassa foi quantificada gravimetricamente com o peso seco das células, que foi transferida para cadinhos de porcelana previamente tarados e colocados em estufa a 105 °C até o alcance de peso constante. O valor (g/L) foi dado pela diferença de peso (g) inicial e final dos cadinhos.

2.6.4 Análise estatística

A padronização do meio de cultivo para aumento na produção de beta-galactosidase foi realizado utilizando o software disponível, Statistica 6.0 (Statsoft®, USA), através do desenho experimental Box Hunter & Hunter, e os resultados foram analisados pelos efeitos de cada variável independente sobre a resposta analisada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das cepas de *Aspergillus oryzae* para produção de beta-galactosidase

As cepas de *Aspergillus oryzae*: CCT 0976, CCT 4359, CCT 0979, CCT 5321, CCT 5677, CCT 0980, CCT 0978, CCT 0977, foram cultivadas em meio de fermentação contendo soro de queijo. Foi avaliada a produção de biomassa, teor de glicose, lactose residual no meio fermentativo e a atividade enzimática no sobrenadante da fermentação (Tabela 2).

O meio com soro de queijo desproteínizado continha, inicialmente, 36 g/L de lactose. O maior consumo de lactose, após a fermentação, ocorreu com a cepa 5677, com 22,0 g/L de lactose residual, o que corresponde a 38,8% de consumo. A produção mais elevada de biomassa foi de 3,41 g/L pela cepa CCT 0977, já a menor produção de biomassa (0,57 g/L) ocorreu com a cepa CCT 0976. Os valores observados para a produção de biomassa são inferiores quando comparado a outros trabalhos. Assim, Meneghel et al. (2014) obteve uma massa celular de 14,2 g/L em fermentação com *Aspergillus oryzae* IPT-301, em cultivo submerso. Knuf et al. (2013) realizaram uma fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* NRRL 3488, numa temperatura de 34°C e agitação de 250 rpm, obtendo uma biomassa de 8,5 g/L.

A maior produção de enzima beta-galactosidase foi pela cepa CCT 0977 com uma atividade de 0,21 U/mL, seguida das cepas CCT 4359 e CCT 5321 com atividade, de 0,16 U/mL. Os valores encontrados estão próximo ao obtido por

Natarajan et al. (2012), onde trabalharam com uma cepa de *Bacillus* obtendo uma atividade enzimática de 0,16 U/mL na temperatura de 28 °C.

Assim, a cepa selecionada foi a CCT 0977, que apresentou maior produção de biomassa, atividade enzimática e conseqüentemente uma concentração de glicose residual mais elevada em comparação com as demais cepas estudadas.

Tabela 2. Seleção das cepas de *Aspergillus oryzae*, em relação à produção de biomassa, glicose residual, consumo de lactose e atividade da enzima beta-galactosidase.

Cepas	Respostas			
	Biomassa (g/L)	Glicose Residual (g/L)	Lactose residual (g/L)	Atividade enzimática (U/mL)
0976	0,57 ^h	0,12 ^f	27,2 ^g	0,03 ^d
4359	3,15 ^b	0,67 ^c	22,9 ^b	0,16 ^b
0979	1,62 ^d	0,01 ^h	23,5 ^c	0,02 ^e
5321	1,79 ^c	1,30 ^b	26,4 ^e	0,16 ^b
5677	1,49 ^e	0,09 ^g	22,0 ^a	0,03 ^d
0980	1,37 ^f	0,45 ^d	33,6 ^h	0,11 ^c
0978	0,97 ^g	0,14 ^e	27,0 ^f	0,02 ^e
0977	3,41 ^a	2,45 ^a	23,9 ^d	0,21 ^a

* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância. Para estes fins, foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias Tukey com $p < 0,05$.

3.2 Efeito da temperatura no crescimento de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 e na produção da enzima beta-galactosidase

O crescimento do fungo filamentososo foi avaliado pela produção de biomassa ao final de cinco dias de cultivo. Houve diferença significativa com valores de 1,77 g/L e 0,71 g/L de biomassa nas temperaturas de 28 °C e 32 °C, respectivamente

O consumo de lactose do soro de queijo foi proporcional ao crescimento do fungo e o maior valor ocorreu na temperatura de 28 °C com um valor residual de 23,2 g/L de lactose, o que corresponde a um consumo de 40,05% do açúcar. A 32 °C o consumo de lactose foi menor com 30,3%, que equivale a uma concentração final de 26,9 g/L de lactose.

A atividade da enzima beta-galactosidase no sobrenadante da

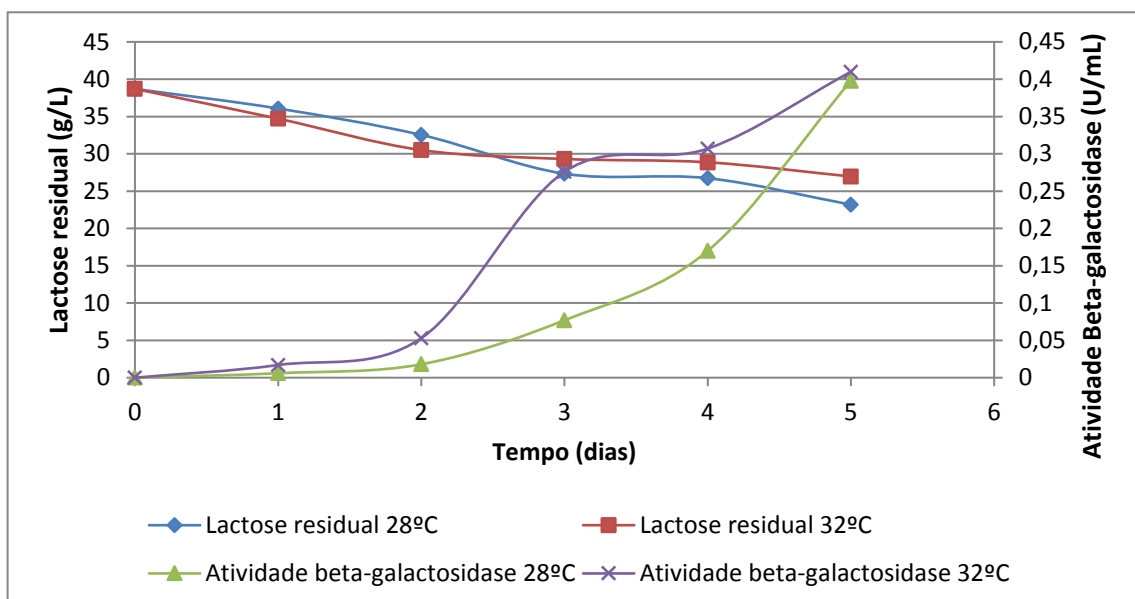
fermentação à 32 °C foi de 0,410 U/mL e a 28 °C foi menor com 0,398 U/mL, Figura 1. Embora as curvas de atividade enzimática sejam diferentes, os valores finais não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% (Figura 1).

O efeito da temperatura de cultivo do microrganismo e produção de enzimas foram avaliadas por diversos autores, os quais obtiveram valores próximos aos testados neste estudo. Nizamunddin et al. (2006) utilizaram *Aspergillus oryzae* em fermentação em meio sólido, na temperatura entre 20 a 45 °C, definindo 30 °C como a melhor para a produção de beta-galactosidase. A mesma temperatura foi definido por Sem et al. (2012), em fermentação submersa com *Aspergillus alliaceus*, obtendo uma atividade de 0,0486U/mL.

Assim, de acordo com os resultados, a temperatura selecionada foi a de 28 °C, onde se obteve melhores resultados nas respostas de produção de biomassa e consumo de lactose, em comparação à temperatura de 32 °C. A temperatura de 28 °C foi a mesmo definida por Rudravaram et al. (2006) onde estudaram a faixa de temperatura de 25 a 30 °C, constatando que 28°C é a temperatura ótima de incubação de *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de arroz.

De acordo com a literatura, a faixa ideal de temperatura para microrganismos como fungos filamentosos e leveduras está entre 25 °C a 37 °C (ABDEL-BANAT et al., 2010).

Figura 1. Efeito da temperatura na produção de beta-galactosidase, biomassa e consumo de lactose por *Aspergillus oryzae* CCT 0977, em soro de queijo 5% com pH 5,0, durante 5 dias a 120 rpm.



3.3 Suplementação do meio de fermentação para cultivo de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 e produção de beta-galactosidase

Avaliou-se o efeito da suplementação do meio de cultivo com fontes de carbono e nitrogênio, que incluem: lactose, glicerol, peptona, extrato de levedura e variação de pH, visando aumentar a produção da enzima beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

O experimento constituiu-se de um delineamento Box Hunter & Hunter, com 16 corridas, e repetição em triplicata do ponto central, totalizando 19 ensaios.

A atividade enzimática obtida variou de 1,38 U/mL a 0,16 U/mL, na biomassa permeabilizada (Tabela 3). A peptona apresentou um efeito positivo para a atividade enzimática, isso se pressupõe que se percorrer dentro da faixa testada de peptona do nível -1 para o nível + 1 haverá uma maior atividade enzimática.

Na Tabela 3, observa-se também a diferença entre a atividade no sobrenadante da fermentação e da biomassa permeabilizada. Durante a fermentação é notável, em todas as corridas do desenho experimental, a liberação de pequena quantidade de beta-galactosidase para o meio, porém a maior quantidade de enzima se encontra dentro da biomassa produzida pelo fungo, que após a permeabilização proporcionou um aumento de 97,1% na atividade enzimática referente à corrida 18.

Tabela 3. Delineamento estatístico para o cultivo de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 em meio de fermentação contendo soro de queijo (5%) com adição de lactose (X₁), glicerol (X₂), peptona (X₃), extrato de levedura (X₄) em diferentes pH (X₅).

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Variáveis Respostas			
						Atividade enzimática sobrenadante fermentação (U/mL)	Atividade enzimática biomassa permeabilizada (U/mL)	Lactose residual (g/L)	Massa celular (g/L)
						1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	0,04	0,30	24,15	3,93
3	-1	+1	-1	-1	-1	0,05	0,47	27,89	6,09
4	+1	+1	-1	-1	+1	0,04	0,16	16,79	3,66
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,04	0,87	16,43	4,74
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,05	0,56	16,78	5,56

7	-1	+1	+1	-1	+1	0,08	0,79	30,32	6,78
8	+1	+1	+1	-1	-1	0,07	0,30	24,88	6,05
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,03	0,69	16,43	5,04
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,03	0,18	14,62	4,61
11	-1	+1	-1	+1	+1	0,06	0,52	15,60	5,01
12	+1	+1	-1	+1	-1	0,02	0,57	29,30	6,30
13	-1	-1	+1	+1	+1	0,06	0,35	14,69	5,87
14	+1	-1	+1	+1	-1	0,06	0,48	29,12	2,41
15	-1	+1	+1	+1	-1	0,07	0,29	16,54	4,54
16	+1	+1	+1	+1	+1	0,04	0,53	22,70	5,14
17*	0	0	0	0	0	0,02	1,23	24,77	5,39
18*	0	0	0	0	0	0,04	1,38	24,44	5,65
19*	0	0	0	0	0	0,07	1,29	18,21	5,27

O maior consumo de lactose, ocorreu na corrida 10, de 36,0 g/L para 14,62 g/L, após cinco dias de cultivo. O delineamento demonstrou que a concentração de extrato de levedura e o pH exerceram um efeito negativo. Já a lactose, o glicerol e a peptona desempenharam um efeito positivo no consumo da lactose (Tabela 4). Para potencializar o consumo de lactose pelo fungo filamentososo seria necessário deslocar a faixa testada do extrato de levedura e do pH do nível +1 para o nível -1.

A lactose e o extrato de levedura apresentaram um efeito negativo na produção de biomassa, enquanto o glicerol, a peptona e o pH tiveram um efeito positivo (Tabela 4). A produção de biomassa variou de 6,78 g/L a 2,41 g/L, uma diferença de 64,4% (Tabela 3).

Tabela 4. Efeito estimado das variáveis independentes na resposta de atividade enzimática da biomassa permeabilizada, consumo da lactose e biomassa.

Variáveis	Efeitos Estimados		
	Atividade enzimática na biomassa permeabilizada	Lactose residual	Biomassa
Lactose	-0,1703	1,9851	-0,5481
Glicerol	-0,0353	3,3811	0,9246
Peptona	0,1020	0,2628	0,3066
Extrato de levedura	-0,0429	-2,8735	-0,2351

pH	-0,0508	-3,5624	0,1918
Standard error	0,175362	0,734685	0,242689
t-value	3,435383	29,26515	20,82611
p-value	0,041375	0,000088	0,000000

3.4 Cultivo de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 e produção de beta-galactosidase em meio padronizado

Baseado nos resultados dos efeitos obtidos pelo delineamento apresentado na Tabela 3 e 4, o método steepest ascent (descent) foi aplicado para definir as concentrações das variáveis independentes (lactose, glicerol, peptona, extrato de levedura e pH) para obter melhores resultados nas variáveis dependentes (atividade enzimática, biomassa e consumo de lactose).

Na Figura 2, observa-se a produção de biomassa, atividade da enzima beta-galactosidase e a concentração de lactose residual durante os cinco dias de fermentação no meio padronizado contendo: lactose (0,1g/L), glicerol (1,0 mL/L), peptona (3,0 g/L), extrato de levedura (0,1 g/L) em pH 6,0, numa agitação de 120 rpm durante 5 dias.

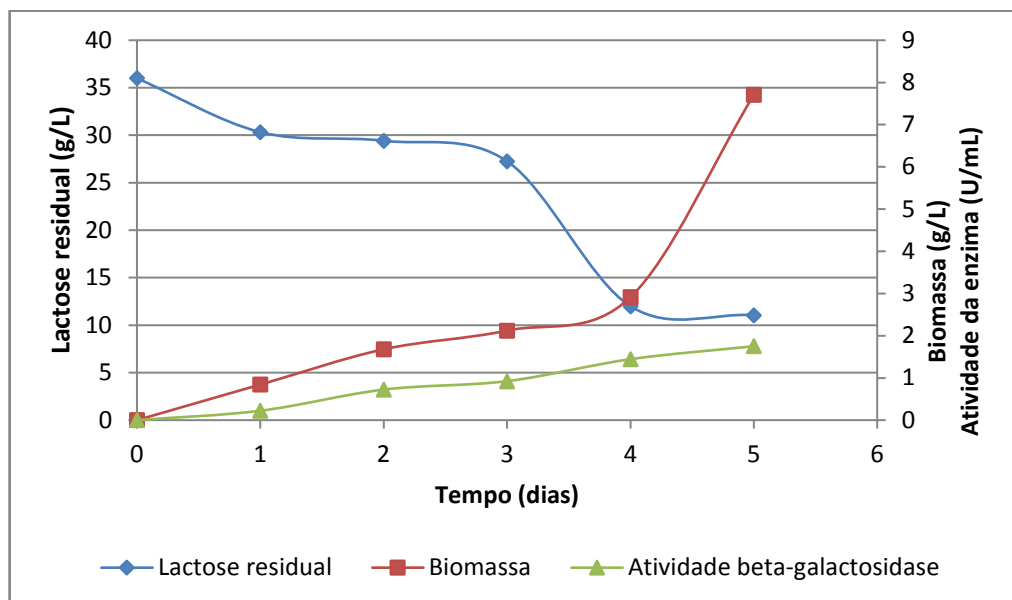


Figura 2. Cinética de crescimento de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 em soro de queijo 5% suplementado.

A atividade da beta-galactosidase neste meio foi de 1,75 U/mL, e apresentou uma concentração de lactose residual de 11,1 g/L, (69,3% de consumo) um aumento de 13,4% em relação ao melhor consumo obtido no desenho experimental anterior (Tabela 3).

A massa celular produzida no meio padronizado foi de 7,70 g/L, um aumento de 13,57% em comparação à corrida de número 7, que foi de 6,78 g/L (Tabela 3). Os valores de biomassa produzida por *Aspergillus oryzae* encontrado na literatura diferem se muito dependendo do pH e composição do meio de fermentação. Meneghel et al. (2014) obteve uma produção de biomassa de 14,2 g/L em apenas 30 horas de cultivo submerso com o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando extrato líquido de farelo de trigo.

Fontes de nitrogênio para a produção de biomassa foram estudadas por Knuf et al. (2013), no qual analisaram o efeito da adição de 6,0 g/L de peptona bacteriológica e 1,4 g/L de sulfato de amônio na produção de biomassa numa fermentação submersa com *Aspergillus oryzae* NRRL 3488, com uma agitação de 250 rpm na temperatura de 34°C. Obtiveram uma produção de biomassa de 8,5 g/L com o uso da peptona bacteriológica, um aumento de 9,41% em relação ao obtido no presente estudo (7,70 g/L), utilizando o dobro da concentração de peptona bacteriológica. O suplemento do meio de fermentação com sulfato de amônio originou uma biomassa de 6,0 g/L.

As fontes de carbono são essenciais para a produção de beta-galactosidase, no entanto, essas fontes apresentaram efeitos negativos na atividade da enzima (Tabela 4), devido a isto, foi necessário reduzir as concentrações de lactose e glicerol para a definição do meio final.

Alguns autores relatam a influência de diversas fontes de suplementação durante as fermentações. Panesar et al. (2016) utilizaram alguns sais, lactose, peptona e extrato de levedura, obtendo uma atividade máxima da beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* NCIM 1212 de 0,5 U/mL, numa temperatura entre 45-50 °C, valor abaixo ao encontrado no presente estudo.

Já Kaur et al. (2015), realizaram uma fermentação em meio de cultivo contendo soro de queijo suplementado com 0,5% de extrato de levedura numa temperatura de 28 °C e obtiveram uma atividade próxima de 2,5 U/mL, 30% maior em comparação à quantificada neste experimento, de 1,75 U/mL. Sharma e Singh (2014) empregaram uma bactéria isolada da coalha, e obtiveram a maior atividade da beta-

galactosidase, de 0,2 U/mL com uso de amido como fonte de carbono, e de 0,05 U/mL utilizando a lactose. Natarajan et al. (2012) obteve a melhor atividade da enzima, de 0,3 U/mL, empregando xilose como fonte de carbono, enquanto a lactose proporcionou 0,24 U/mL de atividade.

Fontes orgânicas ou inorgânicas de nitrogênio são importantes para o desenvolvimento dos microrganismos. A Tabela 4 mostra o efeito destas fontes durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* CCT 0977. A influência do nitrogênio no meio de fermentação foi estudo por Nizamuddin et al. (2006), verificaram alterações importantes na atividade enzimática. Quando houve a adição de peptona no meio de cultivo, houve um aumento de 258,25% na atividade da enzima. No presente estudo, o aumento da concentração da peptona proporcionou um aumento da atividade enzimática em 26,81%. Além da produção de beta-galactosidase, a peptona é considerada como alternativa de fonte de nitrogênio para a síntese de outras enzimas.

Sharma e Singh (2014) obtiveram maior atividade enzimática utilizando extrato de carne e amido (0,212 U/mL), enquanto o uso da peptona proporcionou uma atividade enzimática próximo de 0,035U/mL, valores relativamente abaixo em comparação ao presente estudo, 1,75 U/mL.

Ghatak (2016) obteve a maior atividade enzimática utilizando nitrato de sódio 0,2%, e o uso de extrato de levedura e peptona reduziu a atividade em 12,93% e 47,76%, respectivamente. Verificou também que o uso de aminoácidos no meio de cultivo tem efeito potencializador no crescimento do microrganismo.

De acordo com a Tabela 4, o efeito do pH no consumo de lactose e produção de biomassa apresentaram efeito positivo, e para a atividade da enzima negativo. Definiu-se então, utilizar um pH intermediário aos testados no delineamento (Tabela 3), ou seja, pH 6,0.

O efeito do pH foi estudado por Nizamuddin et al. (2006), onde a maior atividade de beta-galactosidase encontrada foi em pH 5,0. Constataram também que a atividade da enzima se reduz gradativamente até atingir o pH 8,0. Sem et al. (2012) verificou a máxima produção de beta-galactosidase pelo fungo *Aspergillus alliaceus* em um pH 4,5, atingindo um valor máximo de 0,0486U/mL. Rudravaram et al. (2006), obtiveram melhores resultados em pH 6,0, o mesmo verificado no presente experimento, porém, por ser um valor muito suscetível à contaminação bacteriana, mantiveram a fermentação com *Aspergillus oryzae* MTCC

1846 em pH 4,0, pois um pH mais ácido e com concentrações elevadas de açúcares gera um ambiente desfavorável para o crescimento bacteriano.

CONCLUSÃO

Oito linhagens do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* foram testadas para a produção da enzima beta-galactosidase, tendo como substrato o soro de queijo. A cepa de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 apresentou a maior atividade da enzima beta-galactosidase. Determinou-se a melhor temperatura de cultivo para o *Aspergillus oryzae* CCT 0977, sendo que à 28 °C obteve-se o maior consumo de lactose, a maior produção de biomassa e maior atividade enzimática. O meio de cultivo padronizado foi composto por lactose (0,1 g/L), glicerol (1,0 mL/L), peptona (3,0 g/L), extrato de levedura (0,1 g/L) em pH 6,0, obtendo uma concentração final de lactose de 11,1 g/L, o que corresponde a 68,1% de consumo, atividade enzimática de 1,75 U/mL.

REFERÊNCIAS

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilizes *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 351-359, 2012.

BRZOZOWSKI, B.; LEWANDOWSKA, M. Prolyl endopeptidase - Optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 204 – 210, 2014.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, J. B. A.; TEIXEIRA, J. A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n.5, p. 1977-1982, 2011.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

GHATAK, A. β -Galactosidase from *Enterobacter cloacae*: production, characterization and purification. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 492-502, 2016.

KAUR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S. Utilization of whey for the production of β -galactosidase using yeast and fungal culture. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 9, n. 7, p. 739-743, 2015.

KNUF, C.; NOOKAEW, I.; BROWN, S. H.; McCULLOCH, M.; BERRY, A.; NIELSEN, J. Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6050-6058, 2013.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; PARMAR, S. C.; APARNATHI, K. D. Whey and its utilization. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 8, p. 134-155, 2016.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A. R. M. I.; KALIL, S. J.; FILHO, F. M. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 155 - 161, 2011.

MENEGHEL, L.; REIS, G. P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1800-1807, 2014.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.

NATARAJAN, J.; CHRISTOBELL, C.; KUMAR, D. J. M.; BALAKUMARAN, M. D.; KUMAR, M. R.; KALAICHELVAN, P. T. Isolation and characterization of β -galactosidase producing *Bacillus* sp. from dairy effluent. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 11, p. 1466-1474, 2012.

NIZAMUNDDIN, S.; SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1096-1100, 2006.

OBEROI, H. S.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1499-1504, 2008.

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGH, R. S. Isolation and screening of fungal strains for β -galactosidase production. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 10, n. 7, p. 390-394, 2016.

RUDRAVARAM, R.; CHANDEL, A. K.; LINGA, V. R.; POGAKU, R. Optimization of Protein Enrichment of Deoiled Rice Bran by Solid State Fermentation Using *Aspergillus oryzae* MTCC 1846. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 4, p.1-14, 2006.

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, Purification, Immobilization and Characterization of a Thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p.1938-1953, 2012.

SHARMA, S.; SINGH, P. Isolation and characterization of β -Galactosidase enzyme producing microbe and optimization of its enzyme activity under different culture condition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 7, p. 148-155, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERMEABILIZAÇÃO CELULAR E EXTRAÇÃO DE BETA-GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAECCT* 0977 EM SORO DE QUEIJO

VIANA, C. S.^{1.}; MORIOKA, L. R. I.^{2.}; SUGUIMOTO, H. H.^{3*}

1 Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR.

2 Doutor em Ciência dos Alimentos. PNPd do Programas de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR.

3 Doutor em Ciência de Alimentos. Docente do Programas de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da UNOPAR. *Autor correspondente. E-mail: helio.suguimoto@unopar.br

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea que pode ser usado no desenvolvimento de microrganismos para fins biotecnológicos. O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* tem a capacidade de crescer no soro de queijo e produzir a enzima beta-galactosidase. Após o cultivo é necessário extrair a enzima, assim o objetivo deste trabalho foi definir os parâmetros para a determinação da permeabilização celular e também da extração da enzima a partir da biomassa de *Aspergillus oryzae*. Determinou-se o processo de extração da beta-galactosidase com um desenho experimental Box-Behnken com duas variáveis em três níveis, e o processo de permeabilização celular com três variáveis em três níveis. A fermentação foi realizada por um período de 5 dias em uma temperatura de 28 °C tendo como substrato o soro de queijo. Para determinar as variáveis significativas na atividade da beta-galactosidase foi determinada a atividade da enzima pelo método da reação de hidrólise de lactose, através da dosagem da glicose. O método mais eficiente para a extração da enzima foi com o etanol na concentração de 25%, a 30 °C durante 90 minutos, obtendo uma atividade enzimática de 0,44 U/mL. Na extração utilizando o solvente clorofórmio a condição ideal foi de 5,3% de clorofórmio a 48 °C, apresentando uma atividade enzimática de 0,17 U/mL. O uso do etanol foi eficiente para promover a permeabilidade celular das células de *Aspergillus oryzae* CCT 0977. Já o uso de clorofórmio para a extração acarretou uma redução expressiva da atividade enzimática.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Clorofórmio. Etanol. Fermentação. Lactase.

ABSTRACT

Cheese whey is a by-product of the dairy industry that can be used in the development of micro-organisms for biotechnology purposes. The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* has the ability to grow in the cheese whey and produce the enzyme beta-galactosidase. After the cultivation it is necessary to extract the enzyme, so the objective of this work was to define the parameters for the determination of the cellular permeabilization and also the extraction of the enzyme from the biomass of *Aspergillus oryzae*. The beta-galactosidase extraction process was determined with a Box-Behnken experimental design with two variables at three levels, and the cellular permeabilization process with three variables at three levels. The fermentation was carried out for a period of 5 days at a temperature of 28 °C with the cheese whey as the substrate. To determine the significant variables in beta-galactosidase activity the activity of the enzyme was determined by the lactose hydrolyzate reaction method, through glucose dosing. The most efficient method for extracting the enzyme was with ethanol at 25% concentration, at 30 °C for 90 minutes, obtaining an enzymatic activity of 0,44 U/mL. In the extraction using the solvent chloroform the ideal condition was 5,3% chloroform at 48 °C, presenting an enzymatic activity of 0,17 U/mL. The use of ethanol was efficient to promote cell permeability of *Aspergillus oryzae* cells CCT 0977. The use of chloroform for extraction resulted in a significant reduction in enzymatic activity.

Keywords: Chloroform. Enzymatic activity. Ethanol. Fermentation. Lactase.

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos são amplamente utilizados para obtenção de produtos de elevado valor agregado. Assim, na produção de enzimas há etapas iniciais de *upstream* e *midstream*, que consistem na preparação da matéria-prima seguida da fermentação. Ao final há uma sequência de etapas denominadas *downstream*, que deve ser realizada para a eliminação das impurezas e purificação do produto (PESSOA JUNIOR; KILLIKAN, 2001).

Quando o metabólito é de origem intracelular, a ruptura celular é a primeira etapa realizada do *downstream*, que permite separar a substância para posterior purificação. Vários métodos podem ser utilizados para esta finalidade, porém o processo dependerá da localização e estabilidade das enzimas. Existem métodos mecânicos de ruptura celular como homogeneizadores de alta pressão, ondas ultrassônicas e maceração com pérolas de vidro. Os métodos de rompimento químico utilizam álcalis, detergentes e solventes orgânicos. Já os enzimáticos consistem da lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular (MEDEIROS, et al., 2008; STRED'ANSKÝ, et al., 1993; PESSOA JUNIOR; KILLIKAN, 2001).

O uso de solventes para a permeabilização celular e a extração enzimática é a metodologia mais comum, sendo aplicadas após o processo de clarificação. A permeabilização é um método simples e rápido que permite mensurar a atividade enzimática (PANESAR et al., 2007). Já para a extração de enzimas deve-se promover o rompimento químico na parede celular. É um método simples e eficiente que não deixa fragmentos de celulares e não requer altos investimentos com os métodos mecânicos, porém demanda mais tempo, devido às reações químicas (SOMKUTI; STEINBERG, 1994).

Os solventes mais utilizados como agentes permeabilizantes são: tolueno, éter etílico, etanol e clorofórmio (FLORES et al., 1994). Esses solventes modificam as estruturas da parede celular de modo que ocorram desorganizações em seus poros permitindo a passagem de pequenas moléculas, como substratos ou outras moléculas presentes no meio fermentativo (SOMKUTI; STEINBERG, 1994).

A enzima beta-galactosidase, é um desses produtos de interesse industrial que necessita da recuperação do meio fermentativo. Possui alto potencial para o uso industrial, na área alimentícia e farmacêutica. Com a função de hidrolisar à lactose presente no leite, a beta-galactosidase pode ser utilizada para a produção

de produtos alimentícios com reduzido teor deste carboidrato, melhorando a digestibilidade do leite e de seus derivados. Tanto na indústria farmacêutica como na alimentícia, seu uso é destinado a pessoas intolerantes a este dissacarídeo (AEHLE, 2004; HUSAIN, 2010; SANTIAGO, 2004).

A beta-galactosidase pode ser obtida através da fermentação por diversos microrganismos, como o *Aspergillus oryzae*, um fungo termotolerante sem muitas exigências quanto ao ambiente para o cultivo (FOLEY et al., 2014; KRIJGSHELD et al., 2013). O soro de queijo vem sendo muito utilizado como meio de fermentação, pois como resíduo da fabricação do queijo tem um custo baixo e é nutricionalmente rico (DRAGONE et al., 2011; MACWAN et al., 2016).

Assim, este trabalho tem como objetivo cultivar o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* CCT 0977 em soro de queijo e determinar as condições de permeabilização celular e extração da enzima beta-galactosidase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo de *Aspergillus oryzae* CCT 0977

No experimento foi usado o *Aspergillus oryzae* CCT 0977 obtido da Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropicais (CCT).

A cultura foi mantida em tubo inclinado com PDA (Potato Dextrose Ágar, Acumedia®, Brasil) e armazenada a 4 °C. Para o preparo do inóculo foi realizado a contagem de esporos em câmara de Neubauer, e transferido 1×10^6 esporos/mL em uma solução salina 0,85% com 1% de Tween 80.

O meio de cultivo foi preparado com o soro de queijo em pó (Confepar®, Brasil) dissolvido em água destilada na concentração de 5% (p/v). Para retirar a fração proteica foi adicionado ácido láctico 85% até pH 4,6 e aquecido por 30 minutos a 90 °C, seguido por uma filtração em papel filtro Whatman nº 1. A solução filtrada foi ajustada para pH 5,0 com NaOH 50% e transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio de fermentação. A pasteurização foi realizada a 65 °C por 30 minutos e após resfriar foi adicionado 1% (v/v) de inóculo. O cultivo foi realizado em agitador orbital (Tecnal®, TE-420, Brasil) a 28 °C, 120 rpm durante 5 dias.

A biomassa úmida produzida foi triturada com auxílio do homogeneizador (IKA®, T10 basic, Alemanha), coletando 5 mL da suspensão e

transferidas para tubos falcon de 15 mL, seguido por centrifugação (Quimis®, Q222G, Brasil), durante 10 minutos a 1100 rpm, para separação de biomassa e sobrenadante. A biomassa foi utilizada na extração e permeabilização das células.

2.2 Determinação das condições de permeabilização da parede celular de *Aspergillus oryzae* CCT 0977

Na permeabilização, as células foram ressuspensa em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,8) e as concentrações do solvente etanol, o tempo e a temperatura foram ajustadas conforme descrito na Tabela 1. Após o processo de permeabilização, foi realizada uma centrifugação a 1100 rpm, sendo descartado o sobrenadante. As células permeabilizadas foram lavadas com tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,8). Após a lavagem, as células foram ressuspensa no mesmo tampão e utilizadas para a determinação da atividade da enzimática, descrito no item 2.4.1.

2.3 Determinação das condições de extração da enzima beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* CCT 0977

Para a extração da enzima beta-galactosidase, a biomassa foi transferida para Erlenmeyers de 50 mL de capacidade, e ressuspensa em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,8) com a adição de clorofórmio nas concentrações: 4, 5 e 6%, conforme o delineamento experimental (Tabela 4), totalizando 10 mL. Após a adição dos reagentes, os frascos foram incubados em agitador orbital (Tecnal®, TE-420, Brasil) a 120 rpm, nas temperaturas descritas na Tabela 4, permanecendo durante “overnight”. A atividade da enzima foi realizada conforme o item 2.4.1.

2.4 Determinações analíticas

2.4.1 Determinação da atividade da enzima beta-galactosidase

A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose. A glicose produzida foi quantificada pelo método do kit de a glicose-oxidase enzimático-colorimétrico (Bioliquid®). A unidade de atividade utilizada no trabalho foi Unidade de Glicose produzida por minuto, por mililitro de suspensão enzimática (UGI/mL), definida como sendo μmol de glicose produzida por minuto, por mL de suspensão enzimática, a 47 °C, em uma solução de concentração inicial de lactose igual a 10,0 g/L, preparada em tampão citrato-fosfato 0,1M e pH 6,5.

Foram utilizados 30% (v/v) de suspensão enzimática, e a incubação, realizada em banho-maria, permaneceu durante “overnight”. Após o tempo de incubação foi realizada a inativação da enzima a 90 °C por 5 minutos seguidos de banho de gelo.

2.4.2 Análise estatística

Para o delineamento experimental Box-Behnken e análise da permeabilização celular e extração enzimática, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM – Response Surface Methodology) utilizando o programa Statistica 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Permeabilização nas células de *Aspergillus oryzae* CCT 0977

As células do fungo filamentosos foram permeabilizadas com o solvente etanol seguindo as condições do delineamento estatístico, com a finalidade de encontrar interações entre as variáveis independentes: concentração de etanol, temperatura e tempo, com a variável resposta de atividade da beta-galactosidase.

De acordo com os resultados obtidos na permeabilização celular (Tabela 1), o valor máximo da atividade da enzima encontrado foi de 0,44 U/mL nas condições de 25% de etanol, 30 °C por 60 minutos (corrida 5). Nestas condições, o valor predito de acordo com o delineamento foi de 0,39 U/mL, demonstrando uma boa correlação entre o valor experimental e o predito.

Tabela 1. Efeito da concentração de etanol, temperatura e tempo na atividade da enzima beta-galactosidase de células permeabilizadas com etanol de *Aspergillus oryzae* CCT0977.

Corrida	Variáveis			Respostas	
	X1	X2	X3	Atividade beta-galactosidase (U/mL)	
	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Experimental	Predito
1	-1 (15)	-1 (20)	-1 (30)	0,22	0,17
2	-1 (15)	0(30)	1(90)	0,36	0,40
3	-1 (15)	1 (40)	0 (60)	0,29	0,29
4	0 (25)	-1 (20)	1(90)	0,38	0,38

5	0 (25)	0 (30)	0 (60)	0,44	0,39
6	0 (25)	1(40)	-1 (30)	0,17	0,22
7	1 (35)	-1(20)	0 (60)	0,25	0,29
8	1 (35)	0 (30)	-1 (30)	0,23	0,23
9	1 (35)	1(40)	1 (90)	0,40	0,35

Na Figura 1a foi possível observar o efeito da concentração de etanol e da temperatura na atividade da beta-galactosidase. Nota-se que a maior eficácia da permeabilização está na faixa de temperatura próximo a 30 °C e concentração de etanol próximo a 25% e queda na atividade da enzima nas extremidades.

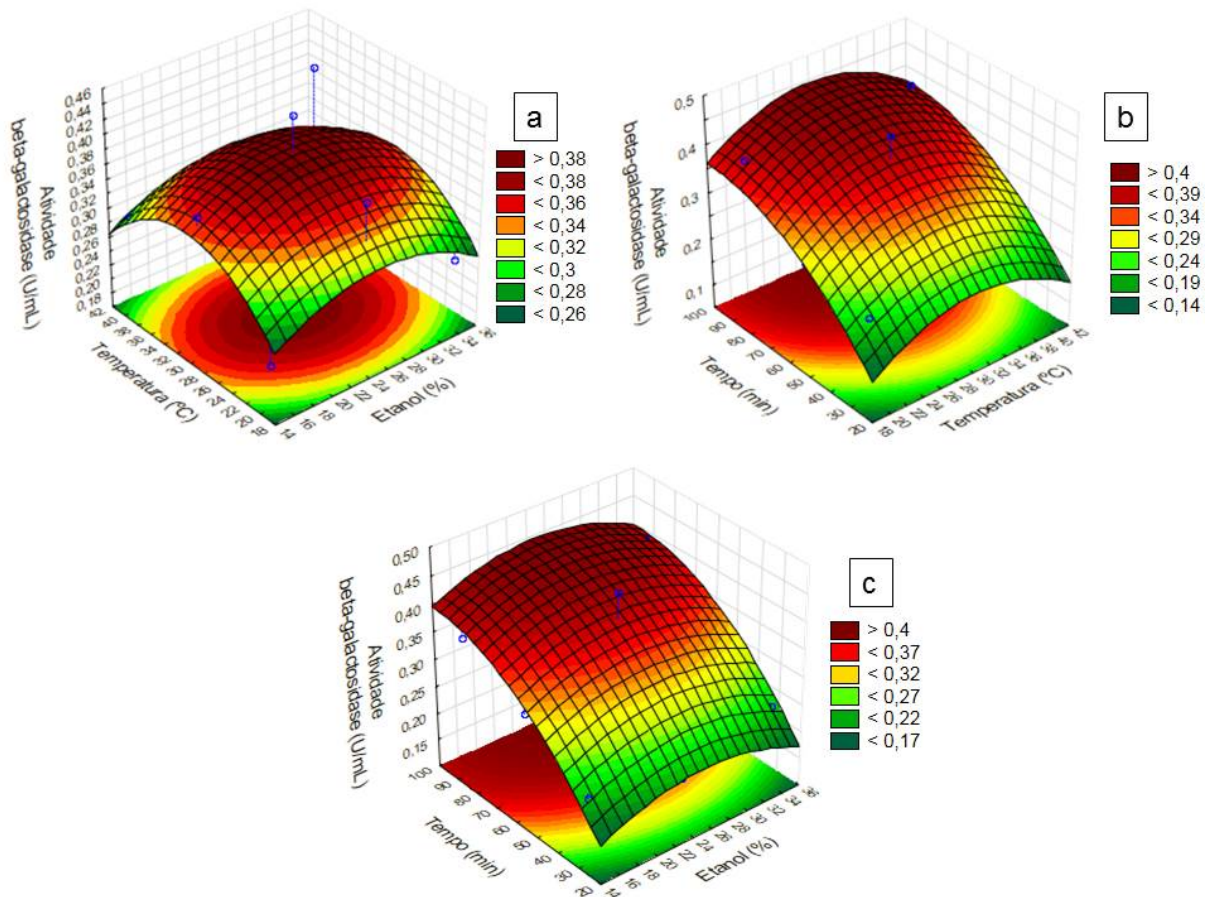


Figura 1. Superfície resposta representando o efeito das variáveis testadas na atividade da enzima beta-galactosidase com células permeabilizadas de *Aspergillus oryzae* CCT 0977. Figura 1a. Efeito: Temperatura x Etanol; Figura 1b. Efeito Tempo x Temperatura; e Figura 1c. Efeito Tempo x Etanol.

Na Figura 1b verifica-se que a permeabilização em baixas temperaturas e tempos menores de tratamento indicam uma queda da atividade da beta-galactosidase. A Figura 1c mostra que a concentração de etanol não afeta significativamente a atividade da beta-galactosidase, e o tempo de tratamento tem uma influência importante na permeabilização.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) na permeabilização das células de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

	SS	df	MS	F	p-value
X ₁ Etanol (%) L+Q	0,00324	2	0,001619	0,251141	0,799271
X ₂ Temperatura (°C) L+Q	0,00617	2	0,003084	0,478510	0,676356
Tempo (min) L+Q	0,0451	2	0,022552	3,499239	0,222260
Error	0,01289	2	0,006445		

Total SS	0,06739	8
----------	---------	---

As respostas apresentadas na Figura 1(a) e (b), a análise de variância (Tabela 2) e os efeitos estimados das variáveis independentes (Tabela 3), observa-se que a temperatura e o tempo são fatores críticos na permeabilização das células fúngicas. O modelo utilizado foi sem interações, gerando um R^2 de 0,80875, ou seja, há 80,87% de chances do resultado ser repetido.

Tabela 3. Efeito das variáveis independentes na permeabilização das células de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

Variáveis	Efeitos
Etanol	0,001058
Temperatura	0,005821
Tempo	0,169351
Standard Error	0,026760
<i>t</i> -value	11,35841
<i>p</i> -value	0,007662

Os estudos com leveduras indicaram tempo e temperatura de permeabilização menores, e concentração de etanol mais elevada quando comparado ao fungo filamentoso. Assim, Kumari et al. (2014), realizaram a permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus*, obtendo a máxima atividade da beta-galactosidase com uma mistura de tolueno:etanol nas concentrações de 45:53% (v/v), sob uma temperatura de incubação de 23,5-25 °C durante 10,5-12 minutos. De acordo com os autores, a baixa temperatura e o aumento do tempo de tratamento, intensifica a atividade da enzima, pois uma elevação da temperatura pode gerar a inativação parcial da beta-galactosidase.

Trawczyńska e Wójcik (2015) definiram as melhores condições de permeabilização das células de *Saccharomyces cerevisiae*, com uma concentração de etanol de 53%, a 14,8 °C durante 40 minutos. Morioka et al. (2016) realizaram a permeabilização em células de *Saccharomyces fragilis* IZ 275, com uma concentração de 35% de etanol, uma redução de 18,5% em comparação ao encontrado por Trawczyńska e Wójcik (2015).

De acordo com o exposto acima, a temperatura e o tempo são fatores

fundamentais no processo de permeabilização, podendo ser explicado pelo fato de que as paredes dos fungos filamentosos são mais rígidas, havendo a necessidade, com uma concentração menor de etanol, de mais tempo de reação e uma temperatura mais elevada para ocorrer a desorganização celular.

A rigidez da parede celular se dá ao fato de que os fungos filamentosos possuem em sua parede celular além da glucana, as glicoproteínas e quitina, maior componente estrutural da parede celular deste microrganismo. A quitina é um polímero que tem a função de tornar o tecido mais rígido e resistente, característica devida à presença de polissacarídeos nitrogenados, que possui uma estrutura cristalina ordenada e insolúvel em água (FLEURI; SATO, 2005; PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001).

3.2 Extração de beta-galactosidase das células de *Aspergillus oryzae* CCT 0977

A extração da beta-galactosidase das células do fungo *Aspergillus oryzae* CCT 0977 foi realizada tendo como variáveis independentes a concentração de clorofórmio e a temperatura. As interações foram avaliadas com o objetivo de extrair a enzima preservando a maior atividade enzimática.

De acordo com os resultados (Tabela 4), a maior atividade quantificada foi de 0,17 U/mL, com uma concentração de 5% de clorofórmio e temperatura de 45 °C (corrida 5), sendo a atividade prevista de 0,15 U/mL, demonstrando boa correlação entre o valor experimental e o predito.

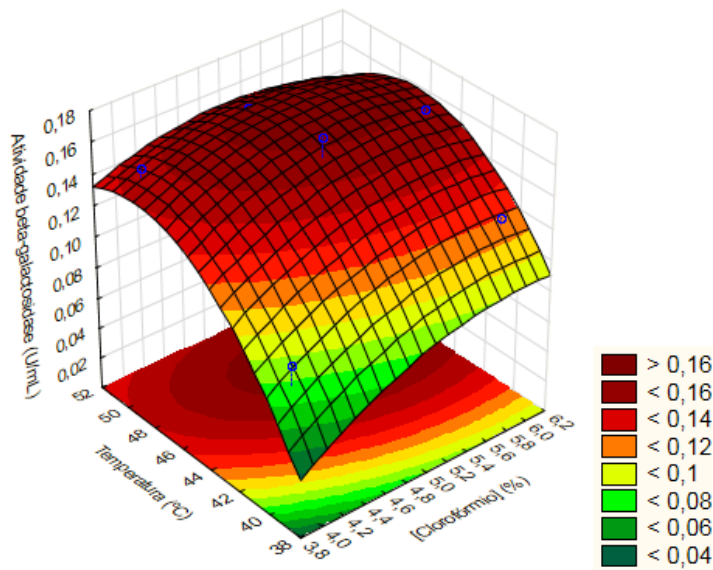
Tabela 4. Efeito da concentração de clorofórmio e temperatura na atividade da enzima na hidrólise da lactose pela beta-galactosidase extraída de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

Corrida	Variáveis (valores reais)		Resposta	
	X1	X2	Atividade beta-galactosidase (U/mL)	
	Clorofórmio (%)	Temperatura (°C)	Experimental	Predito
1	-1 (4,0)	-1 (40)	0,09	0,08
2	-1 (4,0)	0 (45)	0,12	0,13
3	-1 (4,0)	1 (50)	0,15	0,14
4	0 (5,0)	-1 (40)	0,10	0,11
5	0 (5,0)	0 (45)	0,17	0,15
6	0 (5,0)	1 (50)	0,16	0,16
7	1 (6,0)	-1 (40)	0,12	0,12

8	1 (6,0)	0 (45)	0,16	0,16
9	1 (6,0)	1 (50)	0,15	0,15

Na Figura 2 foi possível observar que a temperatura é uma variável importante no processo de extração da enzima beta-galactosidase. Nota-se que a maior eficácia na extração enzimática ocorreu numa concentração de clorofórmio que varia de 4,6% a 6,0%, e em relação à temperatura, a maior extração da enzima beta-galactosidase ocorreu na faixa próximo a 48 °C. Observa-se que as extrações realizadas em temperaturas mais brandas indicam uma redução na eficácia do processo de extração.

Figura 2. Superfície resposta representando o efeito da temperatura e concentração de clorofórmio na atividade da enzima beta-galactosidase extraída de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.



A importância da temperatura indicado pela Figura 2, também é observado na análise de variância (ANOVA) descrito na Tabela 5 e pelo seu efeito (Tabela 6). A temperatura apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) e efeito positivo significativo, enquanto a concentração do solvente clorofórmio não demonstrou mesma significância e efeito.

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para o efeito da extração de beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

	SS	df	MS	F	p-value
X ₁ Clorofórmio (%) L+Q	0,001089	2	0,000544	2,63677	0,218346
X ₂ Temperatura (°C)	0,004689	2	0,002344	11,35426	0,039863*
L+Q					
X ₁ *X ₂	0,0002225	1	0,000225	1,08969	0,373253
Error	0,000619	3	0,000206		
Total SS	0,006622	8			

A legitimidade dos resultados foi comprovada pela repetição dos experimentos nas condições ótimas de extração, que correspondem à concentração de clorofórmio de 5,3% e temperatura de 48 °C. O modelo utilizado para a análise dos dados foi o 2-way-interactions (linear x linear) e o efeito de cada variável independente na extração da beta-galactosidase estão descritos na Tabela 6. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,90646 para a atividade da beta-galactosidase extraída, significando que o modelo representou adequadamente a relação real entre as variáveis testadas.

Tabela 6. Efeito estimado das variáveis independentes clorofórmio e temperatura na extração de beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

Variáveis	Efeitos estimados
Efeito do Clorofórmio	0,023333
Efeito da Temperatura	0,050000
Standard error	0,004790
t-value	28,30076
p-value	0,000097

Diversos autores estudaram o efeito de solventes na extração de enzimas. Panesar et al. (2006) sugeriram que o uso de solventes químicos são os ideais para a extração de enzimas, em especial a partir de células de leveduras. Stred'anský et al. (1993) realizaram extração da beta-galactosidase das células de

Kluyveromyces marxianus (CCY 51-1-1) com os solventes clorofórmio e etanol (1:9) e obtiveram a maior taxa de extração na temperatura entre 40-45 °C, valores próximos ao encontrado neste trabalho. De acordo com os autores, o rendimento da atividade da beta-galactosidase em temperaturas mais elevadas (40-45 °C) foi menor, em comparação quando utilizaram temperaturas mais brandas (37-40 °C). A concentração do tampão é um fator importante durante este processo, onde constataram que quanto maior a molaridade, maior será a liberação da enzima para o meio. Trabalhou a extração por 24 horas com o tampão fosfato 0,5M sem o uso de solventes, obtendo uma taxa de extração de 85%, valor relativamente elevado.

Bansal et al. (2008), verificaram que em células de *Kluyveromyces marxianus* (MTCC 1388) o uso do SDS-Clorofórmio (SDS: dodecil sulfato de sódio) foi eficiente na extração da beta-galactosidase. Os autores verificaram um aumento de 71% na atividade da enzima em comparação ao método sônico, mais utilizado em caso de bactérias.

Kaur et al. (2015) testaram métodos químicos e físicos em células de *Kluyveromyces marxianus* WIG2. Entre os dois tipos de métodos, o mais eficiente foi o método químico com SDS-clorofórmio, seguido pelo tolueno. O método físico que apresentou melhores resultados foi o uso de pérolas de vidro e sonificação, demonstrando uma redução na atividade de 42,4% e 72,1%, respectivamente, em comparação ao SDS-clorofórmio. De acordo com os autores, o método químico utilizando o SDS-clorofórmio é o mais adequado para a extração da enzima beta-galactosidase quando comparado às demais técnicas.

Nota-se que o processo de extração acarreta redução expressiva na atividade enzimática. Enquanto que na permeabilização a atividade foi de 0,44 U/mL, na extração esse valor diminui para 0,17 U/mL, uma redução de 61,36% na atividade da beta-galactosidase. Provavelmente o processo de extração da enzima do interior da célula por solvente acarreta em danos na enzima que ocasiona redução na sua atividade.

CONCLUSÃO

Células fúngicas de *Aspergillus oryzae* CCT 0977 foram testadas para a produção da enzima beta-galactosidase utilizando o soro de queijo como meio de cultivo. Dois solventes químicos foram empregados, o etanol para a permeabilização

celular e o clorofórmio para a extração da enzima. O etanol como agente de permeabilização obteve maior atividade enzimática quando comparado à extração por clorofórmio. A melhor condição no processo de permeabilização, obtendo a maior atividade da beta-galactosidase foi com etanol 25%, temperatura de 30 °C durante 90 minutos. Nessas condições, o valor máximo predito encontrado da atividade da enzima beta-galactosidase foi de 0,39 U/mL.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; BHAT, S. G. Permeabilization of baker's yeast with *N*-lauroyl sarcosine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 799-804, 2008.

AEHLE, W. Industrial Enzymes. In: AEHLE, W. **Enzymes in industry: production and application**. 2. ed. Mörlenbach: Wiley-VCH, 2004. p. 143-145.

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

DRAGONE, G. et al. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n.5, p. 1977-1982, 2011.

FOLEY, K. et al. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 203-210, 2014.

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

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

HUSAIN, Q. β -Galactosidase and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

KAUR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S. Utilization of whey for the production of β -

galactosidase using yeast and fungal culture. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 9, n. 7, p. 739-743, 2015.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; van VELUW, G. J.; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.

KUMARI, S.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B. Statistical modeling for permeabilization of a novel yeast isolate for β -galactosidase activity using organic solvents. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 8, n. 6, p. 567-572, 2014.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; PARMAR, S. C.; APARNATHI, K. D. Whey and its utilization. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 8, p. 134-155, 2016.

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 β -galactosidase para o uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MORIOKA, L. R. I.; COLOGNESI, G. O.; SUGUIMOTO, H. H. Permeabilization of *Saccharomyces fragilis* IZ 275 cells with ethanol to obtain a biocatalyst with lactose hydrolysis capacity. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 149-155, 2016.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S. KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530-543, 2006.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; BERA, M. B. Permeabilization of yeast cells with organic solvents for β -galactosidase activity. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2007.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 493-507.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

STRED'ANSKÝ, M.; TOMÁSKA, M.; STURDÍK, E.; KREMnickÝ, L. Optimization of β -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 12, p. 1063-1065, 1993.

SOMKUTI, G. A.; STEINBERG, D. H. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of beta-galactosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 573-576, 1994.

TRAWCZYŃSKA, I.; WÓJCIK, M. Optimization of permeabilization process of yeast cells for catalase activity using response surface methodology. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 1, p. 72-77, 2015.