

POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR DIFERENTES CEPAS DE *Kluyveromyces*

Joana da C. Ores, Vanessa Ribeiro, Ana Paula Manera, Carlos A. V. Burkert, Susana J. Kalil*

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande

*E-mail: susana.kalil@vetorial.net

RESUMO

A hidrólise enzimática da lactose pela enzima β -galactosidase desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, como na obtenção de leite com baixo teor de lactose para consumo por indivíduos intolerantes à mesma e na prevenção da cristalização em produtos alimentícios. Em termos de interesse tecnológico a β -galactosidase é produzida por leveduras do gênero *Kluyveromyces* por apresentar maior atividade enzimática que outras leveduras quando a lactose é usada como substrato. O objetivo deste trabalho foi selecionar o melhor microrganismo produtor de β -galactosidase, dentre cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus* e duas cepas de *Kluyveromyces lactis*, através de fermentação submersa em frascos agitados usando meio de cultivo padrão. Em determinados intervalos de tempos amostras foram coletadas para acompanhamento da atividade enzimática, da biomassa e do pH ao longo das fermentações. As cepas de *K. marxianus* testadas foram CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e *K. marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. As cepas de *K. lactis* testadas forma NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564. As melhores respostas para atividade enzimática foram obtidas ao empregar *K. marxianus* CCT 7082, com valores até 6 vezes superiores a segunda cepa maior produtora *K. marxianus* CCT 7081.

Palavras-chave: fermentação submersa, *K. marxianus*, *K. lactis*.

1. INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, responsável por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose. A hidrólise da lactose pela β -galactosidase desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, obtendo assim alimentos com baixo teor de lactose, melhorando a digestibilidade e solubilidade de leites e derivados, prevenindo a cristalização deste açúcar em produtos como doce de leite, leite condensado, misturas para sorvetes e iogurtes além de enriquecer o produto hidrolisado com galactooligossacarídeos (YANG e SILVA, 1995).

Esta enzima pode ser produzida por microrganismos, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras. O cultivo de leveduras do gênero *Kluyveromyces* em um meio com lactose como fonte de carbono apresenta rápido crescimento frente a outros microrganismos. Além disso, o gênero *Kluyveromyces* possui o GRAS (Generally Regarded Safe), que o faz aceito pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo assim recomendável para utilização em alimentos (HENSING *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a produção da enzima β -galactosidase obtida por espécies de *Kluyveromyces* em cultura submersa em frascos agitados e selecionar dentre diversas cepas de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* a maior produtora da enzima β -galactosidase.

2. DESENVOLVIMENTO

21. Material e métodos

2.1.1. Microrganismos

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* que foram testadas quanto à produção de β -galactosidase foram das espécies *K. marxianus* e *K. lactis*. As cepas de *K. marxianus* testadas foram CCT 7080, CCT 7081, CCT 7082, NCYC 587 e *K. marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 (gentilmente cedidas pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP). As cepas de *K. lactis* testadas foram NRRL Y 8279 e NRRL Y 1564 (cedidas pelo Northern Regional Research Laboratories, Peoria-USA).

As culturas foram mantidas à 4°C, em tubos de ensaio com ágar extrato de malte e levedura inclinado.

2.1.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos erlenmeyers de 500mL contendo 150mL do meio de cultura com a seguinte composição: lactose (10 g/L), extrato de levedura (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4 g/L), preparado em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 5,5 (PINHEIRO *et al.*, 2003). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15min. Após a esterilização, o meio foi resfriado à temperatura ambiente e feita a inoculação da levedura em estudo.

Os frascos foram incubados a 30°C em incubador rotativo a 180 rpm e no tempo necessário para se atingir a concentração celular de 1×10^8 células/mL de meio. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (SANTIAGO *et al.*, 2004).

2.1.3. Seleção do melhor microrganismo produtor de β -galactosidase

Para selecionar o melhor microrganismo produtor de β -galactosidase foram realizadas fermentações em frascos erlenmeyers com o mesmo meio de cultura descrito no item 2.1.2., acrescidos de inóculo para atingir concentração de 1×10^7 células/mL no meio. As condições operacionais foram 30°C, 180 rpm.

Amostras foram coletadas a cada 2h para o acompanhamento da atividade enzimática, da biomassa e do pH.

2.1.4. Biomassa

A concentração de células foi medida por densidade ótica a 620nm, e convertida para gramas de célula seca por litro através da curva de calibração da densidade ótica versus gramas de célula seca por litro (RECH *et al.*, 1999).

2.1.5. Rompimento das células

Em um frasco foi colocado 1 mL de células em suspensão, acrescido de 1,1004g de pérolas de vidro ($R < 0,4\text{mm}$) e colocados por 10min em um sonicador. Durante os ensaios a temperatura foi mantida entre 0 e 4°C. A suspensão foi centrifugada por 10min a 6000 rpm (CORTÉS *et al.*, 2005) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

Um mililitro de células em suspensão foi obtido ressuspensando 2,62mg de célula seca em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 obtendo um volume final de 1mL.

2.1.6. Atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada usando *o*-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside (ONPG) como substrato segundo metodologia descrita no FOOD CHEMICAL CODEX (1981).

2.1.7. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em medidor de pH segundo AOAC (1995).

2.2. Resultados e discussão

A tabela 1 apresenta os máximos valores obtidos para atividade enzimática para cada microrganismo. Para todos os microrganismos a atividade enzimática máxima foi obtida nas seis horas de fermentação.

Tabela 1: Atividade enzimática para os sete microrganismos testados.

Microrganismos	Atividade enzimática (U/g)
<i>K. marxianus</i> CCT 7080	751
<i>K. marxianus</i> CCT 7081	1240
<i>K. marxianus</i> CCT 7082	7513
<i>K. marxianus</i> NCYC 587	446
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC 16045	507
<i>K. lactis</i> NRRL Y 8279	825
<i>K. lactis</i> NRRL Y 1564	692

As melhores respostas para atividade enzimática da β -galactosidase foram obtidas ao empregar *K. marxianus* CCT 7082, com valores até 6 vezes superiores a segunda cepa maior produtora, *K. marxianus* CCT 7081.

A figura 1 apresenta a fermentação em meio à base de lactose para a levedura *K. marxianus* CCT 7082.

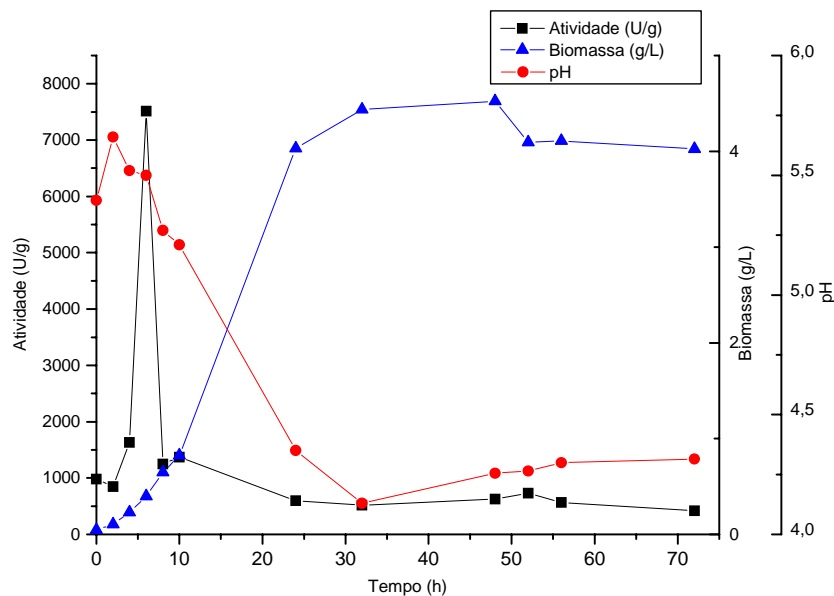


Figura 1: Fermentação em meio à base de lactose para a levedura *K. marxianus* CCT 7082.

Observa-se na figura 1 que nas seis horas de fermentação a atividade enzimática apresentou um pico alcançando valores de 7513U/g, e a concentração celular foi de 0,4g/L. A fermentação iniciou com pH de 5,4 após a adição do inóculo, nas seis horas atingiu valor de 5,5 e a partir deste ponto houve uma queda abrupta alcançando valor mínimo de 4,10.

Como seqüência do trabalho será realizada a otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase empregando o microrganismo *K. marxianus* CCT 7082.

3. CONCLUSÃO

Dentre os microrganismos testados a cepa de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi a melhor produtora da enzima β -galactosidase atingindo atividade enzimática ao redor de 7500U/g.

Agradecimentos: CNPq e CAPES.

4. REFERÊNCIAS

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995.

CORTÉS G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; RAMÍREZ, O. T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 773-778, 2005.

FOOD CHEMICAL CODEX. 3. ed. p. 491. Washington: Nat. Acad. Press, 1981.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 516-521, 1994.

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*. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

PINHEIRO, R.; BELO, I. e MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB M. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

YANG, S. T.; SILVA E. M. Novel products and new technologies for use of a familial carbohydrate, milk lactose. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.