

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA GOMES IAREMA

BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO
VINHAÇA DE SOJA COMO SUBPRODUTO/RESÍDUO INDUSTRIAL



CURITIBA

2015

BÁRBARA GOMES IAREMA

BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO
VINHAÇA DE SOJA COMO SUBPRODUTO/RESÍDUO INDUSTRIAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.

CURITIBA

2015



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta e um dias do mês de Agosto de 2015, na Sala de Aulas de Pós Graduação do Prédio Cenbapar, no Setor de Tecnologia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Centésima Terceira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador e da banca de defesa, alunos do PPGEBB, professores e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos membros: Profa. Dra. Cristine Rodrigues (UFPR), Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo (PUC-PR), Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho (UFPR), e Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR – orientadora da dissertação).

Às 14h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Bárbara Gomes Iarema** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: "**BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO VINHAÇA DE SOJA COMO SUBPRODUTO/RESÍDUO INDUSTRIAL**". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profa. Dra. Cristine Rodrigues, Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo, Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, e Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 31 de Agosto de 2015.

Profa. Dra. Cristine Rodrigues

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho

Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Schoenstatt, pela inspiração e proteção. Também à minha família, pela paciência, força e compreensão nos meus momentos de estresse.

Agradeço também à minha orientadora, prof.^a Dr.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe, pela oportunidade de pesquisa e suas contribuições ao presente trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de participar da linha de pesquisa com bactérias lácticas.

Ao professores Drs. Adriane, Júlio e Michele, pelas orientações nas metodologias de recuperação e purificação enzimática.

À equipe da Biologia Molecular, pelo auxílio com o procedimento de Eletroforese.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela troca de conhecimentos e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição à formação acadêmica e científica.

Agradeço também a empresa IMCOPA, pela disponibilização das amostras de resíduo industrial.

RESUMO

A α -galactosidase é uma enzima capaz de degradar oligossacarídeos, tais como estaquiose e rafinose. Tais açúcares não são metabolizados no trato intestinal humano, o que causa uma série de problemas digestivos. Para fins terapêuticos, a adição desta enzima em alimentos ou mesmo seu consumo direto pode eliminar os sintomas de desconforto abdominal. Outra aplicação das α -galactosidases é para tratamento da doença de Fabry, uma doença genética de caráter hereditário que causa a deficiência ou a ausência da enzima no organismo de seus portadores. Sobre a aplicação industrial, boa parte é utilizada na produção de açúcar de beterraba e também para processos alimentícios envolvendo derivados de soja. Sabe-se que a produção brasileira de soja em 2014 correspondeu a aproximadamente 87 milhões de toneladas, com produtividade média de 2.897 kg/ha segundo o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015). Visando estas aplicações e a fim de encontrar alternativas para sua produção, o presente processo tem por objetivo a produção de α -galactosidase a partir de vinhaça de soja, um resíduo rico em oligossacarídeos essenciais para a produção enzimática, obtida da fermentação alcoólica de melaço de soja. Tal uso também visa reduzir os impactos ambientais causados pelo descarte ou não aproveitamento deste subproduto da indústria de processamento da soja, já que aproximadamente 260 m³ por dia de vinhaça são gerados a partir de 10 m³ diários de etanol produzidos em uma indústria brasileira processadora destes grãos. Foram realizados ensaios de fermentação por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em frascos de Erlenmeyer. Baseado nos testes de otimização, concluiu-se que a melhor condição para produzir a enzima α -galactosidase foi a de vinhaça de soja contendo 5,0% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de MgSO₄.7H₂O, a 30°C e 10% (v/v) de inóculo sob agitação a 120 rpm. Nestas condições obteve-se 7,48 ± 0,47 U/mL de enzima, enquanto que ensaios em biorreator do tipo tanque agitado, com 300 rpm de agitação e aeração de 1 vvm, levaram a uma produção de 8,84 ± 0,05 U/mL, um aumento de 15,38%. A enzima produzida foi extracelular, ou seja, secretada no meio de produção, fato que contribui para a sua separação e purificação, o que certamente é uma vantagem do processo.

Palavras-chave: α -galactosidase, alfa-galactosidase, melibiase, oligossacarídeos, estaquiose, rafinose, vinhaça de soja, resíduo industrial de soja.

ABSTRACT

The α -galactosidase is an enzyme capable of degrading oligosaccharides, such as stachyose and raffinose. These sugars are not metabolized in the human intestinal tract, which causes a number of digestive problems. As therapeutic purposes, addition of this enzyme in food or even its direct consumption can eliminate these symptoms, not only individuals but also in animals. Another application of α -galactosidase is for the treatment of Fabry disease in humans, a genetic hereditary disease which causes the deficiency or absence of the enzyme in the organism of its carriers. On industrial application, much is used in sugar beet production and food processes involving soy products. It is known that the Brazilian soybean production in 2014 amounted about to 87 million tons, with average yield of 2897 kg/ha according to the IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics (2015). Targeting these applications and to find alternatives for their production, this process aims to produce α -galactosidase from soy vinasse, a residue rich in oligosaccharides essential for enzyme production, obtained from the alcoholic fermentation of molasses soybeans. Such use also aims to reduce the environmental impacts caused by the disposal or non-use of this by-product of soybean processing industry, as about 260 m³ per day of vinasse are generated from daily 10 m³ of ethanol produced in a Brazilian processing industry of these grains. Fermentation experiments were carried out by *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 in Erlenmeyer flasks. Based on the optimization tests, it was concluded that the best condition to produce the α -galactosidase was soybean stillage containing 5.0% (w/v) raffinose and 0.5% (w/v) MgSO₄·7H₂O, at 30°C and 10% (v/v) inoculum with stirring at 120 rpm. Under these conditions yielded 7.48 ± 0.47 U/mL enzyme, while trials in agitated tank type bioreactor with 300 rpm agitation and aeration of 1 vvm, led to a production of 8.84 ± 0,05 U/mL, an increase of 15.38%. The enzyme was produced extracellular, secreted into the production medium, a fact that contributes to its separation and purification, which is certainly an advantage of the process.

Key-words: α -galactosidase, alpha-galactosidases, melibiase, oligossacharides, stachyose, raffinose, soybean vinasse, industrial residue of soybean.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DA α -GAL A. FONTE: NIH - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (1997).	25
FIGURA 2 -	ESTAQUIOSE. FONTE: UNESP (2013a).	26
FIGURA 3 -	MELIBIOSE. FONTE: BIOCHEMISTRY (2013)	26
FIGURA 4 -	RAFINOSE.FONTE: UNESP (2013b)	26
FIGURA 5 -	ESTRUTURAS DOS α -GALACTOSÍDEOS EM SOJA: ESTAQUIOSE E RAFINOSE. FONTE: ADAPTADO DE LE BLANC <i>ET AL.</i> (2004).	28
FIGURA 6 -	ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE SOJA DA SEMENTE À VINHAÇA. FONTE: ADAPTADO DE SIQUEIRA <i>ET AL.</i> (2008).	34
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ROTA METABÓLICA DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> DURANTE METABOLISMO DE VÁRIOS AÇÚCARES. G1P, GLUCOSE-1-FOSFATO; G6P, GLUCOSE-6-FOSFATO; F6P, FRUTOSE-6-FOSFATO; GAP, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO; ACETIL-P, ACETILFOSFATO; ACETIL-COA, ACETIL COENZIMA A; 1, SUCROSE FOSFORILASE; 2, DEXTRANA-SACARASE; 3, FOSFOGLUCOMUTASE (PGM); 4, GLUCOQUINASE; 5, FRUTOQUINASE; 6, MANITOL DESIDROGENASE; 7, PIRUVATO DESIDROGENASE. FONTE: DOLS <i>et al.</i> (1997).	45
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE BIORREATOR INDUSTRIAL DO TIPO TANQUE AGITADO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS. FONTE: ADAPTADO DE BEDFORD E PARTRIDGE (2010).	46
FIGURA 9 -	ETAPAS DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ENZIMA.	47
FIGURA 10 -	MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR MICROBIANO. FONTE: ADAPTADO DE GECIOVA <i>et al.</i> (2002).	48

FIGURA 11 -	(A) CÉLULAS DE <i>L. DELBRUECKII</i> SSP. <i>BULGARICUS</i> 11842 ANTES DO ROMPIMENTO. (B) CÉLULAS APÓS SONICAÇÃO POR 6 MIN. (C) CÉLULAS DEPOIS DO PROCESSO DE MOINHO DE BOLAS POR 6 MIN. (D) APÓS PASSAGEM EM HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESSÃO A 200 MPA, BAR 2 μ M (BURY <i>et al.</i> , 2001).	49
FIGURA 12 -	CARACTERÍSTICAS DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS. FONTE: WATER <i>et al.</i> , (2008).	55
FIGURA 13 -	FILTRAÇÃO TANGENCIAL E FILTRAÇÃO CONVENCIONAL (PERPENDICULAR E ESTÁTICA). FONTE: KASTER (2009).	56
FIGURA 14 -	MEMBRANAS COM CONFIGURAÇÃO QUADRO E PLACA. FONTE: HABERT, BORGES e NOBREGA (2006)	57
FIGURA 15 -	ETAPAS DA PRODUÇÃO DE α -GALACTOSIDASE POR <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 E POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	59
FIGURA 16 -	ESQUEMA DA PRODUÇÃO DE α -GALACTOSIDASE VIA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> PADRÃO INRA 26.	68
FIGURA 17 -	BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO INCELTECH Set 2M (LH, SGi).	79
FIGURA 18 -	SISTEMA DE FILTRAÇÃO À VÁCUO PES 0,22 μ M (KASVI®).	80
FIGURA 19 -	SISTEMA DE SEPARAÇÃO MILLIPORE®. (A) BOMBA PERISTÁLTICA. (B) MEMBRANA PELLICON ACOPLADA AO SISTEMA DE FILTRAÇÃO.	82
FIGURA 20 -	<i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 APÓS CRESCIMENTO EM AEROBIOSE (A) E EM ANAEROBIOSE (B), EM AUMENTO DE 1000X (B). FONTE: O AUTOR.	89
FIGURA 21 -	<i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM CADEIAS LONGAS (A) E <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 ISOLADAMENTE E EM CADEIAS CURTAS, EM AUMENTO DE 1000X. FONTE: O AUTOR.	90

FIGURA 22 -	EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM MEIO MRS E VINHAÇA DE SOJA PARA SISTEMA AERÓBIO (120 rpm) E ANAERÓBIO (CULTIVO ESTÁTICO).	92
FIGURA 23 -	EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (G/L) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 PARA FERMENTAÇÃO EM VINHAÇA DE SOJA.	95
FIGURA 24 -	CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 COM ESTRUTURA CELULAR NORMAL (A) E APÓS LISE CELULAR POR CONGELAMENTO (B), EM AUMENTO DE 1000X. FONTE: O AUTOR.	98
FIGURA 25 -	CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 – ANTES DA SONICAÇÃO (A), FINAL 2º CICLO (B), APÓS 4º CICLO (C) E AO FINAL DO 6º CICLO (D), EM AUMENTO DE 1000X. FONTE: O AUTOR.	99
FIGURA 26 -	ATIVIDADE DE α -GAL PRODUZIDA POR <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM VINHAÇA PURA (VP) E AJUSTADA (VA) – SOBRENADANTE, AMOSTRAS CONGELADAS UMA (CONG. 1) E DUAS VEZES (CONG. 2) E SONICADAS UMA (SON. 1) E DUAS VEZES (SON. 2).	102
FIGURA 27 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SOBRENADANTE (S) E ROMPIMENTO CELULAR (R) EM U/ML VIA <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES APÓS 24H DE FERMENTAÇÃO.	104
FIGURA 28 -	BIOMASSA EM MASSA SECA (G/L) PARA FERMENTAÇÃO EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES AO LONGO DE 24H DE FERMENTAÇÃO.	104
FIGURA 29 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRA E INTRACELULAR DE α -GAL POR <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> NRRL1 E <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	106
FIGURA 30 -	EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (UFC/mL) DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM CALDO MRS.	108

FIGURA 31 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 PARA MEIO MRSm SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.	111
FIGURA 32 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 PARA MEIO MRSm CONTENDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	112
FIGURA 33 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM MRSm CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).	113
FIGURA 34 -	GRÁFICO DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).	115
FIGURA 35 -	ATIVIDADE DE α -Gal POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 RESULTANTE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.	116
FIGURA 36 -	GRÁFICOS DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ (A) E $\alpha = 10\%$ (B) PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.	117
FIGURA 37 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADIÇÃO DE UREIA E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ EM MRSm PARA PRODUÇÃO DE α -GAL POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	119
FIGURA 38 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADIÇÃO DE RAFINOSE E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ EM MRSm PARA A PRODUÇÃO DE α -GAL POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	120
FIGURA 39 -	ATIVIDADE DE α -Gal PARA PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.	122

FIGURA 40 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.	123
FIGURA 41 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (%) SOBRE A α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{7-4} .	125
FIGURA 42 -	DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.	126
FIGURA 43 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23.	128
FIGURA 44 -	GRÁFICOS DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ (A) E $\alpha = 10\%$ (B) PARA COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23.	128
FIGURA 45 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE RAFINOSE E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ NA α -GAL POR <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.	130
FIGURA 46 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE $(NH_4)_2SO_4$ E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ NA α -GAL POR <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.	131
FIGURA 47 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM ERLNMEYERS - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h).	133

FIGURA 48 -	EVOLUÇÃO DA BIOMASSA (G/L) DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (G/L) - FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM ERLLENMEYERS.	134
FIGURA 49 -	DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{máx}}$) EM SISTEMA DE BATELADA PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM ERLLENMEYERS.	135
FIGURA 50 -	PRODUÇÃO DE α -Gal POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA.	136
FIGURA 51 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GALACTOSIDADE EM BIORREATOR - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h).	137
FIGURA 52 -	EVOLUÇÃO DA BIOMASSA (G/L) DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (G/L) - FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR.	138
FIGURA 53 -	DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{máx}}$) EM SISTEMA DE BATELADA PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM BIORREATOR.	139
FIGURA 54 -	(A) MEMBRANA VIVASPIN (GE HEALTHCARE®) DE 100.000 MWCO CONTENDO AMOSTRA. (B) MEMBRANA COM FRAÇÕES DE RETIDO E PERMEADO.	142
FIGURA 55 -	MEMBRANA VIVASPIN (GE HEALTHCARE®) DE 10.000 MWCO CONTENDO FRAÇÕES DE RETIDO E PERMEADO.	142
FIGURA 56 -	MEIO FERMENTADO A PARTIR DE VINHAÇA DE SOJA EM BIORREATOR.	143
FIGURA 57 -	(A) EXTRATO BRUTO; (B) PERMEADO DA MICROFILTRAÇÃO; (C) RETIDO DA ULTRAFILTRAÇÃO; (D) PERMEADO DA ULTRAFILTRAÇÃO.	145
FIGURA 58 -	ELETROFORESE SDS-PAGE DA α -GAL COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR <i>RAINBOW</i> . FONTE: O AUTOR.	147

LISTA DE SIGLAS

α -Gal	α -Galactosidase
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
LAB	Bactérias ácido-lácticas
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
pNPG	p-Nitrofenil-galacto-piranosídeo
STR	Biorreator do tipo tanque agitado (<i>Stirred Tank Reactor</i>)
VA	Vinhaça de soja ajustada/suplementada
VP	Vinhaça de soja pura
vvm	Volume de ar por volume de meio e tempo ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ ou $\text{L/L} \cdot \text{h}$)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	FONTES DE α -GAL DE ORIGEM BACTERIANA.	30
TABELA 2 -	FONTES DE α -GAL DE ORIGEM FÚNGICA E LEVEDURA.	31
TABELA 3 -	PRODUÇÃO DE α -GAL A PARTIR DE <i>HUMICOLA</i> SP EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E SUBSTRATOS (ADAPTADO DE KOTWAL <i>et al.</i> , 1998).	32
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MELAÇO E VINHAÇA DE SOJA (ADAPTADO DE SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2008; KARP <i>et al.</i> , 2011).	34
TABELA 5 -	COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS EM MEIO CONTENDO RAFINOSE E GLUCOSE (ADAPTADO DE XIAO <i>et al.</i> (2000).	36
TABELA 6 -	SUPLEMENTOS COMERCIAIS CONTENDO α -Gal.	38
TABELA 7 -	ROMPIMENTO CELULAR – CONDIÇÕES PARA HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESSÃO.	50
TABELA 8 -	ROMPIMENTO CELULAR – CONDIÇÕES PARA SONICAÇÃO.	51
TABELA 9 -	ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA PURIFICAÇÃO DE α -GAL.	52
TABELA 10 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO À BASE DE VINHAÇA DE SOJA.	63
TABELA 11 -	CONDIÇÕES PARA TESTE COMBINADO ENTRE CONGELAMENTO E SONICAÇÃO.	65
TABELA 12 -	CONDIÇÕES DE PRESSÃO PARA ROMPIMENTO CELULAR EM <i>FRENCH PRESS</i> .	69
TABELA 13 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{7-4} PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (% M/V) SOBRE A ATIVIDADE DE α -GAL.	72

TABELA 14 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA ENSAIO COM SAIS E FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.	73
TABELA 15 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{7-4} PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS SOBRE A ATIVIDADE DE ALFA-GALACTOSIDASE EM VINHAÇA DE SOJA.	76
TABELA 16 -	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.	77
TABELA 17 -	CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM MEIO DE CULTIVO MRS.	91
TABELA 18 -	CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA.	93
TABELA 19 -	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA BIOMASSA (G/L) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM FERMENTAÇÃO EM VINHAÇA DE SOJA POR 24 h.	94
TABELA 20 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA BIOMASSA (G/L) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56.	95
TABELA 21 -	COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA BIOMASSA (G/L) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56.	96
TABELA 22 -	ATIVIDADE EXTRA E INTRACELULAR DE α -GAL.	97
TABELA 23 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA PURA.	100
TABELA 24 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) PARA CULTIVO DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA AJUSTADA.	101
TABELA 25 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA α -GAL – SOBRENADANTE E APÓS ROMPIMENTO CELULAR DO MEIO FERMENTADO DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56.	103
TABELA 26 -	EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) PARA FERMENTAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES.	105

TABELA 27 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRA E INTRACELULAR DE α -GAL POR <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> NRRL1 E <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	106
TABELA 28 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA (UFC/mL) DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM CALDO MRS.	108
TABELA 29 -	ATIVIDADE DE α -GAL (U/mL) E PH EM MEIO MRS _m SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E FERMENTADO POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	110
TABELA 30 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE α -GALACTOSIDASE (U/mL) E DE PH PARA OS TESTES COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.	112
TABELA 31 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (%) SOBRE A ATIVIDADE DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM MRS _m POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2 ⁷⁻⁴ .	113
TABELA 32 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).	114
TABELA 33 -	COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).	114
TABELA 34 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRS _m SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	116
TABELA 35 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRS _m .	118
TABELA 36 -	COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRS _m .	118

TABELA 37 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) E PH PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.	121
TABELA 38 -	ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.	123
TABELA 39 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (% M/V) SOBRE A α -Gal (U/mL) PARA <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2 ⁷⁻⁴ .	124
TABELA 40 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DIFERENTES ENSAIOS DE VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.	125
TABELA 41 -	COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA DIFERENTES ENSAIOS DE VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.	126
TABELA 42 -	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	127
TABELA 43 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.	129
TABELA 44 -	COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.	129
TABELA 45 -	ATIVIDADE DE α -GAL PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23.	132
TABELA 46 -	VALORES DE BIOMASSA (g/L), AÇÚCARES TOTAIS (g/L), ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h) PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM VINHAÇA DE	133

SOJA POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM ERLLENMEYERS.

TABELA 47 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -GALACTOSIDASE POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM BIORREATOR.	137
TABELA 48 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA PARA CADA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO.	140
TABELA 49 -	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM RELAÇÃO AO DESCRITO EM LITERATURA.	141
TABELA 50 -	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM RELAÇÃO AO DESCRITO EM LITERATURA.	141
TABELA 51 -	ATIVIDADE DE α -GALACTOSIDASE (U/mL) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO APLICANDO SISTEMA DE FILTRAÇÃO KASVI E VIVASPIN.	143
TABELA 52 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PROTEÍNAS TOTAIS (MG/ML) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO DE α -GALACTOSIDASE USANDO SISTEMA DE FILTRAÇÃO KASVI E VIVASPIN.	144
TABELA 53 -	ATIVIDADE DE α -GAL (U/mL) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO EM SISTEMA MILLIPORE.	146
TABELA 54 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PROTEÍNAS TOTAIS (mg/mL) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO APLICANDO SISTEMA MILLIPORE.	146

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 α -GALACTOSIDASE	25
2.2. CLASSIFICAÇÃO / MECANISMOS	27
2.2.1 Classificação	27
2.2.2 Mecanismos	28
2.3 FONTES E SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE α -GAL	29
2.3.1 Microrganismos produtores de alfa-galactosidase	29
2.3.2 Soja e derivados – Meio alternativo para a produção da alfa-galactosidase	33
2.4 APLICAÇÃO	35
2.4.1 Indústria de açúcar de beterraba	35
2.4.2 Processamento de alimentos de soja	35
2.4.3 Uso terapêutico	36
2.4.3.1 Tratamento da doença de Fabry	37
2.4.4 Fabricantes comerciais para uso terapêutico (alegações digestivas)	38
2.5 PATENTES PUBLICADAS SOBRE α -GAL	39
2.6 LINHAGENS MICROBIANAS APLICADAS NESTE TRABALHO	41
2.6.1 <i>Lactobacillus agilis</i>	42
2.6.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	43
2.7 BIORREATORES PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	46
2.8 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α -GAL	47
2.8.1 Métodos de rompimento celular	47
2.8.2 Etapas de purificação e concentração de α -Gal	52
2.8.3 Membranas de filtração	54
2.9 ELETROFORESE SDS-PAGE	58

3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 CEPAS BACTERIANAS EMPREGADAS PARA A PRODUÇÃO DE α -GAL	60
3.1.1 Origem das cepas	60
3.1.2 Ativação das linhagens bacterianas	60
3.1.3 Conservação das linhagens bacterianas	60
3.2 VINHAÇA DE SOJA	61
3.3 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE POR <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	61
3.3.1 Estudos para a produção de inóculo de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em caldo MRS	61
3.3.2 Estudos para a produção de inóculo de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em vinhaça de soja	62
3.3.3 Estudo para a otimização da composição química do meio à base de vinhaça de soja para a produção de α -Gal por fermentação submersa	62
3.3.4 Rompimento celular de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 por congelamento e sonicação	64
3.3.4.1 Rompimento celular por congelamento	64
3.3.4.2 Rompimento celular por sonicação	65
3.3.5 Estudo do efeito da combinação de congelamento e sonicação para rompimento celular de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56	65
3.3.6 Produção de α -Gal a partir de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em meio sintético suplementado com carboidratos indutores	66
3.4 PRODUÇÃO DE α -GAL NOVAS LINHAGENS: <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> NRRL1 E <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> CEPA PADRÃO INRA 23	66
3.4.1 Cultivo de inóculo das linhagens de <i>Lactobacillus curvatus</i> NRRL 1 e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23	66
3.4.2 Produção α -galactosidase por <i>Lactobacillus curvatus</i> NRRL 1 e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23	67
3.4.3 Estudos para a produção de inóculo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INR 23 em caldo MRS	67

3.4.4	Produção α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em vinhaça de soja	68
3.4.5	Produção α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em meio sintético	69
3.4.5.1	Estudo do efeito da adição de fontes de carbono sobre a atividade de α -Gal em meio sintético	70
3.4.5.2	Efeito da adição de fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em meio sintético	70
3.4.5.3	Otimização da composição química do meio de produção de α -Gal em meio sintético.	71
3.4.5.4	Otimização da composição de sais, fontes de carbono e nitrogênio para a produção de α -Gal em meio sintético	72
3.4.6	Produção α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em vinhaça de soja	73
3.4.6.1	Estudo do efeito adição de fontes de carbono sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja	73
3.4.6.2	Estudo do efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja	74
3.4.6.3	Otimização da composição química do meio de produção de α -Gal em vinhaça de soja	75
3.4.6.4	Otimização da composição de sais, fontes de carbono e nitrogênio para a produção de α -Gal em vinhaça de soja	76
3.4.7	Estudo da taxa de inoculação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 para a produção de α -Gal em vinhaça de soja	77
3.4.8	Cinética de produção de α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 com vinhaça de soja em frascos de Erlenmeyer	78
3.4.9	Cinética de produção de α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 com vinhaça de soja em biorreator do tipo tanque agitado	78
3.5	PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA α -GALACTOSIDASE EM SISTEMAS DE MEMBRANA	79
3.5.1	Microfiltração em sistema de filtração à vácuo	80
3.5.2	Ultrafiltração em sistema Vivaspin	80
3.5.3	Micro e ultrafiltração do extrato enzimático em sistema MILLIPORE®	81

3.6 ELETROFORESE SDS-PAGE	82
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	83
3.7.1 Atividade enzimática (U/mL) – Método pNPG	83
3.7.2 Determinação de proteínas totais – Método Bradford	85
3.7.3 Determinação da concentração de biomassa	85
3.7.4 Determinação de açúcares redutores – Método do DNS	86
3.7.5 Determinação de sólidos solúveis (° Brix)	87
3.7.6 Determinação do teor de nitrogênio	87
3.7.7 Determinação do teor de umidade	88
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1. CEPAS BACTERIANAS EMPREGADAS PARA A PRODUÇÃO DE α -GAL	89
4.1.1 <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56	89
4.1.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23	90
4.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE α -GAL POR <i>LACTOBACILLUS AGILIS</i> LPB 56 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	91
4.2.1 Estudos para a produção de inóculo de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em caldo MRS e vinhaça de soja	91
4.2.2 Otimização para fermentação de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em vinhaça de soja – Acompanhamento da evolução de biomassa (g/L) e pH	94
4.2.3 Produção e recuperação de α -Gal por <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em vinhaça de soja – Atividade extra e intracelular	97
4.2.4 Estudo do efeito da combinação de rompimento de células de <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 por congelamento e por sonicação sobre a atividade de α -Gal	100
4.2.5 Produção de α -Gal por <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 em meio sintético suplementado com fontes de carbono indutoras	103
4.3 PRODUÇÃO DE α -GAL POR <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> NRRL1 E <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23 EM MEIO SINTÉTICO E EM VINHAÇA DE SOJA	105
4.4 PRODUÇÃO DE INÓCULO DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> INRA 23	107

4.5. TESTES DE ROMPIMENTO CELULAR PARA RECUPERAÇÃO DA ENZIMA α -GAL PRODUZIDA POR <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA	109
4.6 PRODUÇÃO DE α -GAL A PARTIR DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM MEIO SINTÉTICO	110
4.6.1 Seleção de fontes de carbono suplementares da produção de α -Gal em meio sintético (MRSm)	110
4.6.2 Seleção de fontes de nitrogênio suplementares da produção de α -Gal em meio sintético (MRSm)	111
4.6.3 Estudo da influência de diferentes sais sobre a atividade de α -Gal	112
4.6.4 Otimização da composição do meio de produção de α -Gal – Estudo da concentração de sais, fontes de carbono e nitrogênio	115
4.7 PRODUÇÃO DE α -GAL A PARTIR DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA	121
4.7.1 Seleção de fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja	121
4.7.2 Seleção de fontes de carbono suplementares sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja	122
4.7.3 Otimização das concentrações de sais sobre a α -Gal em vinhaça de soja	124
4.7.4 Otimização da composição do meio de produção de α -Gal em vinhaça de soja – Estudo da concentração de sais, fontes de carbono e nitrogênio	127
4.7.5 Estudo da taxa de inoculação para a produção de α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em vinhaça de soja	132
4.7.6 Cinética de produção de α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em frascos de Erlenmeyer	132
4.7.7 Cinética de produção de α -Gal por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 em biorreator	135
4.8 EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E DA PRODUTIVIDADE (U/mL.h) PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM VINHAÇA DE SOJA	140
4.9 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA α -GAL	142

4.9.1. Microfiltração em sistema de filtração à vácuo e ultrafiltração por centrifugação	142
4.9.2. Micro e ultrafiltração em sistema MILLIPORE®	145
4.10 ELETROFORESE SDS-PAGE	147
5. CONCLUSÃO	149
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	150
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
ANEXO A – PREPARO DE SOLUÇÕES	162
ANEXO B – SOLUÇÕES PARA APLICAÇÃO DE ELETROFORESE SDS-PAGE	163
ANEXO C – PATENTE DEPOSITADA PARA PRODUÇÃO DE α-GAL	166

1. INTRODUÇÃO

A enzima α -Galactosidase (α -Gal), também chamada de α -D-galactosídeo galactohidrolase (E.C. 3.2.1.22) ou de melibiase, catalisa a hidrólise de ligações α -(1,6)-galactosídicas, causando a liberação de α -D-galactose (DU *et al.*, 2013). Estas ligações são encontradas em oligossacarídeos, sendo os mais comuns a estaquiose e a rafinose. Também estão presentes em polissacarídeos ramificados, tais como galactomananas e galacto (glico) mananas (NAUMOV, 2004). Estes oligossacarídeos estão presentes em leguminosas como ervilha, feijão e soja. São carboidratos de baixa massa molecular e não metabolizáveis no intestino humano pela deficiência/ausência de α -Gal. Isto pode levar a desconforto abdominal, devido à produção de flatulência, especialmente por *Clostridium perfringens* (GÓES *et al.*, 2002).

A α -Gal é uma enzima de grande aplicação industrial em produtos derivados de soja, reduzindo oligossacarídeos indesejáveis, e na produção de açúcar de beterraba. Entretanto, também pode ser utilizada para fins terapêuticos. Isto porque, ao reduzir a cadeia carbônica dos oligossacarídeos, diminui os distúrbios digestivos em pessoas com estilo de vida vegano ou em pessoas com problemas na produção de enzimas. Outro uso terapêutico diz respeito à doença de Fabry, doença de depósito lisossômico (DDL), genética e de caráter progressivo, a qual é causada pela deficiência ou ausência de uma enzima lisossômica, a α -Gal A (EC 3.2.1.22, codificada pelo gene GLA) (FRANCESCO *et al.*, 2013), causando problemas no sistema imune (CASTANEDA *et al.* 2008).

A vinhaça de soja é o principal subproduto gerado pela fermentação alcoólica de melação de soja. É o resíduo da destilação de produtos do processo de recuperação de etanol, contendo alta concentração de compostos orgânicos, essencialmente açúcares não redutores, essenciais para a produção enzimática. Devido à quantidade alta de DBO e DQO, a vinhaça não pode ser tratada como um efluente comum (SIQUEIRA, 2006). Sabe-se que aproximadamente 260 m³ por dia de vinhaça são gerados a partir de 10 m³ de etanol por dia em uma indústria brasileira processadora de grãos de soja (SIQUEIRA, 2006).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir a enzima α -Gal por bioprocessamento alternativo. Tal processo envolveu a fermentação submersa com o

emprego de vinhaça de soja, que naturalmente já propicia condições para produção enzimática devido à sua composição rica em oligossacarídeos. O uso deste resíduo também implica em um menor custo de produção e contribui para a redução dos impactos ambientais causados pelo descarte ou não aproveitamento do subproduto da indústria de soja, a vinhaça.

1.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi produzir a enzima α -galactosidase por processo de fermentação submersa a partir de resíduo industrial, a fim de obter um menor custo de produção e contribuir para a redução dos impactos ambientais causados pelo descarte ou não aproveitamento de subproduto da indústria de soja, a vinhaça.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Verificar meio sintético como alternativa para meio de fermentação, visando aplicação terapêutica da enzima e também evitando paradas de produção quando não houver disponibilidade de resíduo industrial.

1.2.2 Otimizar a produção de α -galactosidase em frascos Erlenmeyer e também em biorreator.

1.2.3 Purificar e concentrar a α -galactosidase obtida pela melhor condição de meio de cultivo.

1.2.4 Determinar a massa molecular da enzima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 α -GALACTOSIDASE

A enzima α -Galactosidase (α -Gal) (FIGURA 1), também chamada de α -D-galactosídeo galactohidrolase (E.C. 3.2.1.22) ou de melibiase, catalisa a hidrólise de ligações α -(1,6)-galactosídicas, causando a liberação de α -D-galactose (DU *et al.*, 2013).

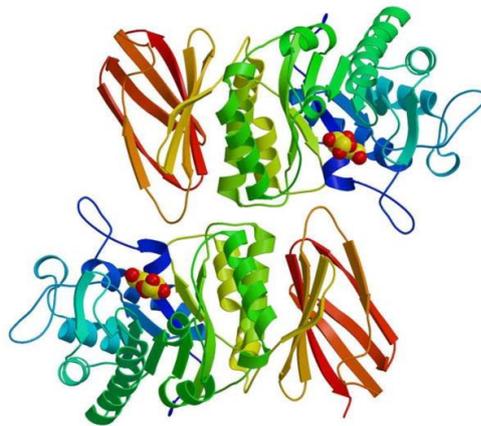


FIGURA 1 - ESTRUTURA DA α -Gal A
FONTE: NIH - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (1997).

As ligações α -(1,6)-galactosídicas são encontradas em oligossacarídeos, sendo os mais comuns a estaquiose e a rafinose. Também estão presentes em polissacarídeos ramificados, tais como galactomananas e galacto (glico) mananas (NAUMOV, 2004).

As diferenças estruturais entre estaquiose, melibiose e rafinose podem ser observadas nas FIGURAS 2, 3 e 4, respectivamente.

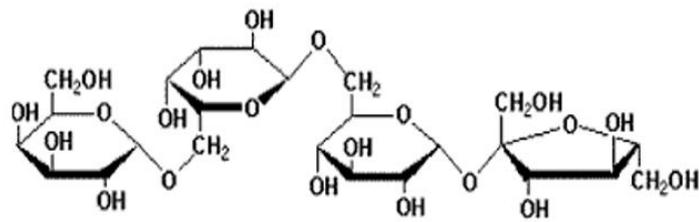


FIGURA 2 – ESTAQUIOSE.
FONTE: UNESP (2013a).

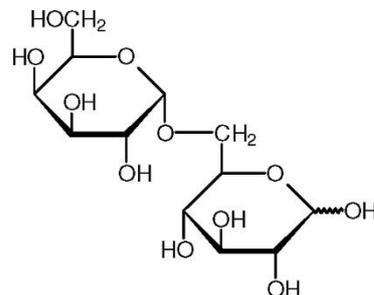


FIGURA 3 – MELIBIOSE.
FONTE: BIOCHEMISTRY (2013).

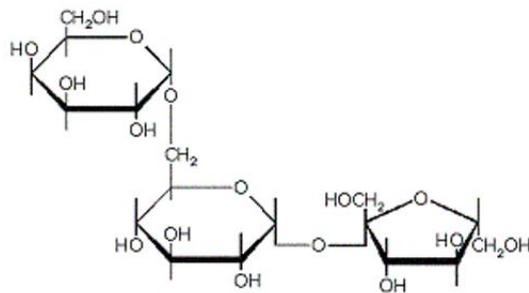


FIGURA 4 – RAFINOSE.
FONTE: UNESP (2013b).

Estes carboidratos estão presentes em leguminosas, tais como ervilha, feijão e soja. São açúcares de baixa massa molecular, não metabolizáveis no intestino humano pela ausência de α -Gal. Isto pode levar a desconforto abdominal devido à produção de flatulência, especialmente por *Clostridium perfringens* (GÓES *et al.*, 2002).

2.2. CLASSIFICAÇÃO / MECANISMOS

2.2.1 Classificação

De acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013), a enzima α -D-galactopiranosídeo galactohidrolase EC 3.2.1.22, terminologia criada em 1961, pode ser classificada da seguinte forma: nome aceito α -Galactosidase (α -Gal), mas também pode ser chamada de melibiase, α -D-galactosidase ou galactohidrolase α -galactosídeo. A α -Gal faz parte do grupo de enzima da classe 3, das hidrolases, que catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes. A subclasse 2 indica que é uma glicosidase, enquanto que o número 22 é a enzima propriamente dita (UFRJ, 2006).

A principal reação que catalisa é a de hidrólise do terminal não redutor α -D-galactose em α -D-galactosídeos, incluindo oligossacarídeos de galactose, galactomananas e galactolípidios. Também hidrolisa α -D-fucosídeos (galactosídeos e fucosídeos são carboidratos que diferem exclusivamente na posição 6 - nos fucosídeos um grupo metil substitui a hidroxila).

Sobre a massa molecular, a α -Gal de sementes de *Phaseolus coccineus* purificada e identificada por SDS-PAGE e filtração gel foi de 43 kDa (DU *et al.*, 2013), enquanto que a obtida por fermentação com *Aspergillus niger* ATCC 46890 correspondeu a 64 kDa (ADEMARK *et al.*, 2001). Anisha *et al.* (2009), por sua vez, obtiveram 3 enzimas do tipo α -Gal por *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447, com massas moleculares de 72, 57 e 35 kDa. Deste modo, observa-se significativa variação da massa molecular enzimática quando se altera a fonte produtora de α -Gal.

2.2.2 Mecanismos

As enzimas α -Gal catalisam a hidrólise de ligações α -1,6 de α -galactosídeo de galacto α -oligossacarídeos da família de açúcares rafinose e polissacarídeos de galactomanano com muitas aplicações biotecnológicas e médicas (GOTE *et al.*, 2007). Este mecanismo pode ser observado na FIGURA 5.

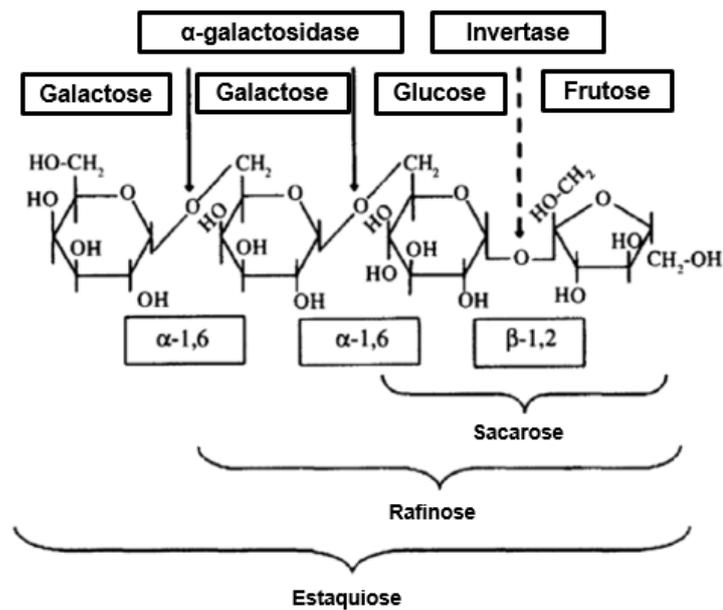


FIGURA 5 - ESTRUTURAS DOS α -GALACTOSÍDEOS EM SOJA: ESTAQUIOSE E RAFINOSE. FONTE: ADAPTADO DE LEBLANC *ET AL.* (2004).

De acordo com a figura anterior, podemos notar que a α -Gal atua sobre a estaquiiose, liberando uma molécula de galactose e uma de rafinose e a partir da rafinose libera galactose e sucrose, que por sua vez pode ser lisada pela invertase para aplicação em diversos processos industriais.

2.3 FONTES E SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE α -Gal

A α -Gal é amplamente distribuída em microrganismos, plantas e animais, sendo que sua produção depende do substrato utilizado e das condições aplicadas às fontes produtoras (ADEMARK *et al.*, 2001).

Neste tópico foram citadas as fontes microbianas mais relevantes para a produção da enzima, especialmente as bacterianas e as fúngicas.

2.3.1 Microrganismos produtores de α -Gal

Algumas fontes de α -Gal de origem microbiana podem ser observadas na TABELA 1. Já em relação à enzima de origem fúngica, os dados encontram-se nas TABELAS 2 e 3.

A α -Gal de origem bacteriana (TABELA 1) é exclusivamente obtida por fermentação submersa (FSm), variando condições de pH, temperatura e agitação para cada linhagem aplicada. Para os valores de atividade enzimática listados, o valor mínimo foi de 1,1 U/mL para *Lactobacillus fermenti* NRRL B-585 (MUDGETT e MAHONEY, 1985). Para *Lactobacillus agilis* LPB 56 foi obtido 11,07 U/mL em vinhaça de soja (SANADA *et al.*, 2009), enquanto que para a linhagem *Streptomyces griseoalbus* MTCC 7447 foi descrita a produção de 50,3 U/mL após otimização do meio de cultivo, sendo a melhor condição a contendo 10g/L de agente geleificante LBG (*locust bean gum*), 3 g/L de extrato de levedura, 3,03 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4 e 0,49 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A temperatura aplicada foi de 30°C (ANISHA, SUKUMARAN e PREMA, 2008).

Para os valores de atividade específica, destaca-se a produção por *Bifidobacterium brevis* 203, que em cultivo contendo glucose apresentou 61,00 U/g, chegando a 2.000,00 U/g quando em meio adicionado de rafinose (XIAO *et al.*, 2000).

TABELA 1 - FONTES DE α -Gal DE ORIGEM BACTERIANA.

Linagem	Tipo de cultivo	Meio utilizado; tempo de fermentação	Atividade enzimática específica	Atividade enzimática	Referência
<i>Bifidobacterium longum</i> MB227			1,81 U/g	-	
<i>Bifidobacterium breve</i> MB252	FSm Cultivo estático	Meio modificado de Iwata: Bacto-triptona, 10 g; <i>Bacto-yeast extract</i> , 5 g; Bacto-triptose, 5 g; lactose, 3 g; citrato diamônico hidrogenado, 2,5 g; piruvato de sódio, 1,2 g; cisteína-HCl, 0,3 g; Tween 80, 1 g; MgSO ₄ .7 H ₂ O, 0,5 g; MnSO ₄ .4 H ₂ O, 0,12 g; FeSO ₄ .7 H ₂ O, 0,03 g e água destilada. 12 a 24h.	1,62 U/g	-	SCALABRINI <i>et al.</i> (1998)
<i>Bifidobacterium infantis</i> MB257			1,55 U/g	-	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> MB239			1,11 U/g	-	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> MB243			1,61 U/g	-	
<i>Lactobacillus fermenti</i> NRRL B-585	FSm	Caldo MRS; 24h.	4,3 U/g	1,1 U/mL	MUDGETT e MAHONEY (1985)
<i>Bifidobacterium brevis</i> 203	FSm (sob CO ₂)	Caldo PYF (peptona/extrato de levedura e solução de Fildes), adicionado de 0,5% (m/v) de glucose ou rafinose; 24h.	Crescimento em glucose: 61 U/g. Crescimento em rafinose: 2000 U/g	-	XIAO <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 25 1	FSm	Caldo LAPTg, de acordo com Raibaud <i>et al.</i> (1961); 24h.	-	-	GARRO <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIM – 5146	FSm	Farinha de soja, extrato de levedura e sulfato de amônio; 24h.	-	2,0 U/mL	GOTE <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 722	FSm	Caldo MRS; 24h.	-	5,0 U/mL	LEBLANC <i>et al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56	FSm	Vinhaça de soja; 144 h.	-	11,07 U / mL	SANADA <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus curvatus</i> R08 e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> JK55	FSm	Caldo MRS modificado; 24h.	-	4,98 U/mL com cultura mista; 5,47 U/mL com <i>L. mesenteroides</i> JK55 puro	YOON e HWANG, 2008
<i>Streptomyces griseoalbus</i> MTCC 7447	FSm	Meio contendo LBG (<i>Iocust bean gum</i>) 10g/L, ext. de levedura 3 g/L, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 3.03 g/L, KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L, MgSO ₄ .7H ₂ O 0.49 g/L; 48h.	-	50,3 U/mL	ANISHA, SUKUMARAN e PREMA (2008)

Em relação a α -Gal fúngica (TABELA 2), pode ser empregada a técnica de fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm), com temperatura na faixa de 30 a 45°C. Observa-se uma alta produção enzimática descrita por LIU *et al.* (2007) para *Aspergillus foetidus* ZU-G1, em que a atividade de α -Gal atingiu aproximadamente 65 U/mL.

TABELA 2 - FONTES DE α -Gal DE ORIGEM FÚNGICA E LEVEDURA.

Linhagem	Tipo de cultivo	Meio	Atividade enzimática específica	Atividade enzimática	Referência
<i>Aspergillus sojae</i> ATCC11906	FSm	Meio YpSs modificado	-	10,4 U/mL	GURKOK <i>et al.</i> (2011)
<i>Humicola</i> sp. NCIM 1252	FES	Farinha de soja	44,6 U/g 5°C	-	KOTWAL <i>et al.</i> (1998)
	FSm	Farinha de soja	13,9 U/g 5°C	-	
<i>Aspergillus foetidus</i> ZU-G1	FSm	3.2% farinha de soja (m/v), 2% farelo de trigo (m/v), 0,1% KH ₂ PO ₄ (m/v) e 0,05% de FeSO ₄ ·7H ₂ O (m/v)	-	64,75 U/mL	LIU <i>et al.</i> , (2007)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FES	RGPW - Red Gram Plant Waste	3,4 U/g	-	SHANKAR e MULIMANI (2007)
	FES	Farelo de trigo	2,7 U/g	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i> YGSC1453 MEL1 (variedade mutante)	FSm	Melaço de cana com 4% (m/v) de açúcares fermentáveis totais; 2% (m/v) melibiose; 0,05% (m/v) ureia e 0,2% (m/v) monofosfato de amônio	-	-	VINCENT <i>et al.</i> (1999)

Em se tratando da produção da enzima por levedura, Ruiz, Acosta e Cisneiros (1995), afirmaram que clones de *Saccharomyces* sp. obtidos por meio de mutação à luz ultravioleta conseguiram produzir α -Gal sem necessidade do uso de fonte de carbono.

No estudo de Kotwal *et al.* (1998), além das diferentes técnicas de fermentação testadas, ou seja, FES, FSm e fermentação semi-sólida (FESS), com *Humicola sp.* NCIM 1252, foram estudadas também cinco condições de cultura (TABELA 3). O maior valor encontrado para α -Gal obtida em FES foi de 44,6 U/g com farinha de soja, sendo que com o mesmo substrato foram produzidas 13,9 U/g em FSm. De uma forma geral, a produção da enzima foi melhor quando realizada em FES para todos os substratos. A farinha de soja promoveu uma melhor produção, provavelmente, devido à sua composição em rafinose, estaquiose e melibiose.

TABELA 3 - PRODUÇÃO DE α -Gal A PARTIR DE *HUMICOLA SP* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E SUBSTRATOS (ADAPTADO DE KOTWAL *et al.*, 1998).

	Atividade enzimática do substrato original (U/g)			
	FES	FESS ¹	FESS ²	FSm ²
Resíduo de coco	40,9	19,4	17,2	12,6
Farelo de trigo	25,2	16,1	12,5	7,2
Resíduo de amendoim	30,4	14,9	14,5	10,0
Farinha de soja	44,6	31,8	30,7	13,9
Resíduo de soja	14,7	7,5	6,1	4,9

¹Estacionária. ²Agitada.

Entretanto, o melhor resultado dentre os apresentados nas TABELAS 2 e 3 foi para a enzima proveniente do fungo *Aspergillus foetidus* ZU-G1 estudado por LIU *et al.*, (2007), correspondendo a atividade de 64,75 U/mL após 96h em meio otimizado : 3,2% de farinha de soja (m/v), 2% de farelo de trigo (m/v), 0,1% de KH₂PO₄ (m/v) e 0,05% de FeSO₄·7H₂O (m/v), com pH inicial de 6,31.

Sobre a α -Gal proveniente de fonte vegetal, poucas informações são reportadas no meio científico. Sabe-se que a enzima extraída de sementes de soja tem massa molecular de aproximadamente 300 kDa e temperatura ótima de atividade enzimática de 45-50°C (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Já a enzima proveniente da planta *Phaseolus coccineus* apresenta temperatura ótima de 70°C e pH ótimo de atuação de 3,0 (DU *et al.*, 2013). Mujer, Ramirez e Mendonza (1984) estudaram a atividade enzimática da enzima em coco, concluindo que a atividade aumenta com a idade da planta. A função principal da enzima é degradar as galactomananas de reserva das sementes no início da germinação.

Chrost e Schimitz (1997) estudaram a α -Gal proveniente de melão (*Cucumis melo*) e observaram que plantas da família das *Cucurbitaceas* apresentam duas variedades da enzima, sendo que uma possui pH ótimo de atuação em meio ácido e outra em meio alcalino. A distribuição e função destes dois tipos dependem do desenvolvimento e dos tecidos da planta.

Ainda, de acordo com os autores, a atividade mais alta da enzima foi detectada no melão maduro, onde ocorre a clivagem da rafinose pela enzima resultando em sacarose e galactose. Este último carboidrato é tóxico para a planta e é então rapidamente utilizado para a biossíntese de moléculas de sacarose, o qual é metabolizável pelo vegetal.

2.3.2 Soja e derivados – Meio alternativo para a produção da α -Gal

A produção de soja em 2014 correspondeu a 86.769.230 toneladas, com produtividade média de 2.897 kg/ha segundo o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015).

O consumo humano de produtos derivados da soja tem sido limitado pela presença de oligossacarídeos não digeríveis (NDOS, como estaquiose, rafinose e melibiose). Tal fato se deve que, na maioria dos mamíferos, incluindo o homem, há menor quantidade de α -Gal pancreática. Tais NDOS podem ser fermentados por microrganismos fermentadores presentes no ceco e no intestino grosso, causando flatulência e outros distúrbios gastrointestinais em indivíduos sensíveis (LE BLANC *et al.*, 2004). NDOS tais como estaquiose, melibiose e rafinose estão presentes em quantidade aproximada de 100 a 150 g/kg de sementes de soja (GÓES *et al.*, 2002).

Industrialmente, na produção de farelo de soja, há geração de um co-produto denominado melaço, rico em açúcares. A partir de um processo desenvolvido pela Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, em parceria com uma empresa privada de processamento de soja, a fermentação do melaço de soja gera etanol e vinhaça como resíduo (KARP *et al.*, 2011).

A vinhaça de soja é obtida pela destilação de produtos do processo de recuperação de etanol. Apresenta alta concentração de compostos orgânicos, essencialmente açúcares não redutores, não podendo ser tratada como um efluente

comum (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Sabe-se que aproximadamente 260 m³ por dia de vinhaça são gerados a partir de 10 m³ diários de etanol produzidos em uma indústria brasileira processadora de grãos de soja (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

O processo simplificado ocorre conforme FIGURA 6.

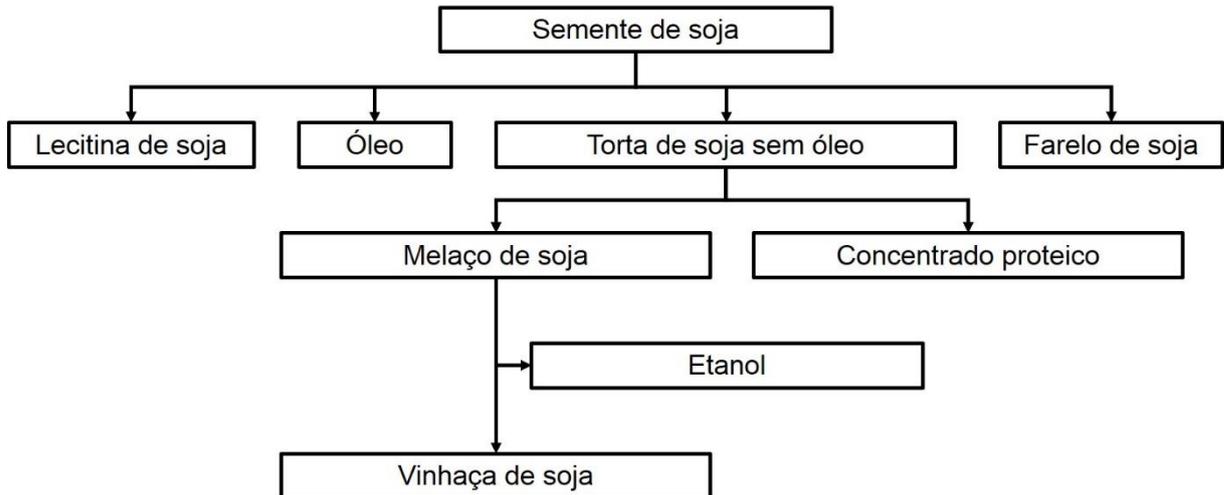


FIGURA 6 - ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE SOJA DA SEMENTE À VINHAÇA
 FONTE: ADAPTADO DE SIQUEIRA *ET AL.* (2008).

A vinhaça de soja é uma solução com elevado teor de açúcares gerado na fermentação de melaço de soja para produção de etanol (IMCOPA, 2015; MACHADO, 1999). A composição dos dois resíduos industriais está apresentada na TABELA 4.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MELAÇO E VINHAÇA DE SOJA
 (ADAPTADO DE SIQUEIRA *et al.*, 2008 e KARP *et al.*, 2011).

Componente	Melaço (% em base seca)	Vinhaça (% em base seca)^a
Estaquiose	18,60	11,09
Rafinose	9,68	22,07
Sacarose	28,40	0,00
Glucose	0,24	0,00
Frutose	0,13	0,00
Galactose	0,25	1,84
Carboidratos totais	57,30	35,00
Proteínas	9,44	13,30
Lipídios	21,20	27,80
Minerais	6,36	9,24
Fibras	5,70	14,60

^a Amostras realizadas em triplicata (desvio-padrão não superior a 7%).

Observa-se que há uma diminuição do teor de açúcares totais e também da sacarose do melaço para a vinhaça de soja, em função da fermentação do primeiro para a produção de etanol. A composição em carboidratos da vinhaça de soja é predominantemente representada por estaquiose (11,09%), rafinose e estaquiose parcialmente hidrolisados (22,07%) e açúcares que não foram metabolizados durante a fermentação alcoólica de melaço de soja (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Deste modo, é um resíduo industrial que pode ser utilizado para produção de α -Gal por fermentação submersa (SANADA, 2009).

2.4 APLICAÇÃO

As aplicações industriais mais importantes de α -Gal são: indústria de açúcar de beterraba, processamento de alimentos de soja e para uso terapêutico em humanos (GOTE *et al.*, 2007).

2.4.1 Indústria de açúcar de beterraba

A rafinose é uma das principais impurezas na produção de açúcar de beterraba, tendo forte efeito sobre a morfologia e a taxa de crescimento dos cristais de sacarose (MARTIN, NARUM e CHAMBERS, 2001). Em geral, este açúcar corresponde a aproximadamente 1% (m/m) do açúcar de beterraba, podendo causar problemas de estabilidade durante estocagem e baixo rendimento total do processo (NAKATA *et al.*, 2012).

Para evitar este problema, indica-se a quebra da molécula de rafinose em carboidratos de menor cadeia a partir do uso de enzima no processo de fabricação.

No estudo de Fallahpour *et al.* (2007), por exemplo, enzimas imobilizadas no formato de esferas promoveu melhora na qualidade do açúcar de beterraba, uma vez que os cristais formados foram mais homogêneos em decorrência da melhora no meio de produção, em que houve abaixamento do pH e melhoria da transferência de massa.

2.4.2 Processamento de alimentos de soja

Em leguminosas, tais como ervilha, feijão e principalmente a soja, o teor de oligossacarídeos é elevado. Na soja, há especialmente grande quantidade de

estaquiose e rafinose, que são carboidratos de baixa massa molecular, os quais não são metabolizáveis no intestino humano pela ausência de α -Gal (GÓES *et al.*, 2002).

No intuito de aumentar a aceitabilidade da soja na alimentação, vários métodos são usados para a redução do teor destes oligossacarídeos: o tratamento enzimático, a hidratação dos grãos, o cozimento, a fermentação e a germinação. Entre estes, tratamento enzimático tem sido o mais indicado, por sua especificidade e condições brandas de processamento, que evitam maiores perdas sensoriais e nutricionais dos alimentos (GÓES *et al.*, 2002).

2.4.3 Uso terapêutico

Para uso terapêutico, recomenda-se produzir a enzima a partir de fontes de baixíssima ou nula toxicidade, a fim de diminuir as etapas de purificação e os riscos aos consumidores. Deste modo, podem ser utilizadas, por exemplo, cepas de bactérias intestinais probióticas e com crescimento melhor na presença de rafinose do que em glucose, tais como as estudadas por Xiao *et al.* (2000) (TABELA 5). Em geral, linhagens do gênero *Bifidobacterium* produzem mais biomassa em meio de cultivo contendo rafinose, enquanto que *Lactobacillus* necessitam de glucose para multiplicação das células.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS EM MEIO CONTENDO RAFINOSE E GLUCOSE (ADAPTADO DE XIAO *et al.*, 2000).

Linhagens probióticas	Biomassa em massa seca (mg/mL)*	
	Crescimento com rafinose	Crescimento com glucose
<i>Bifidobacterium breve</i> 203	1,52	1,45
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM119	1,95	1,64
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> JCM 1205	1,41	1,49
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217	2,01	1,88
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM1222	1,93	1,56
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM7004	1,83	1,37
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> AKU1125	0,34	1,31
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IFO3533	0,28	1,27
<i>Lactobacillus casei</i> IFO3425	0,42	1,16
<i>Lactobacillus sake</i> IFO3451	0,32	0,58
<i>Lactobacillus breve</i> AKU1203	0,43	1,08
<i>Lactobacillus helveticus</i> IFO3219	0,31	1,19

* Cultivo de bactérias em estufa a 37°C por 48h.

2.4.3.1 Tratamento da doença de Fabry

A doença de Fabry é uma doença genética, de caráter hereditário, que causa a deficiência ou a ausência da enzima α -galactosidase A (α -Gal A) no organismo de seus portadores. É uma das 45 doenças de depósito lisossômico. A deficiência enzimática interfere na capacidade de decomposição de uma substância adiposa específica, denominada globotriaosilceramida, também chamado de Gb3. A doença de Fabry é crônica, progressiva e atinge vários órgãos e sistemas do organismo (ABRAFF, 2013).

De acordo com Togawa *et al.*, (2012), pacientes homens com baixa ou nenhuma atividade de α -Gal exibida na “forma clássica” de doença de Fabry desenvolveram dores nas extremidades periféricas, hipo-hidroze, angioqueratomas, opacidades corneanas e comprometimento cardíaco, renal e vascular cerebral.

Pela gravidade da patologia, o diagnóstico precoce está se tornando cada vez mais importante, desde a triagem neonatal e exames para pacientes de alto risco (histórico familiar). Para o tratamento desta doença pode ser aplicada a Terapia de Reposição Enzimática (*Enzyme Replacement Therapy* - ERT) com α -Gal A recombinantes (SCHIFFMANN *et al.*, 2006; WEIDEMANN *et al.*, 2009).

Os ensaios clínicos de terapia de substituição de enzimas têm sido relatados em pacientes com a doença de Fabry, utilizando infusões de plasma normal, α -Gal A purificada a partir de placenta ou de α -Gal A purificada a partir do baço ou do plasma e também de fontes microbianas (SHAALTIEL *et al.*, 2011).

Entretanto, novas fontes de α -Gal têm sido estudadas para a terapia enzimática, já que foram relatadas algumas manifestações clínicas durante a administração intravenosa: dor de cabeça, febre, tosse, náuseas, alucinação visual e sintomas de ordem alérgica, tais como urticária, erupções cutâneas e inchaço da língua (SMID *et al.*, 2013).

De maneira geral, pode-se notar que a aplicação de α -Gal ocorre industrialmente tanto na fabricação de açúcar de beterraba, quanto em produtos derivados de soja. Terapeuticamente, seu uso é voltado para pessoas com doença de Fabry, veganos e pessoas com problemas digestivos. Para tal, já existem remédios sendo comercializados conforme descrito no tópico a seguir.

2.4.4 Fabricantes comerciais para uso terapêutico (alegações digestivas)

No que diz respeito aos produtos comerciais contendo enzimas para fins terapêuticos, pode-se dizer que o maior público consumidor corresponde aos veganos e vegetarianos, já que os alimentos com uma grande quantidade de oligossacarídeos podem causar desconforto abdominal, devido à produção de gás por bactérias que fermentam estes açúcares no intestino.

Assim, alguns destes suplementos alimentares contendo α -Gal estão listados na TABELA 6.

TABELA 6 - SUPLEMENTOS COMERCIAIS CONTENDO α -Gal.

Nome	Marca	Enzimas e complementos	Quantidade α -Gal por porção / cápsula; valor	Referência
Alpha-galactosidase	Nutriteck® Canada/United States	α -Galactosidase	1000 Gal U U\$0.13/g	Nutritech.com, (2014)
Alpha galactosidase from <i>Aspergillus niger</i>	Bean-Zyme® United States	α -Galactosidase	300 Gal U U\$0.08/cápsula	Bean-Zyme® (2013), Amazon.com, (2014)
Alpha-galactosidase - enzyme tablets	Beano® United States	α -Galactosidase	450 Gal U U\$0.22/g	Beano® (2014), IHerb.com, (2014)
Digestive Enzymes	Baseline Nutritionals® United States	α -Galactosidase	150 Gal U U\$0.39/cápsula	Baseline Nutritionals.com (2014)
Digestive Health Supplement	Elle Belle UK® England	Mistura de enzimas digestivas: amilase, celulase, caseína protease, invertase, fitase, lipase, pentosanase (hemi celulose), α -Gal; probióticos <i>Lactobacillus Acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>	1 g/100g U\$0.16/g	ElleBelleUK® (2014)
Gas Enzyme Alpha-galactosidase	Vitacost® United States	α -Galactosidase	300 Gal U U\$0.12/g	Vitacost® (2014)
Pancreatic enzymes & alpha-galactosidase	AOR Zymes® Canada	α -Galactosidase, amilase, lipase e protease	625 AGS unidades - 25 mg U\$0.58/cápsula	Supplete.com, (2014)

De acordo com a TABELA 6, o custo dos produtos para o ano de 2014 variou de U\$0.08-U\$0.58/cápsula e U\$0.13-U\$0.22/g, dependendo da composição, unidades de α -Gal e da ação específica no organismo, caso seja aplicada somente como suplemento digestivo ou para problemas pancreáticos, por exemplo.

De maneira geral, pode-se afirmar que a α -Gal é reconhecidamente uma enzima de aplicação industrial, já que é utilizada no ramo alimentício para produção de açúcar de beterraba e para produtos derivados de soja, além da aplicação terapêutica para vegetarianos e veganos, pessoas com problemas digestivos e em pacientes da doença de Fabry.

2.5 PATENTES PUBLICADAS SOBRE α -GAL

A fim de elencar os estudos sobre produção de α -Gal, especialmente a partir de resíduo industrial, foi realizado levantamento bibliográfico de artigos científicos, citados no decorrer do presente trabalho, e também de patentes. O único artigo que consta vinhaça de soja como meio de fermentação para a produção de enzima foi o de Sanada (2009), em que o estudo também foi realizado no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, pela bactéria *Lactobacillus agilis* LPB 56. Para *Leuconostoc mesenteroides*, Yoon e Hwang (2008) utilizaram cultura mista de *Lactobacillus curvatus* R08 e *Leuconostoc mesenteroides* JK55 a fim de estudar redução dos oligossacarídeos de soja.

Sobre as patentes, nenhuma envolve uso de resíduo industrial e nem o uso das linhagens *Lactobacillus agilis* ou *Leuconostoc mesenteroides* como cepas produtoras.

✓ Patentes envolvendo produção de α -Gal:

- A patente **U.S Patent 3966555**, de Arnaud e Bush, com data de publicação de 29/06/1976 (“*Alpha-galactosidase production*”) descreve a produção de α -Gal por cultura de *Penicillium duponti* via fermentação submersa contendo pelo menos um açúcar e com pelo menos uma ligação do tipo α -D-galactopiranosil.
- A patente **WO 2004074496 A1**, de Baillon *et al.*, publicada em 02/09/2004 (“*Food product and process for their preparation by enzymatic galactosyltransfer with Lactobacillus alpha-galactosidase*”) diz respeito ao processo de produção de oligossacarídeo a partir do uso combinado de substrato e enzima α -Gal proveniente de lactobacilos. Tal oligossacarídeo promove o aumento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal animal.

- A patente **WO 1990011353 A1**, de Calhoun e Coppola, de 04/10/1990 (“*Recombinant alpha-galactosidase, a therapy for fabry disease*”) trata da produção de α -Gal A recombinante, obtida por vetores de expressão de baculovírus e vírus que proporcionam a expressão estável dos níveis extracelulares e intracelulares desta enzima em uma cultura de células de inseto. A enzima recombinante pode ser usada em terapia de substituição enzimática para tratar pacientes com doença de Fabry.
- A patente **US3867256 A**, de Narita *et al.*, publicada em 18/02/1975 (“*Method for production of alpha-galactosidase by microorganism*”) descreve o uso de *Circinella muscae* (Berlese et de Toni) e *Typica coreanus* (ATCC 20394) em meio de cultivo contendo açúcares indutores (lactose, melibiose e rafinose) para produzir a enzima α -Gal de elevada atividade e invertase de baixa atividade. Uma aplicação para os micélios contendo as enzimas produzidas é a adição em melão de beterraba, incluindo xarope ou sumo no decorrer da produção de açúcar de beterraba. Deste modo a enzima atua sobre a rafinose contida no melão de beterraba resultando em sacarose e galactose, melhorando o rendimento na obtenção de sacarose.
- A patente **US 20140170115 A1**, de Porubcan e Yonak, publicada em 19/06/2015 (“*Enzyme and Prebiotic Combinations for Enhancing Probiotic Growth and Efficacy*”) diz respeito ao estudo de crescimento de biomassa de probióticos a partir de combinações entre prebióticos (que atuam como substrato) e enzimas. Na patente, isomalto-oligossacarídeos, α -Gal e β -glucanase foram aplicados para potencializar o crescimento e/ou atividade de bifidobactérias, podendo estes microrganismos ser ingeridos isoladamente ou adicionado a alimentos, incluindo sobremesas.
- A patente **US6607901 B1**, de Schaffer e Zhifang, cuja publicação foi em 19/08/2003 (“*Alkaline alpha-galactosidase*”) trata de uma enzima isolada de um organismo que metaboliza alfa-galactosil contendo sacarídeos. Compreende uma α -Gal com uma atividade ótima em pH neutro a alcalino, capaz de hidrolisar especialmente rafinose.
- A patente **WO2011061736 A1**, de Shaaltiel *et al.*, 26/05/2011 (“*Alkaline alpha galactosidase for the treatment of Fabry disease*”) descreve a administração de α -Gal alcalina a um paciente com a doença de Fabry.
- A patente **CA2634273 C**, de Tzortzis *et al.*, publicada em 08/07/2014 (“*Alpha-galactosidase from Bifidobacterium bifidum and its use*”) diz respeito a uma α -Gal isolada de *Bifidobacterium bifidum* capaz de converter melibiose em dissacarídeos que podem ser incorporadas em vários produtos alimentares ou rações para animais

a fim de melhorar a saúde do intestino, devido ao crescimento de bifidobactérias, que atuam inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos.

- A patente **US6150171 A**, de Yernool *et al.*, 21/11/2000, (“*Thermostable alpha-galactosidase and methods of use*”) trata da produção de α -Gal termoestável a partir de um ácido nucleico isolado da bactéria *Thermotoga neapolitana*. O gene é clonado em um vetor de expressão elevada para fornecer grandes quantidades de enzima purificada, que possui aplicação em produtos derivados de soja submetidos à altas temperaturas para remover α -galactosídeos.

2.6 LINHAGENS MICROBIANAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

A aplicação de linhagens bacterianas para o presente trabalho baseou-se na ideia de obter maior produtividade enzimática em relação a fermentação fúngica que, apesar de muitas vezes atingir maior atividade enzimática, nem sempre está acompanhada de menor tempo de processo. Geralmente o pico de produção de α -Gal fúngica ocorre em 96h de processo, enquanto que a bacteriana costuma ser em 24h, conforme exposto no item 2.3.1 de “Revisão Bibliográfica”. Além disto, pela ampla utilização de bactérias lácticas tanto na indústria de alimentos, quanto na farmacêutica (SANTOS, RODRIGUES e TEIXEIRA, 2005), supõe-se menor ou nulo grau de toxicidade dos produtos obtidos, o que a priori reduziriam manifestações clínicas, especialmente alérgicas, como as que ocorrem para tratamento da doença de Fabry (SMID *et al.*, 2013).

As bactérias ácido-láticas (LAB – *lactic acid bacteria*) são microrganismos que podem estar presentes em vegetais, produtos cárneos e em laticínios. Sua aplicação está associada ao uso probiótico e a formação de aromas em alimentos, e também na produção de cosméticos (SANTOS, RODRIGUES e TEIXEIRA, 2005).

As LAB são microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos, sendo os gêneros mais estudados: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (BRUNO, 2011).

Tratando-se das condições de fermentação ideais para bactérias lácticas, sabe-se que cada linhagem possui condições adequadas de temperatura, substrato,

aeração e pH para que possam aumentar sua produção de biomassa e produzir os metabólitos associados ao seu crescimento (ADLER-NISSEN e DEMAÏN, 1994).

2.6.1 *Lactobacillus agilis*

A espécie bacteriana *Lactobacillus agilis* é um lactobacilo, em geral do tipo heterofermentativo facultativo (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995). Este microrganismo também é conhecido pela denominação *Lactobacillus plantarum* var. *mobilis*, estudado e isolado por Harrison e Hansen (1950) a partir de fezes de peru. O nome atual teve início com Sharpe *et al.* (1973) (ABIS *Encyclopedia*, 2009).

O crescimento pode ocorrer de 15 a 45°C, sendo a temperatura ótima de 37°C. Em relação ao metabolismo heterofermentativo facultativo, as hexoses são fermentadas quase exclusivamente a ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof ou, em algumas espécies, a ácido láctico, acético, etanol e ácido fórmico sob limitação de glucose; pentoses são fermentadas a ácido láctico e acético (ATCC - American Type Culture Collection, 2012).

A morfologia é de bastonete, de 0,7 – 1,0 x 3,0 – 6,0 µm, podendo apresentar-se de maneira individual, em pares ou em cadeias curtas, não sendo formadora de esporos (ABIS *Encyclopedia*, 2009).

Yamaguishi (2008) analisou o microrganismo selecionado *L. agilis* LPB 56 como sendo uma bactéria Gram positiva que se apresenta na forma de bastonetes em cadeia ou não, catalase negativa e não produz gás a partir da glicose. Quando cultivada em meio MRS apresenta metabolismo homofermentativo obrigatório, produzindo exclusivamente o ácido láctico. Esse fato pôde ser confirmado pela não produção de gás a partir da glicose, o que não a classificaria como bactéria heterofermentativa.

Todorov e Botes (2007), a partir de estudos de colonização de microrganismos patogênicos no intestino, verificaram que os lactobacilos possuem papel importante na estabilização da microflora intestinal, sendo aplicados como probióticos.

A fim de evitar que a produção de ácido láctico pelo lactobacilo prejudique seu crescimento durante a fermentação, o ácido láctico livre pode ser convertido em lactato por meio de agentes neutralizadores, como NaOH e CaCO₃. Entretanto, em estudos de Ghosh e Ghosh (2007), foi relatado que a presença de carbonato de cálcio

apresentou maior efeito inibidor de crescimento de biomassa que o hidróxido de sódio. Os testes foram realizados com culturas puras e co-culturas de lactobacilos, a 37°C, 180 rpm, 1.55 g/L (massa seca de biomassa) de inóculo com pH controlado a 5.60 a cada 12 h, sendo que a adição NaOH ou CaCO₃ como agente neutralizante foi de 2%.

Ainda de acordo com Ghosh e Ghosh (2007), os resultados dos experimentos com NaOH mostraram que a co-cultura produzia mais ácido do que cepas puras de *Lactobacillus*, enquanto com CaCO₃ a produção de ácido foi maior com cepas puras. Os baixos valores de biomassa e produção de ácido láctico com o carbonato de cálcio como agente neutralizante sugeriram que este teria efeito inibidor na performance da co-cultura.

Se tratando da oxigenação do meio de cultivo, sabe-se que para as linhagens de *Lactobacillus* sp. o maior consumo de oxigênio durante a fermentação ocorre para a fase estacionária, diferente do que o ocorre para *Leuconostoc* sp., *Brochothrix thermosphacta* e *Carnobacterium*, em que a taxa consumida deste gás está relacionada à fase exponencial (BORCH e GÖRAN, 1989).

2.6.2 *Leuconostoc mesenteroides*

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria do filo dos *Firmicutes*, classe Bacilli, ordem dos *Lactobacillales*. Pertence à família dos *Leuconostocaceae*, gênero *Leuconostoc* e espécie: *Leuconostoc mesenteroides*

Para o *Leuconostoc mesenteroides*, a temperatura ótima de crescimento é de 26°C, em condições aeróbias, apresentando crescimento em 24h – 48h após ativação em caldo MRS. Em ágar, as colônias são pequenas, circulares, inteiras, lisas, brilhante, opacas e esbranquiçadas. As células são Gram positivas, sem mobilidade. Possuem hastes curtas que ocorrem isoladamente, em pares ou em cadeias. A linhagem pode se apresentar na forma cocobacilar, especialmente quando em cadeias (ATCC, 2014b).

No que diz respeito às possíveis aplicações, sabe-se que o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* e o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* são comumente utilizados em culturas iniciadoras da indústria alimentícia, pois estão envolvidos na produção de aromas e na formação de textura característica em alguns produtos (FOUCAUD *et al.*, 1997; BOYAVAL, 1989).

Outra aplicação para *Leuconostoc mesenteroides* é a produção de dextrana (PELENC *et al.*, 1993), podendo inclusive ser obtida na forma extracelular em escala industrial por fermentação em batelada, sendo que ocorre simultaneamente ao crescimento do microrganismo (LAZI *et al.*, 1993).

Entretanto, dependendo da aplicação da linhagem, deve-se levar em consideração a necessidade de adicionar solução tampão, visto que o *Leuconostoc mesenteroides* converte boa parte dos carboidratos do meio de cultivo em ácidos. Esta diminuição de pH pode prejudicar o aumento de biomassa (FOUCAUD *et al.*, 1997). Deste modo, a fermentação deve ser equilibrada para haver produção de metabólitos em paralelo ao crescimento celular.

Sobre as condições de aeração ou não do meio de cultivo para *Leuconostoc mesenteroides*, Adler-nissen e Demain (1994) indicam que estas bactérias precisam de consideráveis concentrações de oxigênio para seu metabolismo, uma vez que o mecanismo envolve a atividade de NADH-oxidase e utiliza oxigênio para a regeneração do NAD⁺ a partir de NADH. Isto permite que o organismo redirecione a conversão de acetilfosfato a partir de etanol para ácido acético, onde um mol adicional de ATP é obtido para cada mol de glicose metabolizada. Esta energia liberada permite, por exemplo, que essa linhagem possa produzir os metabólitos desejáveis para a indústria alimentícia.

Dols *et al.* (1997) estudaram o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 durante o metabolismo de vários açúcares para produção de dextranase (FIGURA 7) e relataram diferença no comportamento microbiano dependendo da fonte de carbono adicionada e da aeração a qual ao sistema foi submetido. Por exemplo, em meio contendo glicose há maior incremento de biomassa em anaerobiose. Em contrapartida, para a frutose, metabolizada pela rota da fosfoquetolase, a taxa de crescimento é similar quando em condições aeróbicas. De maneira geral, observou-se que maiores condições de aeração para o meio de cultivo favorecem a produção de ATP, que pode ser utilizada na produção de metabólitos.

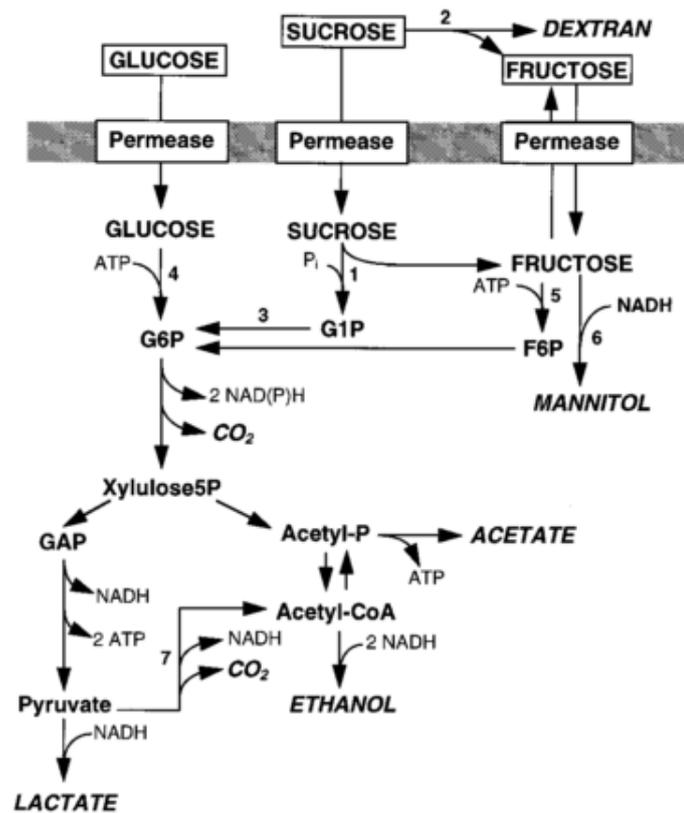


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ROTA METABÓLICA DE *LEUCONOSTOC MESSAGESEROIDES* DURANTE METABOLISMO DE VÁRIOS AÇÚCARES. G1P, GLUCOSE-1-FOSFATO; G6P, GLUCOSE-6-FOSFATO; F6P, FRUTOSE-6-FOSFATO; GAP, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO; ACETIL-P, ACETILFOSFATO; ACETIL-COA, ACETIL COENZIMA A; 1, SUCROSE FOSFORILASE; 2, DEXTRANA-SACARASE; 3, FOSFOGLUCOMUTASE (PGM); 4, GLUCOQUINASE; 5, FRUTOQUINASE; 6, MANITOL DESIDROGENASE; 7, PIRUVATO DESIDROGENASE. FONTE: DOLS *et al.* (1997).

Ainda sobre as condições de aeração e anaerobiose, Plihon, Taillandier e Strehaiano (1995) estudaram o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* sob aeração nas condições de oxigênio puro e ar comum, assim como em anaerobiose utilizando gás nitrogênio no meio de cultivo em caldo MRS. Foi observado crescimento em todos os ensaios aplicados, porém com maiores taxas de produção de biomassa para o sistema aeróbio, especialmente com oxigênio puro, com geração de 11 g (massa seca) por mol de oxigênio consumido. Os estudos comprovaram que a linhagem estudada tem seu crescimento diretamente proporcional à oxigenação do meio de cultivo.

Este fato leva a crer que para a produção de enzimas, especialmente da α -Gal, o microrganismo pode ser cultivado em aerobiose para altas produções de biomassa e, conseqüentemente, da enzima.

2.7 BIORREATORES PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Os biorreatores são equipamentos que permitem as reações catalisadas por células bacterianas, animais ou vegetais, ou também enzimas. Permitem produção em maior escala das condições de fermentação obtidas em laboratório, devendo sempre ser levados em consideração os parâmetros de aeração, agitação, pH e controle de temperatura (SCHMIDELL *et al.*, 2001; VENTURELLI (2013).

Para a produção enzimática industrial, geralmente é aplicado biorreator do tipo tanque agitado, tanto para linhagens bacterianas, como *Bacillus* sp., como para fúngicas do tipo *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Humicola* sp. Isto porque este sistema permite boas condições de escalonamento (50 a 250 m³), boas condições de assepsia e também bom controle de aerobiose, temperatura, pH, aeração e homogeneização do meio de fermentação, especialmente para transferência de oxigênio (BEDFORD e PARTRIDGE, 2010).

Este biorreator possui entradas de inóculo, adição de nutrientes e ainda válvulas de amostragem e adição de ácidos ou bases, assim como circulação de água de resfriamento e sistema de aeração, como pode ser observado na FIGURA 8.

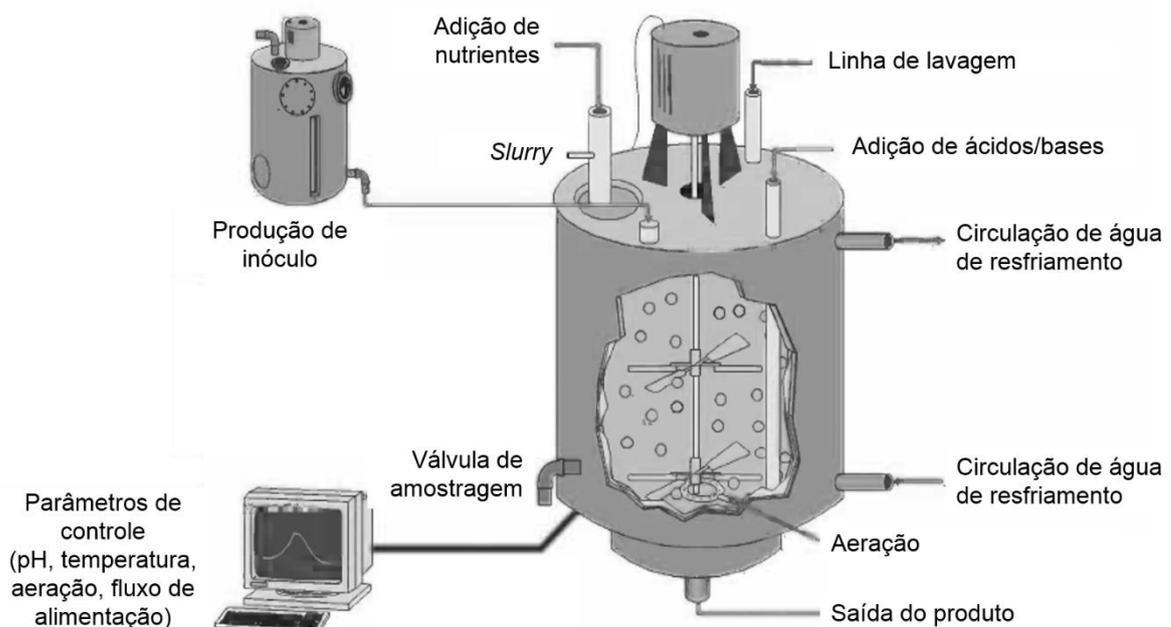


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE BIORREATOR INDUSTRIAL DO TIPO TANQUE AGITADO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.
 FONTE: ADAPTADO DE BEDFORD e PARTRIDGE (2010).

A produção enzimática utilizando biorreator do tipo tanque agitado já foi descrita, por exemplo, por Sanada *et al.* (2009) para obter α -galactosidase a partir da linhagem *Lactobacillus agillis* LPB 56, em que se aplicou 150 rpm de agitação para biorreator em escala laboratorial, com 14 L de capacidade volumétrica. A atividade enzimática obtida para este caso foi de 11,07 U/mL, com produtividade de 0,077 U/mL.h.

2.8 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α -GAL

A extração de α -Gal (FIGURA 9) geralmente tem início com a centrifugação do meio fermentado, na qual o sobrenadante é separado das células microbianas. Caso a enzima seja extracelular, o sobrenadante segue para dosagem enzimática e para etapas de purificação e concentração. Caso a enzima seja intracelular, há necessidade de realizar rompimento das células a partir de métodos químicos, físicos ou enzimáticos, que serão citados na sequência do presente trabalho.

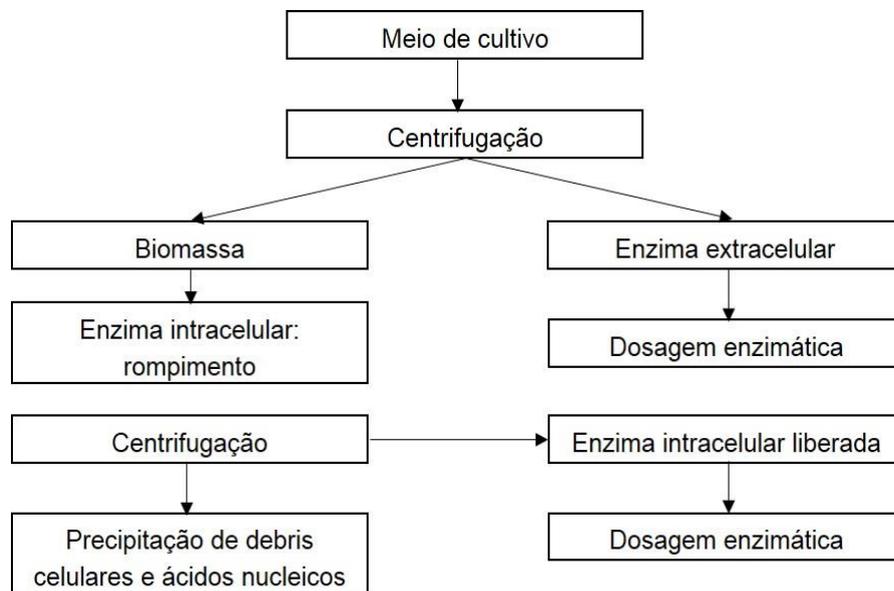


FIGURA 9 - ETAPAS DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ENZIMA α -GAL.

2.8.1 Métodos de rompimento celular

Os métodos de rompimento celular são aplicados quando o componente de interesse se encontra no meio intracelular ou na parede celular. Deste modo, é

necessário aplicar um procedimento no qual o composto seja liberado ao meio, para depois ser recuperado e purificado. Na FIGURA 10, há a subdivisão dos métodos de rompimento celular, sendo inicialmente divididos em dois grupos maiores: mecânicos e não mecânicos.

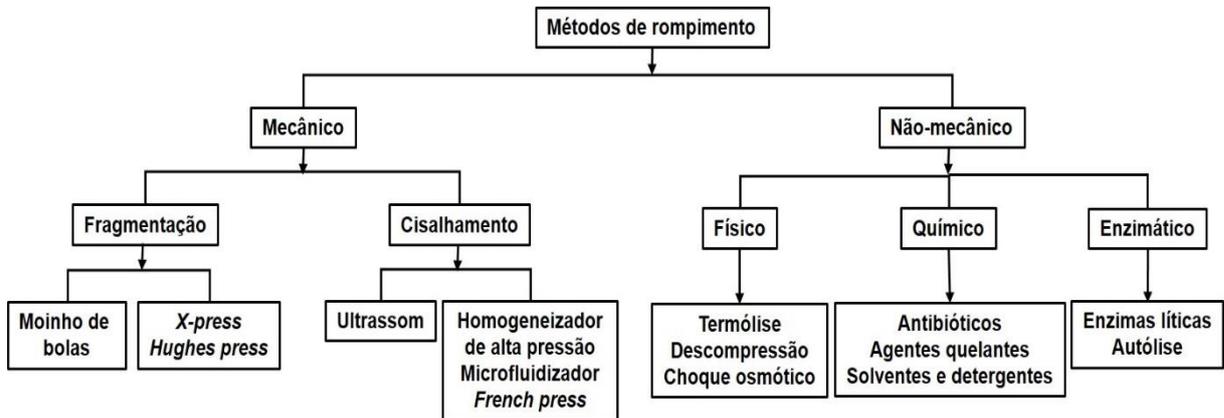


FIGURA 10 - MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR MICROBIANO.
FONTE: ADAPTADO DE GECIOVA *et al.* (2002).

De acordo com a figura acima citada, do grupo de rompimento mecânico, podem ser aplicados tratamentos como o *Bead Mill* (moinho de bolas), ultrassom, homogeneizador de alta pressão, microfluidizador ou *French Press*.

O rompimento não mecânico pode ocorrer devido a meios físicos, químicos ou enzimáticos. Do modo físico, podem ser citados a termólise, descompressão e choque osmótico. Quimicamente, para romper as células, podem ser utilizados antibióticos, agentes quelantes, solventes, detergentes, dentre outros. No caso da lise por enzimas, podem ser aplicadas enzimas líticas ou também realizar uma autólise (GECIOVA *et al.*, 2002).

Bury, Jelen e Kalab (2001) apresentaram a comparação entre *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 antes do rompimento celular e após os processos de sonicação, moinho de bolas e homogeneizador de alta pressão (FIGURA 11).

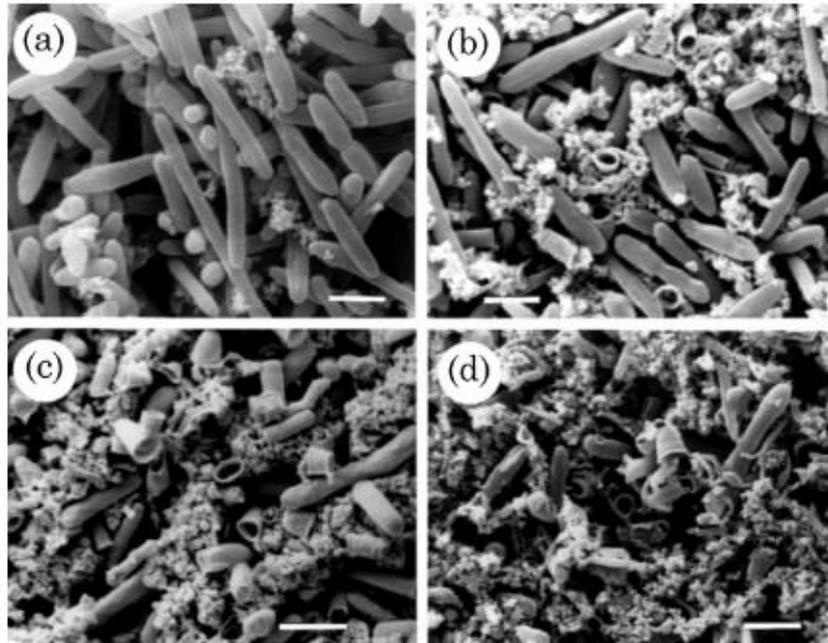


FIGURA 11 - (A) CÉLULAS DE *L. DELBRUECKII* SSP. *BULGARICUS* 11842 ANTES DO ROMPIMENTO. (B) CÉLULAS APÓS SONICAÇÃO POR 6 MIN. (C) CÉLULAS DEPOIS DO PROCESSO DE MOINHO DE BOLAS POR 6 MIN. (D) APÓS PASSAGEM EM HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESSÃO A 200 MPA, BAR 2 μ M (BURY *et al.*, 2001).

Também foram elencados os principais estudos de rompimento celular utilizando homogeneizador de alta pressão e sonicação (TABELA 7). Do homogeneizador de alta pressão, as condições de operação variaram de 50 a 150 MPa, geralmente com dois ciclos de passagem do meio fermentado pelo equipamento.

TABELA 7 - ROMPIMENTO CELULAR – CONDIÇÕES PARA HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESSÃO.

Microrganismo	Equipamento	Condições de operação	Referência
<i>E. coli</i> (ATCC 26)	nm-GEN 7400 series system by Stansted Power Fluids (Stansted, UK); NanoDeBee 45 by Bee International (South Easton, MA 02375, USA). Os dois equipamentos foram equipados com intensificador de alta-pressão.	Válvula de pistão cônico (no equipamento SFP) e orifício de 130 µm (no equipamento NDB)	DONSÌ <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus arizonensis</i> 143, 21	Homogeneizador de alta-pressão PANDA (Niro Soavi, Parma, Italy)	Um ciclo de 50, 100 e 150 MPa, ou 2 ciclos a 50 e 100MPa	LANCIOTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus casei</i> 28, 80,	Homogeneizador de alta-pressão PANDA (Niro Soavi, Parma, Italy)	Um ciclo de 50, 100 e 150 MPa, ou 2 ciclos a 50 e 100MPa	LANCIOTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> 11842	Mini-Lab Rannie high-pressure homogenizer ŽAPV, Wilmington, MA, USA.	135 Mpa. Suspensão celular refrigerada à 8±2°C	BURY <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>Lactis</i> (ATCC 4797)	nm-GEN 7400 series system by Stansted Power Fluids (Stansted, UK); NanoDeBee 45 by Bee International (South Easton, MA 02375, USA). Os dois equipamentos foram equipados com intensificador de alta-pressão.	Válvula de pistão cônico (no equipamento SFP) e orifício de 130 µm (no equipamento NDB)	DONSÌ <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus pentosus</i> 83, 57, 37	Homogeneizador de alta-pressão PANDA (Niro Soavi, Parma, Italy)	Um ciclo de 50, 100 e 150 MPa, ou 2 ciclos a 50 e 100MPa	LANCIOTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 75, 42, 8, 186, 147, 63, 58.	Homogeneizador de alta-pressão PANDA (Niro Soavi, Parma, Italy)	Um ciclo de 50, 100 e 150 MPa, ou 2 ciclos a 50 e 100MPa	LANCIOTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 16664)	Homogeneizador GEN 7400 series system by Stansted Power Fluids (Stansted, UK) e homogeneizador NanoDeBee 45 (Bee International, South Easton, MA 02375, USA).	Válvula de pistão cônico (no equipamento SFP) e orifício de 130 µm (no equipamento NDB)	DONSÌ <i>et al.</i> (2013)

Para a sonicação (TABELA 8), os pulsos variaram de 15s a 1 min, com frequência de 20 a 75 W, dependendo do aparelho utilizado e da linhagem microbiana.

TABELA 8 - ROMPIMENTO CELULAR – CONDIÇÕES PARA SONICAÇÃO.

Microrganismo	Equipamento	Condições de operação	Referência
<i>C. difficile</i> 630	Microson Ultrasonic Cell Desruptor XL (Misinox)	Esporos previamente tratados com solução tampão e tripsina foram sonicados com 30 e 50 pulsos de 15 s separados por 3 min de resfriamento em água gelada. Potência usada: 20 W.	ESCOBAR-CORTÉS <i>et al.</i> (2013)
<i>C. difficile</i> 630	Microson Ultrasonic Cell Desruptor XL (Misinox) em potência máxima (20 Watts)	Esporos ressuspensos com 50 mM de Tris-HCl e 0,5 mM tampão EDTA (pH 7,5); sonicação por 10 pulsos de 1 min, com resfriamento em gelo. 20 W de potência.	PAREDES-SABJA e SARKER (2012)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922, Culti-Loops Oxoid); <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212, Culti-Loops Oxoid).	Brason 250 Digital Ultrasonifier (20 kHz)	A ponta da sonda foi colocada no centro de um recipiente cilíndrico de 200 mL, contendo 100 mL da suspensão microbiana. Eletrodo submerso a 2 cm de profundidade. Resfriamento em banho de gelo.	FOLADORI <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 11842	Braun-Sonic 2000 sonicator (Ultrasonic Power Corp. Freeport, Ill., U.S.A.)	Bactérias lácticas foram ressuspensas em 50 mL de leite pasteurizado com 2% de lipídios ou tampão de acordo com o delineamento. Sonicação ocorreu a 4 min em banho de gelo. Equipamento operado a 75 Watts.	KREFT e JELEN (2000)

Para o rompimento de células, pode-se observar que não há melhor condição definida para cada microrganismo, sendo necessários testes confirmatórios para cada cepa bacteriana. Isto porque cada linhagem possui comportamento diferente quanto à liberação do conteúdo intracelular para o meio externo.

2.8.2 Etapas de purificação e concentração de α -Gal

Para a extração e purificação de α -Gal podem ser utilizadas diversas técnicas, com diferentes valores de recuperação enzimática, conforme apresentado na TABELA 9.

TABELA 9 - ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA PURIFICAÇÃO DE α -Gal.

Fonte	Estratégia de purificação	Purificação/Recuperação	Referências
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 46890	Precipitação com sulfato de amônio. <i>Fast Desalting Column</i> (Pharmacia).	Precipitação com sulfato de amônio: 2,9	ADEMARK <i>et al.</i> , (2001)
	Coluna de troca iônica de 1 mL Resource™ Q (Pharmacia).	Coluna de troca iônica (trocador aniônico) α -gal 1: 12 e α -gal 2:14	
	Coluna de filtração em gel pré-empacotada com Superdex 200 pg (Pharmacia).	Coluna de filtração em gel α -gal 1: 110 e α -gal 2: 22	
	Coluna dessalinizadora <i>Fast Desalting Column</i> . Coluna de troca iônica MonoS1ml (Pharmacia). FPLC (Pharmacia).	Coluna de troca iônica (trocador catiônico) α -gal 1: 300 e α -gal 2:61	
<i>Streptomyces griseoloalbus</i> MTCC 7447	Ultrafiltração Amicon, com peso molecular de corte (<i>cut-off</i>) de 10 kDa. Coluna cromatográfica de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose CL 4B (10 cm x 2.8 cm). Coluna Sephadex G-100 (30 cm x 3 cm)	13,7	ANISHA <i>et al.</i> (2008)
Sementes de <i>Phaseolus coccineus</i>	Coluna de troca iônica em DEAE-celulose e em CM-celulose, Q-Sepharose e SP-Sepharose. Coluna de filtração em gel em Superdex G-75 HR 10/30.	DEAE-celulose: 54.1 CM-celulose: 85.5 Q-Sepharose: 154.7 SP-Sepharose: 375 Superdex G-75: 479	DU <i>et al.</i> , (2013)
Grãos de soja germinados	<i>Aqueous Two-Phase System</i> (ATPS) com PEG 1500 Diálise <i>overnight</i> CM-Sepharose <i>Fast Flow column</i> (3x13 cm). Coluna concanavalina-A Sepharose (2x15,5 cm)	ATPS: 12.7 (69,9%) Diálise: 13,9 (45,8%) CM-Sepharose: preparação 1 128 (7,3%). Preparação 2: 352 (15,3%). Con-A, preparação 1: 545 (1,2%) Con-A, preparação 1: 2404 (2,0%)	GUIMARÃES <i>et al.</i> (2001)

No caso de Ademark *et al.*, (2001), por exemplo, partiram da cultura fermentada de *Aspergillus niger* ATCC 46890 e fizeram precipitação de α -Gal com sulfato de amônio, resultando em concentração de 2,9 vezes. Foram obtidas duas frações enzimáticas, α -gal 1 e α -gal 2, que seguiram para coluna de troca iônica, onde foram purificadas 12 e 14 vezes, respectivamente. Na coluna de filtração em gel, a α -gal 1 foi purificada 110 vezes e α -gal 2 22 vezes. Para coluna de troca iônica, a concentração foi de 300 vezes para α -gal 1 e 61 vezes para α -gal 2.

Anisha *et al.* (2009), por sua vez, trabalharam com α -Gal produzida por *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447, purificando-a por membrana de ultrafiltração Amicon, com massa molecular de corte (*cut-off*) de 10 kDa. Em seguida, foi utilizada coluna cromatográfica de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose CL 4B (10 cm x 2.8 cm) e coluna Sephadex G-100 (30 cm x 3 cm). Estas etapas conferiram à α -Gal uma purificação de 13,7 vezes.

Para a α -Gal extraída de sementes de *P. coccineus*, Du *et al.* (2013) purificaram e concentraram a enzima em coluna de troca iônica em DEAE-celulose e em CM-celulose, Q-Sepharose e SP-Sepharose, obtendo enzima 479 vezes mais concentrada.

Guimarães *et al.* (2001) purificaram a enzima de grãos de soja germinados, utilizando separação em ATPS (*Aqueous Two-Phase System*) (com aplicação de polietilenoglicol (PEG 1500), seguida de diálise *overnight* e, depois, carregada em CM-Sepharose *Fast Flow column* (3x13 cm). A fração resultante da enzima foi destinada a uma coluna concanavalina-A Sepharose (2x15,5 cm), sendo que as proteínas foram recuperadas e equilibradas em tampão contendo 0,1 M de metil α -D-manosídeo. Após a segunda preparação de concanavalina-A Sepharose, a concentração foi de 2404 vezes.

2.8.3 Membranas de filtração

As membranas são compostos poliméricos, geralmente sintéticos, usados para processos de recuperação e purificação de produtos devido às suas características de porosidade, que permitem selecionar as moléculas a serem retidas ou permeadas em função do tamanho dos poros (GASTONI e FILHO, 2005).

O processo de separação por membranas é indicado especialmente para compostos sensíveis à temperatura, auxiliando a manter as condições requisitadas ao produto. Este procedimento é inclusive aplicado na indústria de alimentos para fabricação de sucos, que possuem componentes sensíveis ao aquecimento (MATTA, CABRAL e SILVA, 2004).

Para aplicação da membrana, esta deve satisfazer aos requisitos mecânico, de economia de processo e hidrodinâmica da solução. O requisito mecânico diz respeito ao procedimento físico da passagem e retenção dos componentes aplicados ao sistema. A economia está relacionada à maximização da eficácia e eficiência do processo de separação, boa resistência e vida-útil da membrana ao processo e também facilidade de limpeza e manutenção. A hidrodinâmica, por sua vez, deve priorizar a eficiência da transferência de massa pelo sistema, evitando principalmente o fenômeno de *fouling* (ZEMAN e ZYDNEY, 1996). O *fouling* é provocado pelo acúmulo de partículas na superfície da membrana, devido à precipitação ou cristalização dos solutos na superfície da membrana, o que pode levar ao bloqueamento dos poros e conseqüente decréscimo do fluxo de filtração (VEIGA e VIOTTO, 2001).

Outro fenômeno responsável pelo declínio do fluxo de permeado é a polarização por concentração, em que concentração de macromoléculas próxima à superfície da camada da membrana pode levar ao estabelecimento de um gradiente de concentração. Este gradiente se estabelece entre a superfície da membrana e solução que está passando pelo processo, no qual moléculas de soluto se difundem no sentido contrário ao do solvente que permeia a membrana, diminuindo a eficiência da filtração (CARMINATTI, 2001).

Dentre os processos de separação por membranas, a microfiltração, a ultrafiltração e a nanofiltração são os procedimentos que mais se aproxima da filtração clássica (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A diferença entre os processos de separação com membranas está baseada na massa molecular de corte, ou seja, no tamanho das moléculas a serem separadas. De maneira geral, a microfiltração é aplicada como etapa clarificadora, visando a remoção das partículas em suspensão e células em processos fermentativos. Já a ultrafiltração é eficaz para a concentração/fracionamento de macromoléculas ou quando o permeado desejado deve ser cristalino e livre de partículas em suspensão (CARMINATTI, 2001).

Das membranas de microfiltração para a nanofiltração, há diferenças no tamanho dos poros, o que causa também certa resistência à transferência de massa oferecida pela membrana, aumentando a diferença de pressão necessária à permeação. Tal fenômeno pode ser observado na FIGURA 12 (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

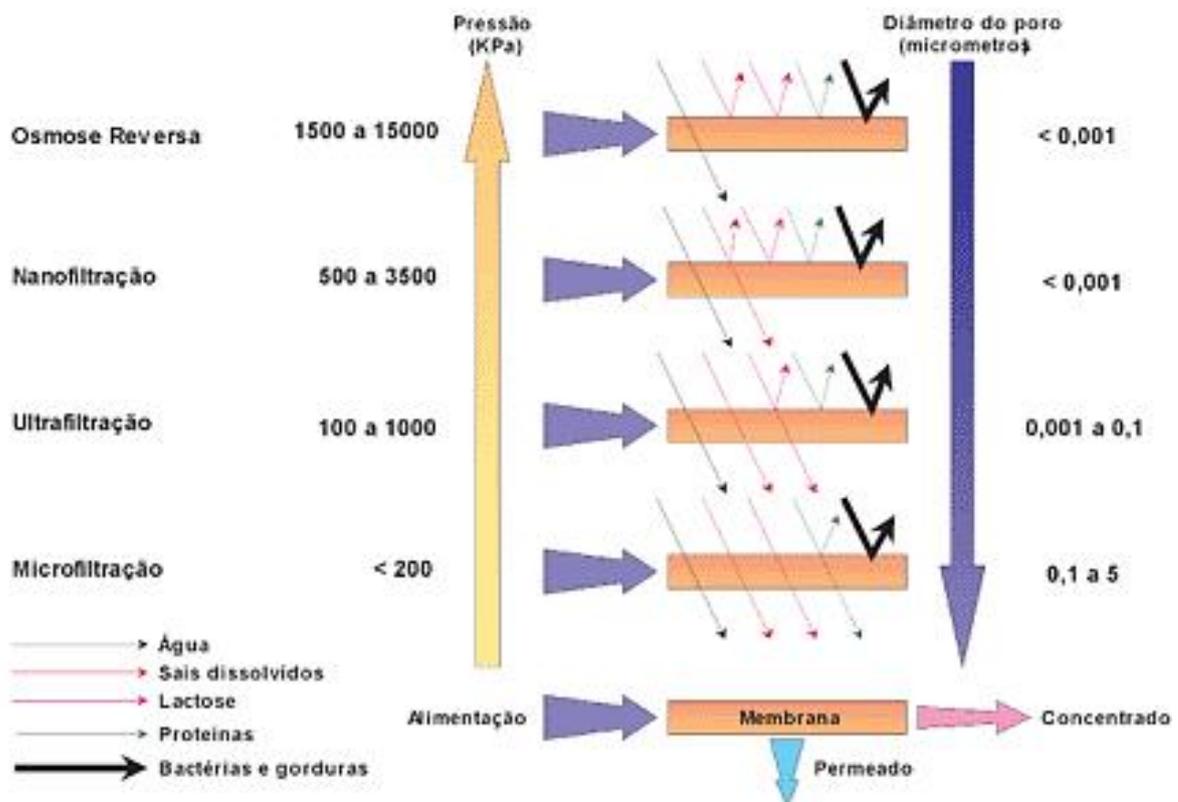


FIGURA 12 – CARACTERÍSTICAS DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.
FONTE: WATER *et al.*, (2008).

No processo de microfiltração são retidos microrganismos e partículas suspensas em uma pressão de operação inferior a 200 kPa. Para a ultrafiltração, que

retêm macromoléculas, a pressão pode variar de 100 a 1.000 kPa, enquanto que a de nanofiltração chega a 500 a 3.500 para reter açúcares e sais. Para a osmose reversa, que permite somente a passagem de água pela membrana, esta apresenta a maior pressão de operação, chegando até 15.000 kPa (STARBARD, 2009; WATER *et al.*, 2008).

A pressão aplicada é proporcional ao fluxo de permeado, sendo que a cada processo há uma forma motriz de separação. Para osmose reversa, ultrafiltração e microfiltração, a força motriz é a diferença de pressão aplicada à membrana. Para pervaporação é utilizada a diferença de concentração aliada ao uso de vácuo. Em sistema de diálise há a diferença de concentração e, na eletrodialise, a diferença de potencial elétrico (CARMINATTI, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Além da pressão, outro fator a ser levado em consideração é composição polimérica da membrana de acordo com a sua aplicação, levando em consideração o fluido que está sendo filtrado. Geralmente são utilizadas membranas de polisulfona, poli(éter-sulfona), poli(éter-imida), poliacrilonitrila ou também por derivados da celulose (RODRIGUES *et al.*, 2003).

A filtração aplicada nas membranas pode ser do tipo tangencial ou convencional (estática), conforme demonstrado na FIGURA 13. Na filtração tangencial, o fluido escoar de maneira paralela à membrana, com permeado atravessando-a de maneira transversal. Desta maneira, ocorre um arraste contínuo das moléculas, diminuindo o risco de entupimento dos poros, como há no caso da filtração convencional, cujo fluxo de alimentação e permeado ocorrem no mesmo sentido. Isto promove maior depósitos de partículas sobre a membrana (KASTER, 2009).

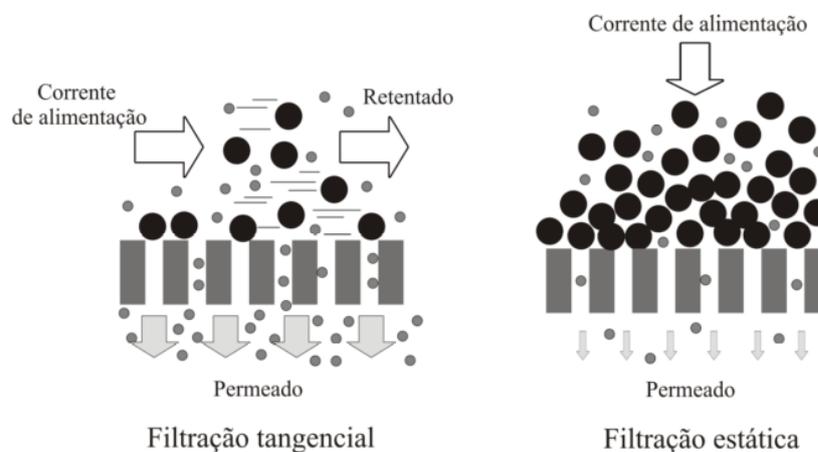


FIGURA 13 – FILTRAÇÃO TANGENCIAL E FILTRAÇÃO CONVENCIONAL (PERPENDICULAR E ESTÁTICA). FONTE: KASTER (2009).

Em relação à configuração dos módulos da membrana, os mais utilizados são do tipo quadro-e-placa, tubular, espiraladas e de fibra oca (POLETTTO, 2010). De maneira geral, o sistema quadro-e-placa apresenta facilidade de limpeza, risco moderado de entupimento e custo moderado para funcionamento. As membranas tubulares permitem grande facilidade de limpeza, com baixo risco de entupimento dos poros, porém com maior custo de funcionamento. Pelo escoamento ser menor que o sistema anterior, são comumente usadas para processos de osmose inversa, permeação de gases e pervaporação. As espiraladas e as de fibra oca têm alto risco de entupimento e baixo custo de energia, porém não apresentam facilidade de limpeza (ZEMAN e ZYDNEY, 1996).

Sobre o fluxo de fluido nas membranas quadro e placas (FIGURA 14) a alimentação ocorre simultaneamente em todas as placas, dispostas paralelamente e separadas por espaçadores e suportes, que conferem resistência ao sistema. O retido é recuperado pelo duto central (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

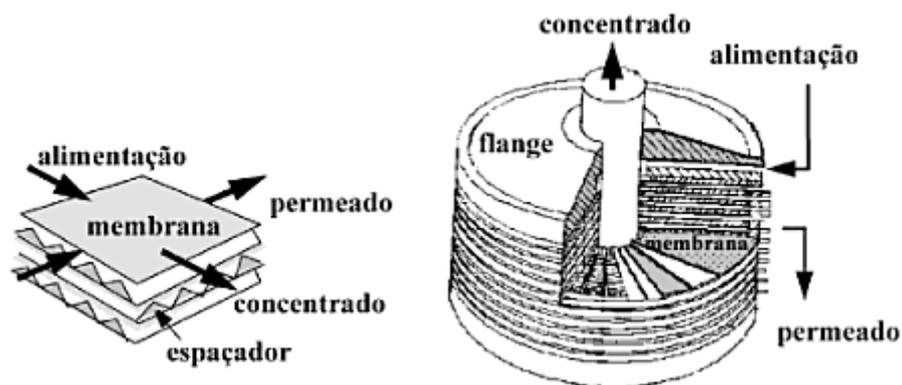


FIGURA 14 – MEMBRANAS COM CONFIGURAÇÃO QUADRO E PLACAS.
FONTE: HABERT, BORGES e NOBREGA (2006).

Com os fatores apresentados neste tópico, pode-se dizer que para procedimentos de filtração em membranas devem ser levados em consideração as características do fluido a ser filtrado e também do sistema de membrana a ser utilizado. O estudo preliminar das condições a serem aplicadas são capazes de garantir qualidade de processo e a vida útil das membranas.

2.9 ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese é um método de separação baseado em um potencial elétrico aplicado ao sistema, havendo a migração de uma partícula carregada. Tal partícula pode ser ácido nucleico, aminoácido, nucleotídeo, peptídeo, proteína ou outra molécula de grupo funcional ionizável. Deste modo, quando aplicado um campo elétrico, essas partículas carregadas irão migrar para o cátodo ou ânodo, dependendo de sua carga líquida (WILSON e WALKER, 2010).

Esta técnica foi aplicada pela primeira vez por Arne Tiselius, em 1937, que decompôs o soro sanguíneo em cinco frações de proteínas. Atualmente, a eletroforese utiliza gel de poliacrilamida, sendo que a velocidade de separação depende do tamanho e carga das moléculas, campo elétrico aplicado e da viscosidade do gel (PAES e CRISTINA, 2005).

Já Laemmli (1970) utilizou a técnica com modificações, sendo sua versão a mais utilizada como protocolo para estudos eletroforéticos de proteínas.

De acordo com Wilson e Walker (2010), a eletroforese SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) tem início pela polimerização da acrilamida pela adição de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine), sendo que o gel pode ser preparado com concentração de 3 a 30% de acrilamida, dependendo da porosidade desejada. Por exemplo, uma concentração de acrilamida de 5% consegue reter melhor moléculas de 60 a 350 kDa. A de 10% abrange de 15 a 200 kDa e a de 15% atinge uma faixa de 10 a 100 kDa.

Após aplicação das amostras e do procedimento eletroforético, o gel é imerso em corante para detectar proteínas em um gel. Mais comumente aplica-se o *Coomassie Brilliant Blue R-250* (CBB), feita com uma solução a 0,1% de CBB em metanol:água:ácido acético glacial (45:45:10). A mistura ácido-metanol serve como um agente desnaturante que precipita e fixa as proteínas no gel, evitando que sejam perdidas no processo de lavagem. A coloração por CBB requer em torno de 0,1 ug (100 ng) de proteína (WILSON e WALKER, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

No fluxograma da FIGURA 15 é possível observar as etapas desenvolvidas do presente trabalho, o qual dividiu-se em duas etapas: a produção de α -Gal por linhagem de *Lactobacillus agilis* LPB 56 (produção intracelular) a partir de vinhaça de soja e a seleção de novas linhagens e produção da enzima pela linhagem selecionada de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 (produção extracelular).

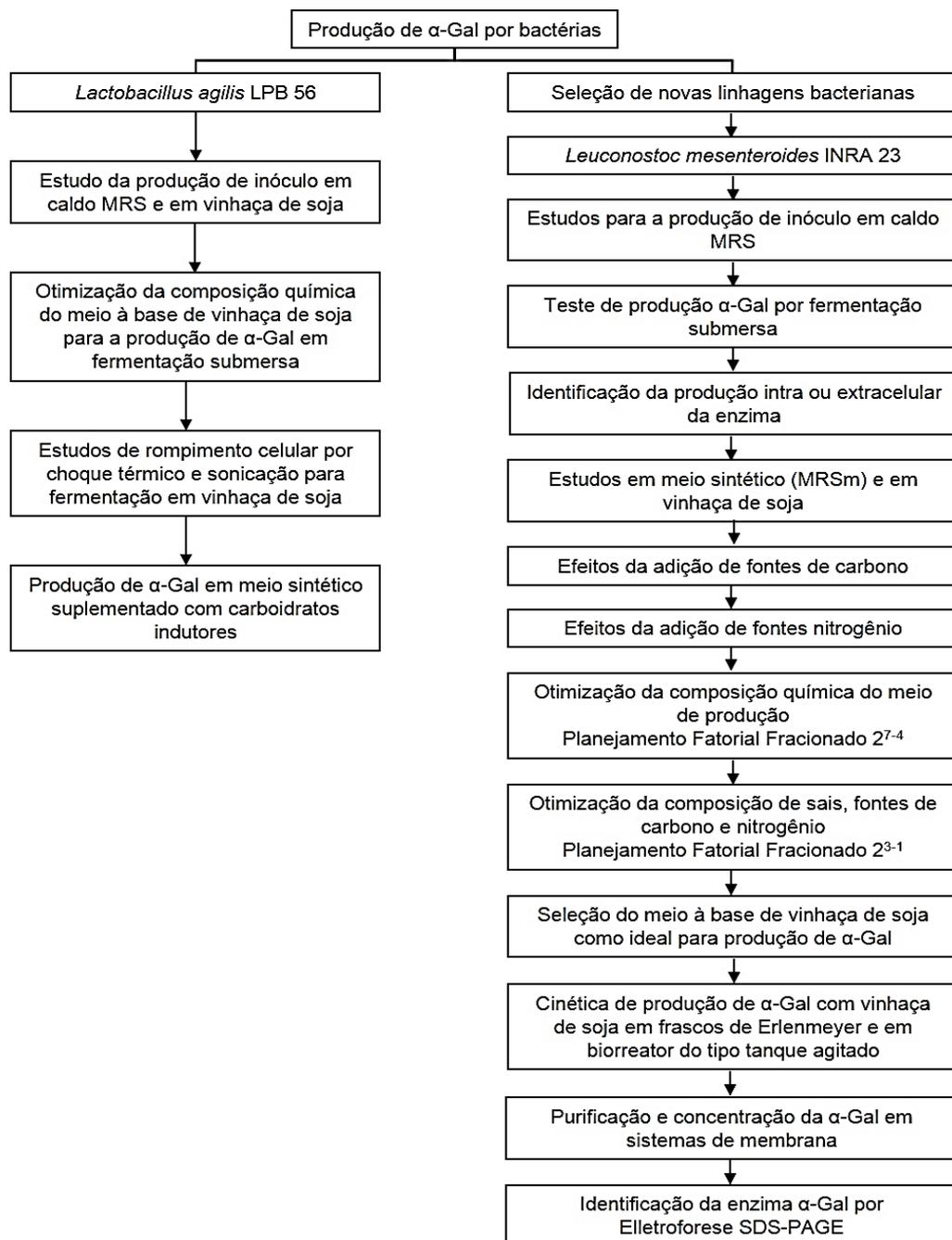


FIGURA 15 – ETAPAS DA PRODUÇÃO DE α -GAL POR *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 E POR *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23.

3.1 CEPAS BACTERIANAS EMPREGADAS PARA A PRODUÇÃO DE α -GAL

3.1.1 Origem das cepas

As cepas utilizadas para o estudo da produção de α -Gal utilizando vinhaça de soja como resíduo industrial foram *Lactobacillus agilis* LPB 56 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, disponíveis no banco de linhagens do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.1.2 Ativação das linhagens bacterianas

A ativação das linhagens *Lactobacillus agilis* LPB 56 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi realizada a partir de amostra conservada por congelamento a -80° C em microtubos de 2 mL de capacidade. Tubos de ensaio contendo meio MRS (*Man, Rogosa & Sharpe – Lactobacillus MRS Broth*, HIMEDIA®, Biosystems) enriquecido com 0,3% (m/v) de extrato de levedura (Extrato de levedura em pó, MicroMed® – ISOFAR, Brasil) foram previamente esterilizados, conforme descrito por Sanada *et al.* (2009).

Para a ativação da cepa a partir dos tubos de estocagem, as bactérias foram semeadas em tubos de ensaio contendo caldo MRS, obedecendo a taxa de inoculação de 10% (v/v). Os tubos contendo *L. agilis* foram incubados a 37° C e os contendo *L. mesenteroides* a 30° C durante 24 horas, de acordo com a temperatura ótima descrita pela ATCC - American Type Culture Collection (2012)

3.1.3 Conservação das linhagens bacterianas

A partir da segunda ativação, em fluxo laminar, os tubos contendo as cepas bacterianas em caldo MRS receberam solução de glicerol 20% (m/v) em água deionizada, previamente esterilizado, de modo que a proporção entre o caldo e a solução de glicerol fosse de 1:1. Deste modo, a concentração final de glicerol foi de 10% (m/v). Em fluxo laminar, alíquotas de 1,5 mL foram acondicionadas em microtubos, os quais foram destinados a armazenamento em *freezer* -80° C.

3.2 VINHAÇA DE SOJA

A vinhaça de soja utilizada nos experimentos para a produção da enzima α -Gal foi disponibilizada pela empresa IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda., localizada no município de Araucária – PR, tendo o teor de sólidos solúveis igual a 8° Brix.

A vinhaça recebida foi armazenada em recipientes plásticos sob congelamento a -18°C até o momento de sua utilização.

3.3 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE α -GAL POR *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

3.3.1 Estudos para a produção de inóculo de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em caldo MRS

O primeiro teste foi realizado em tubos de ensaio incubados em estufa a 37°C e em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, de acordo com a temperatura ótima para *Lactobacillus agilis*, descrita pela ATCC - American Type Culture Collection (2012).

Inicialmente, *Lactobacillus agilis* LPB 56, o qual foi armazenado com glicerol 20% (na proporção de caldo de cultivo/glicerol 1:1) foi ativado em tubos contendo 5 mL de caldo MRS (*Man, Rogosa & Sharpe – Lactobacillus MRS Broth*, HIMEDIA®, Biosystems) enriquecido com 0,3% de extrato de levedura (Extrato de levedura em pó, MicroMed® – ISO FAR, Brasil), conforme descrito previamente no item 3.1.2. Na sequência uma segunda ativação seguiu a mesma metodologia.

A produção de biomassa foi realizada de maneira aeróbica e anaeróbica, de forma a testar qual seria mais adequado para o seu cultivo. O cultivo em sistema aeróbio foi conduzido em *shaker* a 120 rpm e 37°C (Incubadora TE-420, TECNAL®, Brasil), em frascos Erlenmeyers com capacidade para 125 mL, onde 5 mL de meio de ativação MRS enriquecido com 0,3% de extrato de levedura foi inoculado a uma taxa de 10% (v/v), a fim de obter meio final de cultivo com 50 mL. O cultivo em sistema anaeróbio foi realizado em tubos de ensaio contendo meio MRS acondicionados em

jarra contendo sachês (GasPak Anaerobe Container System, BD®) em estufa bacteriológica a 37°C (Estufa de cultura Orion 502, FANEM®, Brasil).

Os testes ocorreram em duplicata, com tempo total de produção de biomassa até 36h. Foram realizadas análises de biomassa em massa seca (g/L) e de pH.

3.3.2 Estudos para a produção de inóculo de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em vinhaça de soja

A fim de acompanhar a evolução de biomassa de *Lactobacillus agilis* LPB 56, foram realizados testes de maneira aeróbica e anaeróbica em vinhaça de soja. Para a condição de aerobiose, frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125 mL contendo 27 mL de vinhaça de soja foram adicionados de 3 mL de pré-inóculo (10% v/v de alíquota proveniente da segunda ativação em caldo MRS) e cultivados em incubadora do tipo *shaker* 120 rpm e 37°C (Incubadora TE-420, TECNAL®, Brasil).

Para o cultivo em anaerobiose, foram realizados em tubos de ensaio estéreis contendo 9 mL de vinhaça de soja. Estes foram inoculados com 1 mL de cultivo celular da segunda ativação e foram inseridos em jarras contendo sachês (GasPak Anaerobe Container System, BD®). Este conjunto foi levado à estufa a 37°C (Estufa de cultura Orion 502, FANEM®, Brasil).

Os testes ocorreram em duplicata, com tempo total de evolução de biomassa acompanhada até 36h. Foram realizadas análises de biomassa em massa seca (g/L) e de pH.

3.3.3 Estudo para a otimização da composição química do meio à base de vinhaça de soja para a produção de α -Gal por *Lactobacillus agilis* LPB 56

Com a finalidade de verificar a melhor composição química do meio à base de vinhaça de soja para a produção de α -Gal a partir de *Lactobacillus* LPB 56, foi aplicado Planejamento Experimental através do programa STATISTICA 7® - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.), do tipo Fatorial Fracionado 2^{3-1} , contendo 3 variáveis ($^{\circ}$ Brix, CaCO_3 (%) e extrato de levedura (%)) e adicionado de 4 pontos centrais. Os 12 experimentos seguiram conforme a TABELA 10.

TABELA 10 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2³⁻¹ PARA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO À BASE DE VINHAÇA DE SOJA.

Ensaio	° Brix	CaCO ₃ (%)	Ext. Levedura (%)
1	8,0	0,0	0,0
2	35,0	0,0	0,0
3	8,0	2,0	0,0
4	35,0	2,0	0,0
5	8,0	0,0	1,0
6	35,0	0,0	1,0
7	8,0	2,0	1,0
8	35,0	2,0	1,0
9	21,5	1,0	0,5
10	21,5	1,0	0,5
11	21,5	1,0	0,5
12	21,5	1,0	0,5

O valor de 8° Brix indicado corresponde ao valor de sólidos solúveis da vinhaça de soja *in natura*, enquanto que 30° Brix (vinhaça de soja suplementada com melado de soja) foi descrito como melhor condição em estudos prévios de Sanada *et al.*, (2009) para o mesmo microrganismo. Em relação a 21,5° Brix, é o valor gerado pelos pontos centrais.

Para realização dos testes, inicialmente a linhagem foi ativada duas vezes e depois foi cultivada em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL totais de caldo MRS enriquecido com 0,3% de extrato de levedura durante 24h em *shaker* a 120 rpm e 37°C (Incubadora TE-420, TECNAL®, Brasil).

A fermentação ocorreu nos meios de cultivos dos ensaios indicados pelo *software*, à 37°C/120 rpm e 24h de fermentação, em duplicata, com retiradas de alíquotas submetidas a secagem em estufa a 45°C para determinação de biomassa em g/L (microtubos previamente identificados, secos e pesados). Também foi realizada a aferição de pH.

A amostragem foi realizada no tempo de 24h, ou seja, durante a fase exponencial do *Lactobacillus agilis* LPB 56.

3.3.4 Rompimento celular de *Lactobacillus agilis* LPB 56 por congelamento e sonicação

Partindo da melhor condição encontrada no teste descrito no item anterior, foi aplicado o rompimento celular por congelamento e por sonicação para determinação da atividade de α -Gal extracelular.

O congelamento baseou-se no fato de que os cristais de gelo formados em congelamento lento são capazes de lisar as células devido à sua geometria, liberando os metabólitos internos para o meio extracelular. Este fenômeno já foi estudado para a dosagem de enzimas intracelulares tanto para a obtenção de fitase por *Rhodotorula gracilis* (BINDU *et al.*, 1998), quanto para enzimas de *Lactococcus lactis* (DOOLAN e WILKINSON, 2009) e também para liberação de catalases produzidas por leveduras (SEKHAR *et al.*, 1999).

A sonicação, por outro lado, causa rompimento por meio da cavitação que também rompe a membrana celular permitindo a saída da enzima. No entanto, este processo gera calor, o que pode desnaturar macromoléculas sensíveis à temperatura (FOLADORI *et al.*, 2007).

3.3.4.1 Rompimento celular por congelamento

No caso do estudo de rompimento celular por congelamento, as amostras foram submetidas a congelamento lento a -18°C em *freezer* durante 4 horas, sendo então descongeladas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora.

Após o tratamento térmico, os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g durante 10 min. Após centrifugação, os sobrenadantes foram então analisados quanto à atividade enzimática.

As amostras controle, as quais não foram rompidas, e as congeladas e descongeladas, foram submetidas à coloração de Gram, com posterior observação em microscópio com aumento de 1000x.

3.3.4.2 Rompimento celular por sonicação

O processo de sonicação foi realizado com base no descrito por Sanada (2009) para a mesma linhagem bacteriana, *Lactobacillus agilis* LPB 56, com fermentação também em vinhaça de soja. O meio fermentado foi acondicionado em tubos Falcon esterilizados com capacidade para 15,0 mL (Centrifuge Tubes K19-0015, KASVI®) e submetidos ao rompimento no equipamento Desruptor de Células Ultra-Sônico (Unique®, Brasil). O processo foi conduzido em 8 ciclos de 30 segundos, em duplicata, com potência de 40% (200 W), em banho de gelo. Após o procedimento, os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g durante 10 min. Os sobrenadantes foram então analisados quanto à a atividade enzimática.

As amostras controle, as quais não foram sonicadas, e as que passaram por dois, quatro, seis e oito ciclos de sonicação foram submetidas à coloração de Gram, com posterior observação em microscópio com aumento de 1000x.

3.3.5 Estudo do efeito da combinação de congelamento e sonicação para rompimento celular de *Lactobacillus agilis* LPB 56

Após teste preliminar com rompimento via congelamento e sonicação, decidiu-se melhorar o processo de extração da enzima intracelular com a aplicação dos dois métodos. Para isto, foram realizados experimentos conforme as condições apresentadas na TABELA 11. A atividade enzimática de α -Gal foi determinada após o rompimento celular. Amostras de fermentações realizadas com os meios de vinhaça pura e vinhaça ajustada (suplementada 0,5% (m/v) de extrato de levedura e adicionada de melaço de soja até atingir 30° Brix) foram utilizadas neste estudo.

TABELA 11 – CONDIÇÕES PARA TESTE COMBINADO ENTRE CONGELAMENTO E SONICAÇÃO.

Ensaio	Condições
1	Sobrenadante
2	Congelado uma vez
3	Congelado duas vezes
4	Congelado uma vez e um ciclo de sonicação
5	Congelado duas vezes e dois ciclos de sonicação

3.3.6 Produção de α -Gal a partir de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em meio sintético suplementado com carboidratos indutores

A fim de se testar a produção de α -Gal, partindo de um meio sintético suplementado, foram realizadas duas ativações da linhagem *Lactobacillus agilis* LPB 56, conforme indicado na seção 3.1.2.

O inóculo foi preparado em caldo MRS adicionado de 0,3% de extrato de levedura, enquanto que o meio de cultivo em duplicata consistiu de caldo MRS adicionado dos seguintes carboidratos indutores a 1% (m/v): amido, dextrose, lactose, maltose, melibiose e rafinose. Estes carboidratos foram relatados em estudos de produção enzimática de α -Gal por Yoon e Hwang (2008) para *Lactobacillus curvatus* R08 e *Leuconostoc mesenteroides* JK55 e por Mudgett e Mahoney (1985) para *Lactobacillus fermenti*.

Foram realizadas as análises de crescimento de biomassa (g/L), pH e atividade enzimática nos tempos de 0h e 24h (fase logarítmica de produção enzimática), estando os resultados expostos no item 4.2.5.

3.4 PRODUÇÃO DE α -GAL NOVAS LINHAGENS: *LACTOBACILLUS CURVATUS* NRRL1 E *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* CEPA PADRÃO INRA 23

A partir dos ensaios de fermentação utilizando a linhagem de *Lactobacillus agilis* LPB 56 para produção enzimática, verificou-se baixa atividade de α -Gal quando comparado aos valores citados em literatura. Deste modo, foram analisadas outras linhagens produtoras já citadas em revisão bibliográfica e disponíveis no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.4.1 Cultivo de inóculo das linhagens de *Lactobacillus curvatus* NRRL 1 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23

Com base nos resultados obtidos de atividade enzimática de α -gal por fermentação de vinhaça de soja por *Lactobacillus agilis* LPB 56, decidiu-se testar outras cepas bacterianas para produção enzimática. Pela seleção baseada em

literatura internacional e disponíveis no LPB, as culturas-estoque de *Lactobacillus curvatus* NRRL1 e também *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, (contendo caldo fermentado e glicerol 20% (m/v) na proporção 1:1 e acondicionadas a -80°C) foram reativadas em caldo MRS contendo 0,3% de extrato de levedura, na proporção de inóculo de 10% (v/v). As ativações foram realizadas a 30°C e a 37°C em estufa bacteriológica para verificar se haveria diferença visual da produção de biomassa.

3.4.2 Produção α -Gal por *Lactobacillus curvatus* NRRL 1 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23

A produção α -Gal pelas linhagens *Lactobacillus curvatus* NRRL1 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 ocorreram a 30°C a 120 rpm em incubadora do tipo *shaker* (Incubadora TE-420, TECNAL®, Brasil).

Foram testados dois tipos de meio de cultivo, em duplicata: um resíduo industrial (a vinhaça de soja) e um meio de cultivo sintético (caldo MRS). Do resíduo, foi utilizada a vinhaça de soja pura (fornecida pela empresa IMCOPA) e a vinhaça ajustada com 30° Brix e 0,5% de extrato de levedura, conforme relatado por Sanada *et al.* (2009). Para o meio sintético, aplicou-se caldo MRS adicionado de 1% (m/v) de rafinose com base no descrito por Yoon e Hwang (2008).

A amostragem ocorreu no momento de inóculo e após 24 h de fermentação, sendo realizadas as análises de pH e atividade enzimática para o sobrenadante e para células rompidas por congelamento (-18°C por quatro horas em *freezer* comercial e descongelamento à temperatura ambiente).

Os resultados foram apresentados e discutidos no item 4.3 da dissertação.

3.4.3 Estudos para a produção de inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* INR 23 em caldo MRS

O estudo da produção de inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 teve por finalidade verificar qual a melhor condição em relação aos fatores agitação (0, 50 ou 120 rpm) e adição ou não de extrato de levedura (fonte de nitrogênio).

Inicialmente, foram realizadas duas ativações, conforme descrito no item 3.1.2. O inóculo foi adicionado na concentração de 10% (v/v) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, em duplicata, contendo 50 mL totais de meio de cultivo. Foram testadas duas condições: caldo MRS e também caldo MRS enriquecido com 0,3% (m/v) de extrato de levedura e analisadas 3 condições de agitação, 0 rpm (cultivo estático), 50 rpm e 120 rpm, a 30°C.

As amostragens ocorreram em 0h, 6h, 12h, 24h e 30h, sendo realizadas as análises de biomassa em UFC/mL e acompanhamento de pH.

3.4.4 Produção α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja

Os experimentos desta etapa foram realizados conforme apresentado na FIGURA 16.

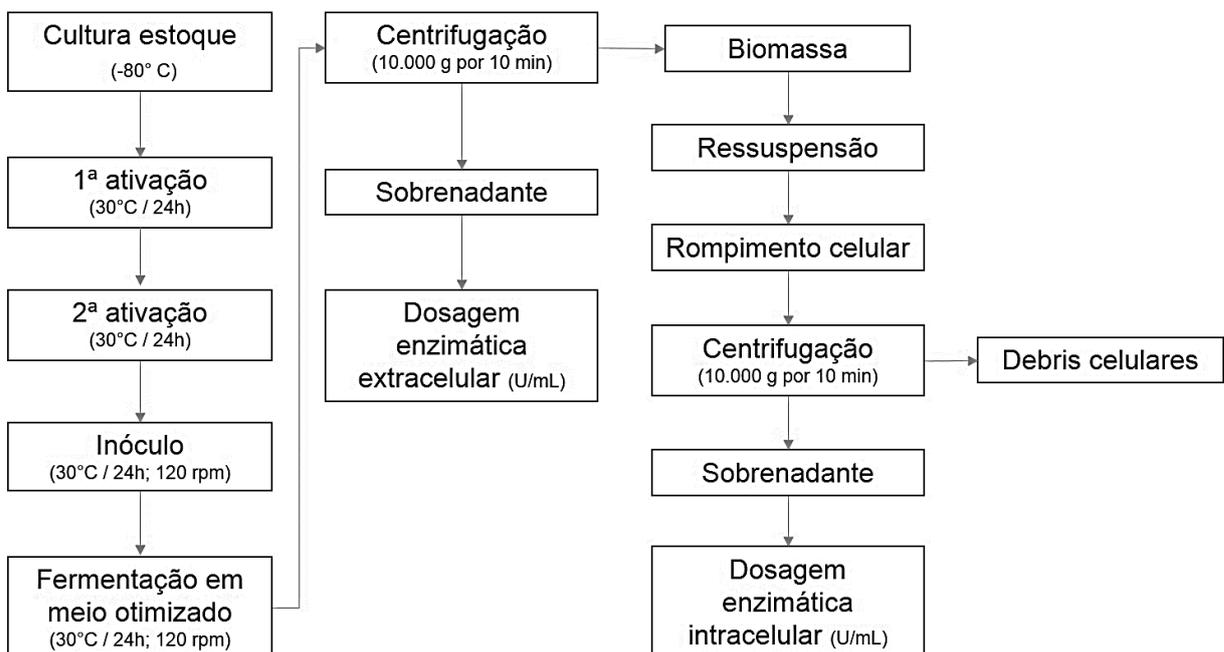


FIGURA 16 - ESQUEMA DA PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23.

A linhagem *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 foi ativada conforme o descrito no item 3.1.2. As ativações e a produção de inóculo foram conduzidos em caldo MRS adicionado de 0,3% (m/v) de extrato de levedura.

Para a produção da enzima α -Gal, o inóculo foi adicionado à vinhaça de soja pura, previamente esterilizada a 121°C/15 min, em proporção de 10% (v/v). Os ensaios ocorreram a 120 rpm e 30°C em incubadora do tipo *shaker* (Incubadora TE-420, TECNAL®, Brasil), com tempo total de 24 h.

Foram retiradas alíquotas, após término da fermentação, e as amostras foram acondicionadas em tubos Falcon com capacidade para 15 mL imediatamente após o término da fermentação. Foi realizado o rompimento celular, por sonicação e em *French Press*, e posterior determinação da atividade enzimática intracelular.

A sonicação em equipamento Desruptor de Células Ultra-Sônico (Unique®, Brasil) foi conduzida em ciclos de 5 minutos, com potência de 40% (200 W) e em banho de gelo. A amostragem ocorreu no tempo de 0, 5, 10 e 15 minutos, já que em condições mais brandas, como as aplicadas no item 3.3.4.2, não se observou incremento de atividade enzimática relacionada à fração intracelular.

O rompimento celular em *French Press* (*French Press – Cell Disrupter*, Thermo Electron Corporation®) foi realizado com 4 diferentes pressões, em 1, 2 ou 3 passes. Cada pressão de operação do equipamento correspondeu a uma pressão aplicada na célula bacteriana, conforme TABELA 12.

TABELA 12 - CONDIÇÕES DE PRESSÃO PARA ROMPIMENTO CELULAR EM *FRENCH PRESS*.

Pressão de operação (psi)	Pressão na célula (psi)
430	8.000
580	11.500
800	16.000
1.000	20.000

Para a determinação de atividade enzimática, os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto, conforme método descrito no item 3.7.1.

Os resultados para os dois procedimentos de rompimento celular foram descritos no item 4.5.

3.4.5 Produção α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em meio sintético

Em paralelo aos testes com vinhaça de soja, foram realizados também testes em meio sintético como via alternativa de produção de α -Gal.

No meio sintético, a posterior extração e purificação da enzima são facilitadas, especialmente quando a aplicação do produto é mais nobre, como é o caso do uso terapêutico para tratar doença de Fabry, por exemplo.

3.4.5.1 Estudo do efeito da adição de fontes de carbono sobre a atividade de α -Gal em meio sintético

O estudo da adição de fontes suplementares de carbono sobre a produção de enzima por *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 foi realizado em duplicata, utilizando-se como meio sintético o caldo MRS modificado (MRSm) com base no descrito por Yoon e Hwang (2008). Neste caso, a dextrose foi substituída pela rafinose (1% m/v) a fim de induzir a produção de α -Gal. Foram estudadas as condições de MRSm puro e MRSm adicionado de 1% (m/v) dos seguintes carboidratos: dextrose, lactose, maltose, melibiose e rafinose. Tais carboidratos foram relatados na produção enzimática de α -Gal por Yoon e Hwang (2008) para *Lactobacillus curvatus* R08 e *Leuconostoc mesenteroides* JK55 e por Mudgett e Mahoney (1985) para *Lactobacillus fermenti*.

A cultura de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi ativada e inoculada em caldo MRS enriquecido com 0,3% de extrato de levedura. Este inóculo foi adicionado na proporção 10% (v/v) aos frascos de Erlenmeyer com capacidade de 25 mL, contendo 10 mL de meio de cultivo.

Os resultados encontram-se no tópico “Resultados e Discussão”, item 4.6.1.

3.4.5.2 Efeito da adição de fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em meio sintético

Nesta etapa, o meio utilizado foi caldo MRS modificado (MRSm), sendo estudadas as adições das seguintes fontes de nitrogênio: extrato de levedura (*Yeast extract*, HIMEDIA®), extrato de carne (*Meat extract*, HIMEDIA®), peptona (*Peptone, bacteriological*, HIMEDIA®), ureia (Ureia P.A., VETEC®) e sulfato de amônio (Sulfato de amônio P.A., VETEC®), sendo tais suplementações relatados em literatura para produção de α -Gal (GOTE *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2012, SANADA, 2009).

O extrato de levedura em adição de 0,3% (m/v) foi utilizado como base para cálculos da quantidade de nitrogênio e consequente quantidade de cada reagente a ser adicionado. Tal fato se deve a que nas ativações das linhagens o extrato de levedura já havia sido utilizado para o cultivo de biomassa, também aplicado por Kumar *et al.* (2012) e Rezende *et al.* (2005).

Os frascos, em duplicata, foram submetidos à incubação em incubadora do tipo *shaker* a 30°C, com rotação de 120 rpm.

Os resultados e respectivas discussões encontram-se no tópico 4.6.2.

3.4.5.3 Otimização da composição química do meio de produção sobre a atividade de α -Gal em meio sintético

A adição de sais baseou-se em estudos citados em literatura para a produção enzimática. Anisha, Sukurumaran e Prema (2008) e Liu *et al.* (2007) estudaram detalhadamente a influência dos sais como indutores de produção de α -Gal, sendo relatados estudos de suplementação com $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. De acordo com Liu *et al.* (2007), a adição de 0,05% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% KH_2PO_4 foram favoráveis à produção de α -Gal por *Aspergillus foetidus* ZU-G1 (64,75 U/mL), enquanto $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ apresentou efeitos negativos. Já para os dados obtidos por Anisha, Sukurumaran e Prema (2008) para *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447, o melhor indutor foi o MgSO_4 a 0,17% (m/v), que ao final da otimização levou a uma atividade de 50,3 U/mL de α -Gal.

A fim de realizar estudo para a otimização da composição do meio de produção de enzima α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, foram realizados ensaios da adição de sais ao caldo MRS modificado (MRSm). O planejamento experimental foi gerado pelo programa STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.), do tipo Fatorial Fracionado 2^{7-4} , contendo 7 variáveis independentes (7 sais), 1 variável de resposta (atividade enzimática em U/mL) e 8 ensaios adicionados de 3 pontos centrais.

Os experimentos contendo sais seguiram conforme a TABELA 13, apresentando a porcentagem de cada fator adicionado.

TABELA 13 – PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2⁷⁻⁴ PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS (% M/V) SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal.

Ensaio	FeSO ₄ .7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ .H ₂ O	NaH ₂ .PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O
1	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200	0,150	0,000
2	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,150
3	0,000	0,200	0,000	0,000	0,200	0,000	0,150
4	0,150	0,200	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,000	0,200	0,200	0,000	0,000	0,150
6	0,150	0,000	0,200	0,000	0,200	0,000	0,000
7	0,000	0,200	0,200	0,000	0,000	0,150	0,000
8	0,150	0,200	0,200	0,200	0,200	0,150	0,150
9 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075
10 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075
11 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075

As ativações e preparo de inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 ocorreram de acordo com o realizado anteriormente. O meio MRSm enriquecido com ureia foi suplementado com sais, conforme resultado apresentado no item anterior para teste com fontes de carbono.

Os valores de atividade enzimática e pH estão apresentados no item 4.6.3 do tópico “Resultados e Discussão”.

3.4.5.4 Otimização da composição de sais, fontes de carbono e nitrogênio para a produção de α -Gal em meio sintético

Após o teste de otimização com sais para a produção de α -Gal, foi realizado novo planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado 2³⁻¹ com o suporte do programa STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.). Foram aplicadas três variáveis independentes: rafinose, variando de 0 a 10% (m/v) de adição, MgSO₄.7H₂O de 0 a 0,15% (m/v) e ureia de 0 a 0,15% de ureia (m/v), em três níveis e com uma variável de resposta (atividade enzimática em U/mL).

A faixa de adição MgSO₄.7H₂O seguiu o descrito em literatura por Liu *et al.* (2007), com valor de 0,05 a 0,10%. Porém, o último teste com sais teve como ponto central de 0,075%, sendo estabelecida a adição com níveis de 0 a 0,15% (m/v). Para a ureia, o valor decorre de estudo das fontes de nitrogênio, no qual o teor de nitrogênio deveria ser equivalente ao da adição de 0,3% de extrato de levedura.

Os experimentos contendo sais seguiram conforme a TABELA 14, com a porcentagem adicionada de cada fator.

TABELA 14 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA ENSAIO COM SAIS E FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.

Ensaio	Rafinose (%)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	Ureia (%)
1	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,075	0,150
3	0,000	0,150	0,075
4	5,000	0,000	0,150
5	5,000	0,075	0,075
6	5,000	0,150	0,000
7	10,000	0,000	0,075
8	10,000	0,075	0,000
9	10,000	0,150	0,150
10	5,000	0,075	0,075
11	5,000	0,075	0,075
12	5,000	0,075	0,075

Os resultados da otimização para estas condições encontram-se no item 4.6.4.

3.4.6 Produção α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja

O estudo de produção de α -Gal em vinhaça de soja visou a utilização do subproduto industrial como meio de diminuir custos de processo e também o impacto ambiental causado por empresas beneficiadoras de soja.

Para isto, o meio à base de vinhaça de soja foi enriquecido com diferentes fontes de carbono, de nitrogênio e sais, a fim de verificar a sua influência no aumento de produção.

3.4.6.1 Estudo do efeito adição de fontes de carbono sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja

A cultura de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi ativada conforme o descrito no item 3.1.6, com preparo de inóculo em caldo MRS suplementado com 0,3%

de extrato de levedura a fim de ser submetida ao teste de fermentação com fontes de carbono, em 6 diferentes condições: meio controle (somente vinhaça de soja pura) e vinhaça adicionada de dextrose, lactose, maltose, melibiose e rafinose, sendo que todos os açúcares foram adicionados na condição de 1% (m/v).

O inóculo foi adicionado na proporção 10% (v/v) aos frascos de Erlenmeyer com capacidade de 25 mL, contendo 10 mL finais de meio de cultivo. Os frascos foram submetidos à incubação em incubadora do tipo *shaker* a 30°C, com agitação de 120 rpm.

Os resultados e respectivas discussões encontram-se no tópico 4.7.1 do capítulo “Resultados e Discussão”.

3.4.6.2 Estudo do efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja

Para o estudo da escolha da fonte de nitrogênio, a cultura de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi ativada e o inóculo preparado em caldo MRS suplementado com 0,3% de extrato de levedura. Este inóculo foi adicionado na proporção 10% (v/v) aos frascos de Erlenmeyer com capacidade de 25 mL, contendo 10 mL finais de meio de cultivo. O meio definido como controle foi a vinhaça de soja pura, sendo estudadas as seguintes condições para fontes de nitrogênio: vinhaça de soja pura (controle), extrato de levedura (*Yeast extract*, HIMEDIA®), extrato de carne (*Meat extract*, HIMEDIA®), peptona (*Peptone, bacteriological*, HIMEDIA®), ureia (Ureia P.A., VETEC®) e sulfato de amônio (Sulfato de amônio P.A., VETEC®). Tais suplementações foram relatados em literatura para produção de α -Gal (GOTE *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2012, SANADA, 2009).

O extrato de levedura em adição de 0,3% (m/v) foi utilizado como base para cálculos da quantidade de nitrogênio e conseqüente quantidade de cada reagente a ser adicionado, visto que nas próprias ativações o extrato de levedura já havia sido aplicado como auxiliar de crescimento, também aplicado por KUMAR *et al.* (2012) e REZENDE *et al.* (2005). Os frascos foram submetidos à incubação em incubadora do tipo *shaker* a 30°C, com rotação de 120 rpm.

Os resultados e respectivas discussões encontram-se no item 4.7.2.

3.4.6.3 Otimização da composição química do meio de produção sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja

A otimização da composição química do meio de vinhaça de soja com adição de sais baseou-se em estudos citados em literatura para a produção enzimática. Anisha, Sukurumaran e Prema (2008) e Liu *et al.* (2007) estudaram detalhadamente a influência dos sais como indutores de produção de α -Gal, sendo relatados estudos de suplementação com $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. De acordo com Liu *et al.* (2007), a adição de 0,05% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0.1% KH_2PO_4 foram favoráveis à produção de α -Gal por *Aspergillus foetidus* ZU-G1 (64,75 U/mL), enquanto $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ apresentou efeitos negativos. Já para os dados obtidos por Anisha, Sukurumaran e Prema (2008) para *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447, o melhor indutor foi o MgSO_4 a 0,17% (m/v), que ao final da otimização levou a uma atividade de 50,3 U/mL de α -Gal.

A fim de realizar o estudo de produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 aplicando-se diferentes sais, foi definido um planejamento experimental com o suporte do programa STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.) com base no estudado por Anisha *et al.* (2008) e Liu *et al.* (2007), que estudaram a aplicação de diversos sais para produção de α -Gal por *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447 e *Aspergillus foetidus* ZU-G1, respectivamente.

Para o planejamento, foi aplicado Planejamento Fatorial Fracionado 2^{7-4} , contendo 7 variáveis independentes (7 sais), 1 variável de resposta (atividade enzimática em U/mL), adicionados de 3 pontos centrais. Os experimentos foram realizados nas condições apresentadas na TABELA 15, com a porcentagem de cada reagente adicionado.

TABELA 15 – PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{7-4} PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (% M/V) SOBRE A ATIVIDADE DE α -GAL EM VINHAÇA DE SOJA.

Ensaio	FeSO ₄ .7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ .H ₂ O	NaH ₂ .PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O
1	0,05	0,05	0,10	0,20	0,20	0,15	0,05
2	0,15	0,05	0,10	0,10	0,10	0,15	0,15
3	0,05	0,15	0,10	0,10	0,20	0,05	0,15
4	0,15	0,15	0,10	0,20	0,10	0,05	0,05
5	0,05	0,05	0,20	0,20	0,10	0,05	0,15
6	0,15	0,05	0,20	0,10	0,20	0,05	0,05
7	0,05	0,15	0,20	0,10	0,10	0,15	0,05
8	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15
9 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10
10 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10
11 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10

O preparo de inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 ocorreu em caldo MRS enriquecido com 0,3% (m/v) de extrato de levedura. A vinhaça de soja pura contendo 1% (m/v) de rafinose foi suplementada de sais, conforme resultado apresentado para testes com fontes de carbono.

No item 4.7.3 foram apresentados e discutidos os valores de atividade enzimática e de pH para otimização com sais.

3.4.6.4 Otimização da composição de sais, fontes de carbono e nitrogênio para a produção de α -Gal em vinhaça de soja

Após a seleção do sal que apresentou efeito positivo sobre a produção de α -Gal, foi definido novo planejamento experimental com o suporte do programa STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.), para o estudo das concentrações de três variáveis independentes: rafinose, variando de 0 a 10% (m/v) de adição, MgSO₄.7H₂O de 0 a 0,5% (m/v) e (NH₄)₂SO₄ de 0 a 1,5% (m/v).

Idealmente, um planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) seria mais completo para testar as condições de otimização. Entretanto, por motivo de limitação de resíduo industrial, optou-se por um planejamento com menor número de ensaios, mas que é capaz de gerar superfície de resposta e indicar a tendência para produção ótima de α -Gal, o Planejamento Experimental do tipo Fatorial Fracionado 2^{3-1} .

Este planejamento foi adicionado de 3 pontos centrais e 1 variável de resposta (atividade enzimática em U/mL). Os ensaios contendo sais seguiram conforme a TABELA 16, com a porcentagem adicionada de cada fator.

TABELA 16 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2³⁻¹ PARA MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.

Ensaio	Rafinose (%)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,25	1,50
3	0,00	0,50	0,75
4	5,00	0,00	1,50
5	5,00	0,25	0,75
6	5,00	0,50	0,00
7	10,00	0,00	0,75
8	10,00	0,25	0,00
9	10,00	0,50	1,50
10	5,00	0,25	0,75
11	5,00	0,25	0,75
12	5,00	0,25	0,75

Os resultados da otimização para estas condições encontram-se no tópico 4.7.4.

3.4.7 Estudo da taxa de inoculação de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 para a produção de α -Gal em vinhaça de soja

Após otimização da composição do meio de produção da enzima α -Gal em vinhaça de soja, foi realizado teste para determinação da melhor taxa de inoculação de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 para fermentação no subproduto industrial vinhaça de soja.

A linhagem bacteriana foi ativada e o inóculo produzido em caldo MRS, a 30°C durante 24h. Após crescimento celular, foram adicionados 5% (v/v), 10% (v/v) e 15% (v/v) do inóculo aos frascos de Erlenmeyer contendo vinhaça de soja enriquecida com 5% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 24h de fermentação a 30°C e 120 rpm de rotação, foram analisados atividade enzimática em U/mL e pH e para cada uma das condições de inóculo.

Os resultados encontram-se no item 4.7.5 da presente dissertação.

3.4.8 Cinética de produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 com vinhaça de soja em frascos de Erlenmeyer

O estudo da cinética de produção enzimática pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em fermentação submersa ocorreu em vinhaça de soja suplementada com 5% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio, com 10% (v/v) de inóculo e à 30°C em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de produção. Os frascos foram inseridos em incubadora do tipo *shaker* e o processo ocorreu com agitação de 120 rpm.

Foi analisada a atividade enzimática (U/mL) e também o pH nos seguintes tempos (em duplicata): 6h, 12h, 24h, 30h, 36h, 48h e 72h.

Os dados obtidos para estas condições encontram-se no item 4.7.6 do capítulo “Resultados e Discussão”.

3.4.9 Cinética de produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 com vinhaça de soja em biorreator do tipo tanque agitado

A fim de verificar a cinética da produção de α -Gal via *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em biorreator do tipo tanque agitado INCELTECH Set 2M (LH, SGi) (FIGURA 17), foram aplicadas as mesmas condições otimizadas anteriormente: ativações da linhagem e preparo de inóculo em caldo MRS enriquecido com 0,3% de extrato de levedura e meio de fermentação à base de vinhaça de soja suplementada com 5% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio. O inóculo foi adicionado a uma taxa de 10% (v/v). A temperatura de fermentação foi de 30°C, com agitação de 300 rpm e aeração de 1 vvm. O volume total fermentado foi de 1 L em biorreator com capacidade para 2 L.



FIGURA 17 - BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO INCELTECH Set 2M (LH, SGi).

O processo ocorreu em um tempo total de 96 horas, com amostragens a 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo destinadas às análises de biomassa em massa seca (g/L), atividade enzimática (U/mL), açúcares totais (g/L) e pH.

Os dados obtidos para esta etapa de estudo encontram-se no item 4.7.7.

3.5 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA α -Gal EM SISTEMAS DE MEMBRANA

No intuito de purificar e concentrar a enzima α -Gal obtida em biorreator via *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 a partir de vinhaça de soja, foram aplicadas técnicas de micro e ultrafiltração por membranas.

A cada etapa foram retiradas alíquotas das frações de retido e permeado e destinadas às análises de atividade enzimática (U/mL) e proteínas totais (mg/mL), conforme metodologias descritas nos itens 3.7.1 e 3.7.2, respectivamente.

3.5.1 Microfiltração em sistema de filtração à vácuo

O teste de purificação da enzima teve início com a microfiltração. Esta ocorreu acoplando-se o Sistema de Filtração à Vácuo PES 0,22 μm (KASVI®) (FIGURA 18), com capacidade para 250 mL, a uma bomba de vácuo.



FIGURA 18 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO À VÁCUO PES 0,22 μm (KASVI®).

Após preparo do sistema, 100 mL do extrato enzimático de α -Gal produzida em biorreator (item 3.4.9), com meio de cultivo à base de vinhaça de soja, foram microfiltrados até esgotamento da passagem de permeado.

3.5.2 Ultrafiltração em sistema Vivaspin

O meio clarificado obtido no procedimento 3.5.1 foi submetido à membrana de ultrafiltração Vivaspin (GE Healthcare®), com massa molecular de corte de 100.000 MWCO (*molecular weight cutoff value*) e capacidade para 5 mL de volume. A amostra foi adicionada a 4 mL em cada membrana e o sistema foi centrifugado a 4.000 g por 30 min, com base no indicado pelo fabricante. Foram obtidas as frações de retido e permeado.

O permeado desta etapa foi destinado ao processo em membrana de 10.000 MWCO da Vivaspin (GE Healthcare®), também com capacidade para 5 mL e

centrifugada a 4.000 g por 30 min. Houve separação em duas fases, a que passou pela membrana e a que ficou retida nesta.

Das alíquotas amostradas foram obtidos os valores da atividade enzimática (U/mL) e de proteínas totais (mg/mL) para cada etapa, conforme detalhado no item 4.9.1 de “Resultados e Discussão”.

3.5.3 Micro e ultrafiltração do extrato enzimático em sistema MILLIPORE®

Além do teste com microfiltração à vácuo e ultrafiltração por centrifugação, também foram analisadas as atividades enzimáticas e concentração de proteínas provenientes das frações obtidas em cada etapa no sistema de purificação com membranas Pellicon (MILLIPORE®).

As membranas utilizadas foram as de Pellicon 2 para microfiltração e, para a ultrafiltração, membrana com 30kDa de massa molecular de corte, ambas da MILLIPORE®.

O equipamento de purificação foi montado de acordo com o fabricante e apresentou a configuração final como mostrado na FIGURA 19. Após montagem das membranas, foi feita lavagem com água ultrapura a fim de realizar enxágue do sistema. Isto porque, após cada uso, é feita a lavagem com hidróxido de sódio 0,1 N e o acondicionamento sob refrigeração a fim de garantir a integridade da membrana. O enxágue procedeu até a água de descarte atingir pH neutro. Este procedimento foi realizado a cada instalação de membrana no equipamento.

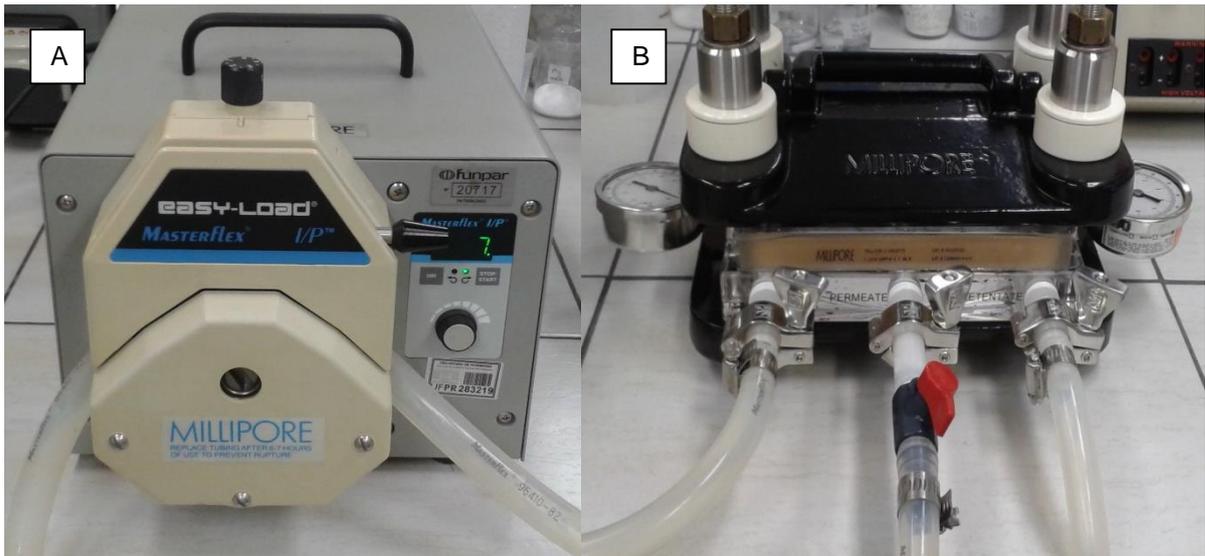


FIGURA 19 – SISTEMA DE SEPARAÇÃO MILLIPORE®. (A) BOMBA PERISTÁLTICA. (B) MEMBRANA PELLICON ACOPLADA AO SISTEMA DE FILTRAÇÃO.

Retirou-se o excesso de água pura do sistema e o extrato bruto fermentado foi alimentado ao sistema a uma vazão de 3,96 L/h. As amostras das frações de retido e permeado foram destinadas às análises de atividade enzimática (U/mL) e de proteínas totais (mg/mL) para cada etapa, conforme descrito no item 4.9.2 de “Resultados e Discussão”.

3.6 ELETROFORESE SDS-PAGE

O procedimento de eletroforese baseou-se no descrito por Laemmli (1970), com modificações. Foi realizado o preparo das amostras enzimáticas provenientes da purificação e concentração em membranas descritas no item 3.16. Os extratos foram precipitados com acetona na proporção 1:10 por 45 min em banho de gelo, com posterior centrifugação a 4°C durante 30 min e 12.600 rpm. Após descarte do solvente, as amostras foram colocadas em estufa à vácuo a 35°C por 20 min a fim de remover resíduos de acetona. Em seguida, foi realizada a ressuspensão do conteúdo em solução 1:1 de água ultrapura e tampão de amostra sem redução 2x (Anexo A) e o sistema foi conduzido ao aquecimento em água em ebulição por 3 min.

Em paralelo à precipitação de proteínas, o sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD®) foi limpo com papel toalha umedecido em álcool 70% (v/v), montado de

acordo com as instruções do fabricante e testado com água ultrapura para verificar possíveis vazamentos. A água foi vertida e preparou-se o gel de separação de poliacrilamida 12%, com tempo de solidificação de aproximadamente 20 min, sendo que foi aplicado água ultrapura na superfície para linearizar o gel e evitar formação de bolhas. Após polimerização, a água foi descartada e então adicionado o gel de empilhamento de 5% com os pentes de marcação. Os géis e demais soluções para o procedimento constam no Anexo B.

Com a solidificação deste gel, o sistema recebeu então o tampão de corrida e foram adicionados aos poços 7 μL de marcador de peso molecular *High-Range Rainbow* (AMERSHAM®) e 20 μL de volume para amostras previamente precipitadas e ressuspendidas. O equipamento foi ligado em voltagem constante de 90-100 volts e amperagem inicial de 0,035 A. O processo correu até a banda azulada se aproximar do final do gel.

Terminando a corrida, a eletroforese foi finalizada e o gel retirado da cuba foi transferido a um recipiente plástico, no qual foi adicionada solução corante à base de *Coomassie blue* até cobrir o gel. O conjunto ficou em agitação baixa à temperatura ambiente durante 1 hora, com posterior retirada da solução e adição de solução descorante *overnight*, também sob agitação. A solução descorante que permaneceu em contato com o gel foi trocada duas vezes, até que o excesso de coloração azul fosse retirada. Para acondicionamento do gel descorado, este foi armazenado sob refrigeração em recipiente plástico contendo solução alcoólica conservante.

Como etapa final, o resultado da eletroforese foi fotografado e indicou-se a massa molecular aproximada da α -Gal, baseada nas bandas do marcador *High-Range Rainbow* (AMERSHAM®).

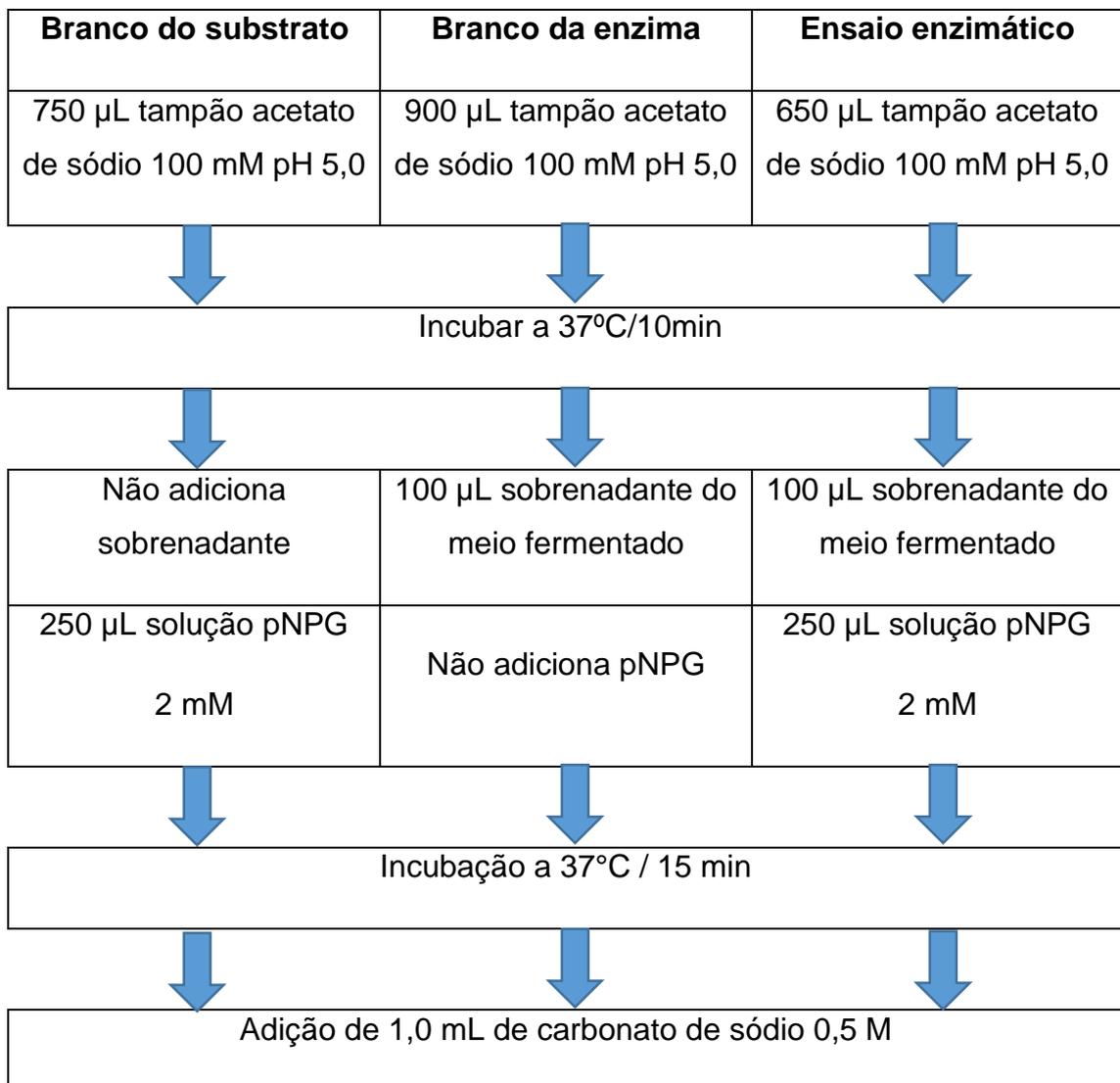
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Atividade enzimática (U/mL) – Método pNPG

A fim de realizar atividade enzimática de α -Gal (U/mL), a metodologia utilizada foi a descrita por Oliveira *et al.* (2005) e por Fialho (2007), em que o *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (pNPG) é utilizado como substrato de reação.

A curva-padrão para o substrato pNPG foi realizada a partir das concentrações de 0 a 0,20 μmol de substrato, com leitura em espectrofotômetro (SP-2000UV, Spectrum UV-VIS Spectrophotometer®) a 410 nm, sendo que a curva serviu como base para o cálculo de atividade enzimática.

A atividade de $\alpha\text{-Gal}$ (U/mL) foi determinada a partir da reação do substrato pNPG com o extrato enzimático proveniente da fermentação, em que foram levados em consideração o branco de substrato, branco da enzima e a reação propriamente dita, conforme esquema apresentado a seguir:



Após a reação enzimática, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (SP-2000UV, Spectrum UV-VIS Spectrophotometer®).

Com a equação gerada pela curva padrão do substrato pNPG e valores de absorbância a 410 nm, foi calculada a atividade enzimática de α -Gal de cada alíquota amostrada na presente dissertação, conforme a equação:

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{carboidrato } (\mu\text{mols})}{V_{\text{extrato enzimático}} (mL) * t_{\text{incubação}} (\text{min})} \quad (1)$$

3.7.2 Determinação de proteínas totais – Método Bradford

Para determinação das proteínas totais no extrato enzimático, foi aplicado o método descrito por Bradford (1976). Esta técnica se baseia no uso do corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250 a fim de determinar as proteínas totais em determinada amostra. A interação entre o corante e as macromoléculas proteicas com aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas causa o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, podendo ser identificado a 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

Para aplicação da técnica, foi utilizado reagente *Quick Start Bradford Protein Assay* (BIO-RAD®). A adição de reagente para curva padrão e amostras ocorreu conforme indicado pela metodologia: 40 μ L de albumina sérica bovina (BSA) diluída para 2 mL de reagente 1x *Dye Reagent* e 1 mL de extrato enzimático para 1 mL de 1x *Dye Reagent*.

A curva padrão foi realizada aplicando-se concentrações de 0 a 1,0 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA).

3.7.3 Determinação da concentração de biomassa

A determinação da biomassa em massa seca (g/L) foi realizada em triplicata em microtubos com capacidade para 2 mL, previamente identificados e pesados. Alíquotas de 1 mL provenientes do meio fermentado foram adicionadas aos microtubos e destinadas à centrifugação a 10.000 g por 10 min.

O sobrenadante obtido seguiu para análises de determinação enzimática e a biomassa foi ressuspendida e lavada com água destilada, sendo novamente centrifugada na condição anterior.

Após lavagem, os microtubos seguiram para estufa de secagem até estabilização da massa, sendo esta utilizada para o cálculo expresso em g/L.

3.7.4 Determinação de açúcares redutores – Método do DNS

A fim de determinar os carboidratos totais da vinhaça de soja, foi aplicado o método de açúcares redutores pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico “DNS”, descrito por Miller (1959). Em meio básico e a temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico passa a 3-amino-5-nitrosalicílico, originando uma coloração amarelada que pode ser lida a 540 nm em espectrofotômetro.

Como as amostras provenientes de vinhaça de soja contém não somente açúcares redutores, mas também carboidratos de maior massa molecular, foi necessário realizar hidrólise ácida a fim de reduzir os açúcares de cadeias maiores em açúcares redutores, a fim de poder ser aplicada a técnica de determinação via DNS.

Para isto, foram retirados 2,0 mL do sobrenadante e adicionados 2,0 mL de HCl 2N, com reação em banho-maria em ebulição por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, foram adicionadas de 2,0 mL de NaOH 2N e homogeneizadas. O volume de 1,0 mL do sobrenadante foi conduzido ao teste de DNS (MALDONADE *et al.*, 2013).

A reação da amostra com o DNS consistiu em adicionar 1 mL de reagente DNS para 1 mL de amostra hidrolisada em microtubos. Estes foram então levados à ebulição por 5 min. O conjunto foi resfriado em banho de gelo e adicionados de 5mL de água destilada, homogeneizados e foi prosseguida a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Com os dados de absorvância e partindo-se da curva padrão da concentração de glicose (de 0 a 1 g/L), calculou-se a quantidade de açúcares totais em g/L.

3.7.5 Determinação de sólidos solúveis (° Brix)

O teor de sólidos solúveis (°Brix) da vinhaça de soja foi medido com refratômetro portátil para açúcares (INSTRUTHERM®, modelo RT-30 ATC).

3.7.6 Determinação do teor de nitrogênio

Para a análise do teor de nitrogênio da vinhaça de soja foram pesados 0,5 g de amostra seca em papel manteiga (2 cm x 2 cm) e colocados em tubos de ensaio. Adicionou-se aproximadamente 0,5 g de catalisador e 5 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados no digestor (chapa de aquecimento, localizada em capela química), inicialmente a 100°C. A temperatura foi aumentada gradativamente de 50 em 50°C até atingir 350°C, temperatura na qual as amostras atingem coloração esverdeada após aproximadamente 4 horas. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e foram adicionados 10 mL de água ultrapura.

Em equipamento destilador de nitrogênio (TECNAL®, TE-036/1) com circulação de água, o tubo contendo amostra recebeu lentamente NaOH 40% até o ponto de viragem (até a amostra mudar para a coloração marrom). Em seguida foi acoplado um frasco de Erlenmeyer (capacidade de 125 mL) contendo 10 mL de solução de ácido bórico como indicador. A amostra foi aquecida até o volume de líquido no Erlenmeyer chegou em 50 mL. Foi realizada uma titulação com ácido clorídrico 0,1 mol/L. Após o tubo parar de ferver, foi retirado do equipamento.

A porcentagem de nitrogênio foi calculada pela fórmula:

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{V * 0,14 * fc}{\text{massa de amostra}} \quad (2)$$

Onde:

V = volume (em mL) de HCL 0,1 mol/L gasto na titulação.

fc = fator de correção do HCL 0,1 mol/L multiplicado pelo fator de correção do NaOH 0,1 N utilizado na titulação.

O teor proteico foi determinado pela fórmula:

$$\text{Proteínas (\%)} = \text{Nitrogênio (\%)} * Fc \quad (3)$$

Onde:

Fc = fator de correção igual a 6,25 para produtos vegetais.

Com o valor de proteínas totais, foi calculado também o valor em base-seca, com base na umidade da amostra (análise de umidade descrita no item 2.3.3).

3.7.7 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade das amostras, a qual foi realizada em triplicata, os cadinhos de porcelana foram levados à estufa de secagem e esterilização (FANEM®, modelo 315 SE) a 105°C *overnight* a fim de retirar a umidade dos mesmos. Após este procedimento, os cadinhos foram colocados em dessecador e pesados após resfriamento. Os cadinhos receberam aproximadamente 2 g de amostras e foram novamente colocados em estufa 105°C *overnight*, resfriados em dessecador e pesados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CEPAS BACTERIANAS EMPREGADAS PARA A PRODUÇÃO DE α -GAL

4.1.1 *Lactobacillus agilis* LPB 56

A linhagem de *Lactobacillus agilis* LPB 56 foi analisada em microscópio óptico após coloração de Gram.

A morfologia das células, encontrada na FIGURA 20-A, demonstra células viáveis em estado normal, formato de bacilos, após crescimento em condições de aerobiose. Já as células que cresceram em condições anaeróbias, em jarra contendo sachês, apresentaram morfologia diferente em relação àquelas cultivadas em aerobiose (FIGURA 20-B). Percebe-se um mesmo tipo de forma baciliar, contudo com estrutura celular bastante danificada. A presença ou não do oxigênio interfere sem dúvida na morfologia e estado das células como um todo, podendo estar associada à fase de crescimento na qual a bactéria se encontra, fato já relatado por Borch e Göran (1989).

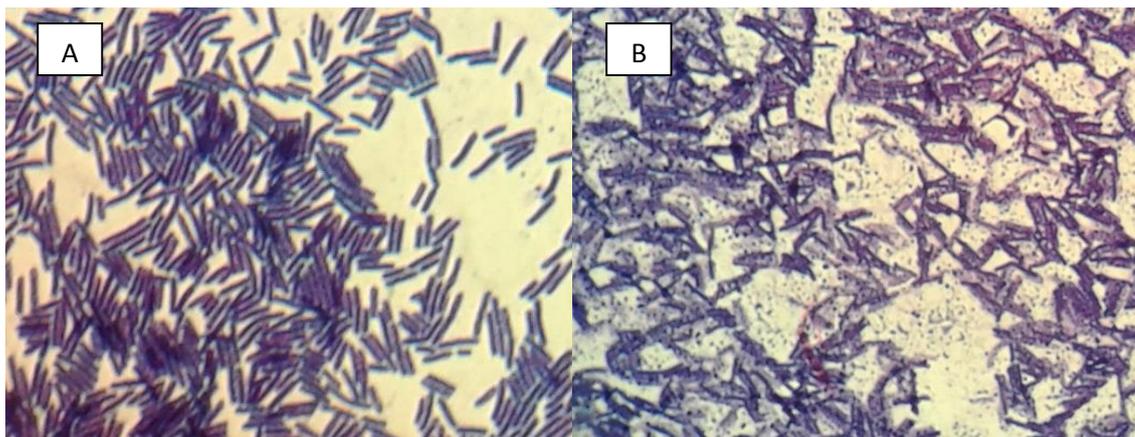


FIGURA 20 - *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 APÓS CRESCIMENTO EM AEROBIOSE (A) E EM ANAEROBIOSE (B), EM AUMENTO DE 1000X. FONTE: O AUTOR.

A partir da coloração resultante e da análise em microscopia, pode-se dizer que as bactérias em questão são do tipo Gram positivas, bacilares, apresentando-se de maneira individual, em pares ou em cadeias curtas.

4.1.2 *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23

A linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi analisada em microscópio óptico após coloração de Gram. A mesma foi cultivada da em superfície (*Spread-plate*) (FIGURA 21).

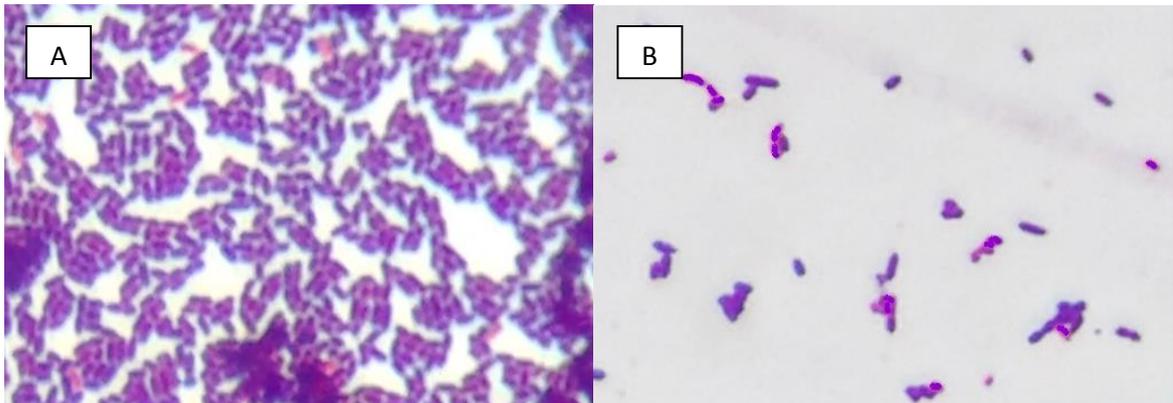


FIGURA 21 - *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM CADEIAS LONGAS (A) E *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 ISOLADAMENTE E EM CADEIAS CURTAS, EM AUMENTO DE 1000X. FONTE: O AUTOR.

A análise microscópica indica que a linhagem é do tipo Gram positiva, cocobacilar, apresentando-se de maneira individual, em pares ou em cadeias.

4.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE α -GAL POR *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.2.1 Estudos para a produção de inóculo de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em caldo MRS e vinhaça de soja

A fim de realizar uma comparação entre o meio de cultivo comercial MRS de pH inicial igual a 5,81 e o resíduo industrial vinhaça de soja (8° Brix, pH 5,06), foram realizadas as cinéticas de crescimento microbiano, onde foram analisados os valores biomassa em massa seca (g/L) e os valores de pH no decorrer dos tempos.

A TABELA 17 contém os dados referentes ao crescimento de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em caldo MRS. Pode-se observar um aumento do valor de biomassa (em g/L) e diminuição do pH decorrente do processo fermentativo, em que provavelmente há produção de ácido láctico, conforme relatado por Karp *et al.*, 2011.

TABELA 17 - CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM MEIO DE CULTIVO MRS.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)		pH	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
0	0,15 ± 0,00	0,18 ± 0,02	5,81 ± 0,00	5,81 ± 0,00
6	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,06	5,78 ± 0,00	5,64 ± 0,00
12	0,38 ± 0,08	0,47 ± 0,09	5,75 ± 0,00	5,60 ± 0,01
18	0,73 ± 0,03	1,18 ± 0,27	5,56 ± 0,00	5,26 ± 0,00
24	2,37 ± 0,29	0,93 ± 0,10	5,11 ± 0,00	4,89 ± 0,00
30	2,79 ± 0,30	1,42 ± 0,03	4,93 ± 0,00	4,68 ± 0,01
36	2,65 ± 0,31	1,45 ± 0,41	4,82 ± 0,01	4,58 ± 0,01

Na FIGURA 22 observam-se as curvas de crescimento em peso seco para os dois meios de cultivo, nas condições de aerobiose (*shaker* 120 rpm e 37°C), e anaerobiose (estufa a 37°C). O sistema aeróbio para o caldo MRS apresentou o melhor crescimento da linhagem *Lactobacillus agilis* LPB 56, enquanto que o sistema anaeróbio para os dois meios se mostrou inferior. A fase de adaptação (lag) para cultivo em MRS durou aproximadamente 12 horas e a fase logarítmica ocorreu de 12 a 24h de incubação para o sistema aeróbio e de 12 a 18h para o anaeróbio.

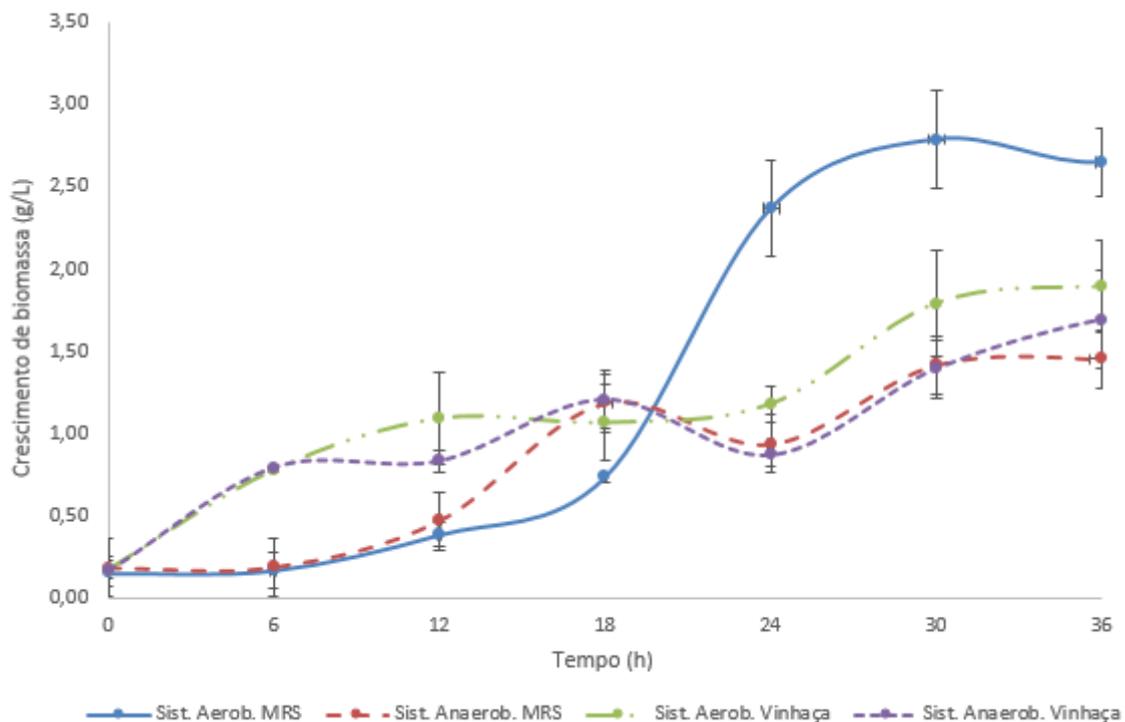


FIGURA 22 - EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM MEIO MRS E VINHAÇA DE SOJA PARA SISTEMA AERÓBIO (120 rpm) E ANAERÓBIO (CULTIVO ESTÁTICO).

O crescimento da biomassa máximo ($2,79 \pm 0,30$ g/L) ocorreu em 30 horas de cultivo para o sistema com agitação em aerobiose e de $1,45 \pm 0,41$ g/L para cultivo estático em anaerobiose. Isto corresponde a uma produtividade de 0,093 g/L.h para os sistema aeróbico e 0,049 g/L.h para o sistema anaeróbico. Tal fato demonstra que o microrganismo se desenvolve de maneira mais rápida em sistema aeróbico.

Para a vinhaça de soja (TABELA 18) o crescimento de biomassa foi menor do que no meio MRS, com $1,89 \pm 0,28$ g/L e uma produtividade de 0,052 g/L.h para o sistema aeróbico. Para o sistema anaeróbico, o crescimento foi de 1,82 g/L, com uma produtividade de 0,045 g/L.h. O crescimento de biomassa inferior no meio à base de vinhaça pode estar relacionado à composição química da vinhaça de soja, a qual apresenta açúcares de assimilação mais difícil do que o meio MRS. Em relação aos valores para o crescimento celular, o valor de biomassa (g/L) para o sistema aeróbico em MRS foi 48% maior do que a mesma condição no resíduo industrial estudado.

TABELA 18 – ACOMPANHAMENTO DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA.

Tempo	Biomassa (g/L)		pH	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
0	0,17 ± 0,06	0,16 ± 0,09	5,06 ± 0,00	5,06 ± 0,00
6	0,77 ± 0,01	0,79 ± 0,00	5,10 ± 0,00	5,07 ± 0,00
12	1,09 ± 0,28	0,83 ± 0,07	5,07 ± 0,00	5,06 ± 0,00
18	1,06 ± 0,23	1,20 ± 0,18	5,06 ± 0,00	5,04 ± 0,00
24	1,17 ± 0,11	0,87 ± 0,07	5,09 ± 0,00	5,06 ± 0,00
30	1,79 ± 0,32	1,39 ± 0,18	5,07 ± 0,00	5,04 ± 0,00
36	1,89 ± 0,28	1,69 ± 0,30	5,08 ± 0,01	5,04 ± 0,01

Analisando os valores de pH indicados na TABELA 18, não houve grandes variações nos valores ao longo do tempo de cultivo de 36 horas. A composição da vinhaça utilizada na forma integral promoveu menor crescimento da linhagem e a produção de metabólitos, dentre eles a enzima de interesse. Porém, certamente a produção de ácidos orgânicos não foi expressiva.

Sabe-se que a produção de ácido láctico é um indicativo da fermentação para a linhagem em questão, de acordo com o relatado por Karp *et al.* (2011). Em caldo MRS, o pH diminuiu com o passar do tempo, passando de 5,8 a 4,9 no sistema anaeróbico. Para a vinhaça de soja praticamente não houve alteração de acidez, devido ao fato da vinhaça de soja apresentar em sua composição açúcares de mais difícil assimilação, o que dificulta o crescimento da bactéria. Ainda, isto pode caracterizar um efeito tamponante, o que teria efeito positivo em outras situações.

Com os dados obtidos até o momento, conclui-se que o sistema com agitação (aeróbio) apresentou melhores resultados para a produção de biomassa de *Lactobacillus agilis* LPB 56, sendo o caldo MRS mais propício como meio de cultivo, com produção de $2,37 \pm 0,29$ g/L em 24 h de crescimento. Para o mesmo microrganismo e no mesmo tempo de amostragem, Karp *et al.* (2011) relatou a produção de 0,56 g/L de biomassa em estudo para produção de ácido láctico, enquanto que Sanada *et al.* (2009) obteve 3,92 g/L após testes de otimização para produção de α -Gal. Estes dados indicam que a produção de inóculo em caldo MRS é viável para posterior aplicação em fermentação. Por outro lado, a vinhaça de soja não foi um meio benéfico para o crescimento do *Lactobacillus agilis* LPB 56.

4.2.2 Otimização para fermentação de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em vinhaça de soja – Acompanhamento da evolução de biomassa (g/L) e pH

De acordo com a metodologia descrita no item 3.4, a fim de verificar as melhores condições para o aumento da biomassa de *Lactobacillus agilis* LPB 56, foram aplicadas as condições variando o teor de sólidos solúveis de 8,0 a 35° Brix (vinhaça foi suplementada com melaço de soja até atingir o teor de carboidratos adequado para cada ensaio), carbonato de cálcio de 0 a 2,0% (m/v) e extrato de levedura de 0,0 a 1,0 % (m/v).

Os resultados obtidos para biomassa dos ensaios encontram-se na TABELA 19 e na FIGURA 22. Nota-se que o maior valor ($0,2351 \pm 0,0228$ g/L) diz respeito ao frasco 8, cujo meio de cultivo estava ajustado em 35° Brix, 2% (m/v) de carbonato de cálcio e adição de 1% (m/v) de extrato de levedura.

TABELA 19 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL FRACIONADO 2^{3-1} PARA BIOMASSA (G/L) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM FERMENTAÇÃO EM VINHAÇA DE SOJA EM 24h.

Ensaio	Biomassa (g/L) + desvio-padrão
1	$0,1049 \pm 0,0011$
2	$0,1229 \pm 0,0054$
3	$0,0895 \pm 0,0078$
4	$0,0917 \pm 0,0097$
5	$0,1012 \pm 0,0018$
6	$0,1480 \pm 0,0089$
7	$0,0390 \pm 0,0038$
8	$0,2351 \pm 0,0228$
9	$0,1755 \pm 0,0166$
10	$0,1609 \pm 0,0208$
11	$0,1700 \pm 0,0191$
12	$0,1784 \pm 0,0113$

Os ensaios 9 a 12 (FIGURA 23), referentes aos pontos centrais do planejamento (21,5° Brix, 1% (m/v) de CaCO_3 e 0,5% (m/v) de extrato de levedura) também apresentaram boas condições aumento de biomassa, entre $0,1609 \pm 0,0208$ g/L e $0,1784 \pm 0,0113$ g/L. Os menores valores de crescimento de biomassa foram para a condição 7, de $0,0390 \pm 0,0038$ g/L nas condições de 8° Brix, 2% CaCO_3 e 1% (m/v) extrato de levedura.

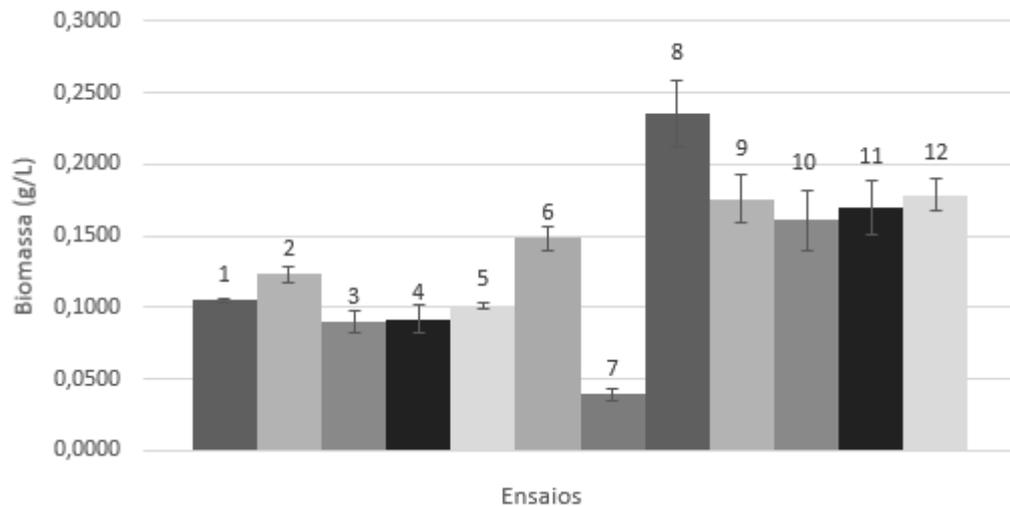


FIGURA 23 - EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (G/L) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 PARA FERMENTAÇÃO EM VINHAÇA DE SOJA EM 24h.

Em relação aos valores de pH, de maneira geral os meios de cultivo apresentaram efeito tamponante, apresentando um pH final que variou de 5,01 (ensaio 1) e 6,41 (ensaio 4).

A partir das 12 condições de meio de cultivo, foi aplicada a análise estatística para Planejamento Experimental Fatorial Fracionado 2^{3-1} , com o suporte do *software* STATISTICA 7® (StatSoft, Inc.). O R^2 foi de 0,87 para o experimento o que indica que 87 % do modelo representa a produção de biomassa. A TABELA 20 indica os valores obtidos pela Análise de Variância (ANOVA).

TABELA 20 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA BIOMASSA (G/L) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Brix (°)	0,009099	1	0,009099	3,924371	0,104444
(2) CaCO ₃ (%)	0,000101	1	0,000101	0,043483	0,843046
(3) Ext. Levedura (%)	0,001447	1	0,001447	0,624181	0,465299
1 by 2	0,002010	1	0,002010	0,866812	0,394574
1 by 3	0,005832	1	0,005832	2,515323	0,173603
2 by 3	0,000764	1	0,000764	0,329685	0,590708
Error	0,011593	5	0,002319		
Total SS	0,030846	11			

Já os coeficientes de regressão constam na TABELA 21, a partir dos quais são apresentados os valores para os fatores isoladamente e com interação entre Brix (°), CaCO₃ (%) e extrato de levedura (%).

TABELA 21 – COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA BIOMASSA (G/L) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56.

Fator	Reg. Coeff.	Std. Err.	t (5)	p	-90 % Cnf. Limt	+90 % Cnf. Limt
<i>Mean/Interc.</i>	0,149724	0,057166	2,61910	0,047149	0,034531	0,264917
(1) Brix (°)	-0,000676	0,002184	-0,30946	0,769452	-0,005077	0,003725
(2) CaCO ₃ (%)	-0,038568	0,036259	-1,06366	0,336132	-0,111632	0,034497
(3) Ext. Lev. (%)	-0,078650	0,072519	-1,08455	0,327625	-0,224779	0,067479
1 by 2	0,001174	0,001261	0,93103	0,394574	-0,001367	0,003715
1 by 3	0,004000	0,002522	1,58598	0,173603	-0,001082	0,009082
2 by 3	0,019550	0,034048	0,57418	0,590708	-0,049059	0,088159

De acordo com os dados apresentados, observou-se tendência de incremento de biomassa (g/L) quanto maior adição de extrato de levedura (%) e menor adição possível de carbonato de cálcio (%) ao meio de cultivo, que pode ter sido um interferente no aumento de células, conforme relatado também por Ghosh e Ghosh (2007).

Em relação ao Diagrama de Pareto sobre o efeito dos fatores estudados no crescimento de biomassa em massa seca (g/L), aos níveis de α igual a 5 e 10%, não houve diferença significativa entre os parâmetros estudados.

Apesar de estatisticamente não haver diferença significativa na concentração de sólidos solúveis, carbonato de cálcio e extrato de levedura para o crescimento de biomassa (g/L), indicou-se uma tendência das condições ideais aproximadas ao relatado por Sanada *et al.* (2009): 30° Brix e 0,5% (m/v) de extrato de levedura. A interação entre a fonte de carbono (vinhaça de soja) e a fonte de nitrogênio leva a uma reflexão sobre a relação C/N, que pode influenciar na produção de biomassa e, conseqüentemente, levar à produção da enzima α -Gal. Isto indicaria que a atividade enzimática pode estar ligada ao metabolismo primário do microrganismo, ou seja, quanto maior o crescimento, maior a atividade da enzima.

A produção de α -Gal será apresentada no próximo item deste trabalho.

4.2.3 Produção e recuperação de α -Gal por *Lactobacillus agilis* LPB 56 em vinhaça de soja – Atividade extra e intracelular

As atividades de α -Gal extra e intracelular (U/mL) foram determinadas no extrato enzimático obtido a partir de vinhaça de soja ajustada a 30° Brix e com 0,5% (m/v) de extrato de levedura por *Lactobacillus agilis* LPB 56 conforme descrito no item 3.3.4. Após o processo de produção, a biomassa foi separada por centrifugação e o extrato enzimático livre de células foi empregado para a determinação de atividade extracelular de α -Gal. A determinação da atividade enzimática (U/mL) intracelular ocorreu conforme o item 3.7.1 e os dados obtidos encontram-se na TABELA 22.

TABELA 22 - ATIVIDADE EXTRA E INTRACELULAR DE α -Gal.

Amostras	Atividade enzimática (U/mL) + DP
Sobrenadante	0,0237 \pm 0,0120
Rompimento por congelamento	0,0687 \pm 0,0380
Sonicação – Após 2°Ciclo	0,1080 \pm 0,0360
Sonicação – Após 4°Ciclo	0,0487 \pm 0,0153
Sonicação – Após 6°Ciclo	0,1073 \pm 0,0367
Sonicação – Após 8°Ciclo	0,0953 \pm 0,0127

De acordo com a TABELA 22, o maior valor de atividade enzimática foi para a condição intracelular, com células rompidas após 2 ciclos de sonicação, sendo de aproximadamente 0,1080 U/mL. Mais ciclos de sonificação não seriam necessários, visto que após 2 ciclos não houve aumento significativo da atividade enzimática. Além disso, um maior número de ciclos pode ter colaborado para a perda da atividade de α -Gal, visto que o equipamento causa elevação de temperatura da amostra mesmo com procedimento em banho de gelo. Sendo assim, no decorrer do processo de rompimento, supõe-se que à medida que as células liberavam a enzima para o meio extracelular, a enzima liberada no ciclo anterior poderia ter sofrido desnaturação, ocasionando então estes picos de atividade enzimática observados no estudo.

A atividade extracelular apresentou valor bem inferior (0,0237 \pm 0,0120 U/mL), o que demonstra a necessidade do rompimento celular para o processo realizado a partir de *Lactobacillus agilis* LPB 56. Tal fato já havia sido observado anteriormente por Sanada *et al.* (2009) para a mesma linhagem bacteriana e por Lanciotti *et al.*

(2007) para recuperação de metabólitos intracelulares de *Lactobacillus arizonensis* 21 e 143, *Lactobacillus casei* 28 e 80, *Lactobacillus pentosus* 37, 57 e 83 e *Lactobacillus plantarum* 8, 42, 58 e 63.

Após congelamento a -18°C e descongelamento a temperatura ambiente, as células bacterianas com estrutura originalmente presentes em (A) (FIGURA 24) apresentaram rompimento celular, podendo ser observados os debris celulares, com poucas células intactas (B).

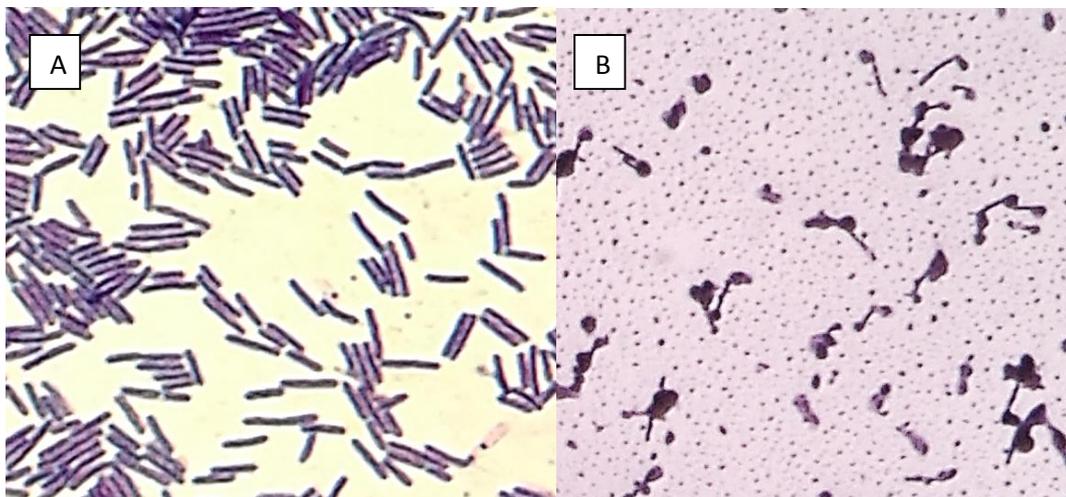


FIGURA 24 - CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 COM ESTRUTURA CELULAR NORMAL (A) E APÓS LISE CELULAR POR CONGELAMENTO (B), EM AUMENTO DE 1000X: FONTE: O AUTOR.

O teste de sonicação para células de *Lactobacillus agilis* LPB 56 foi conduzido conforme descrito no item 3.3.4.2 de “Material e Métodos”: ciclos de 30 segundos, com potência de 40%, em banho de gelo. A cada dois ciclos foi realizada a coloração de Gram da biomassa resultante e a determinação da atividade enzimática do extrato após centrifugação.

Para a visualização do grau de rompimento celular ao microscópio óptico, foi utilizada a técnica de coloração de Gram nas seguintes amostras de biomassa: antes da sonicação (A), ao final do 2° ciclo (B), após o 4° ciclo (C) e ao final do 6° ciclo da sonicação (D), em aumento de 1000x (FIGURA 25).

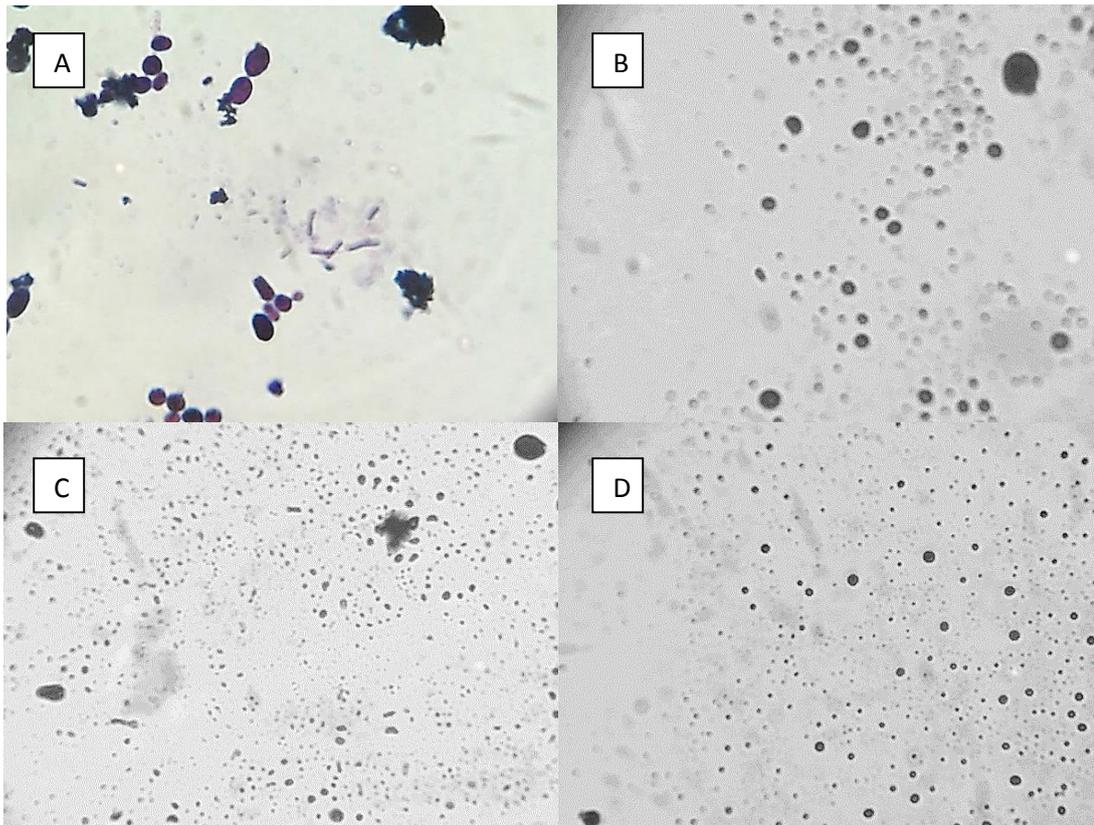


FIGURA 25 - CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 – ANTES DA SONICAÇÃO (A), FINAL 2º CICLO (B), APÓS 4º CICLO (C) E AO FINAL DO 6º CICLO (D), EM AUMENTO DE 1000X.
 FONTE: O AUTOR.

Após o 2º ciclo de sonicação de 30 s, observou-se rompimento significativo das células, tornando-se ainda mais intenso no 4º e 6º ciclos, em que se observa maior número de debris celulares (menor número de células intactas) e em menor tamanho que nos primeiros ciclos. Entretanto, a atividade de α -Gal, foi maior logo após o 2º ciclo. Um maior número de ciclos de sonicação, apesar de provocar o rompimento das estruturas celulares, pode de alguma forma colaborar para a perda da atividade enzimática, pois o equipamento causa elevação de temperatura da amostra, mesmo com procedimento em banho de gelo.

De maneira geral, a sonicação aplicada foi mais branda que, por exemplo, a estudada por Kreft e Jelen (2000) para *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842, com ciclo de 4 min a 75 Watts para liberação de enzima β -galactosidase.

4.2.4 Estudo do efeito da combinação de rompimento de células de *Lactobacillus agilis* LPB 56 por congelamento e por sonicação sobre a atividade de α -Gal

Para verificar se a combinação entre o rompimento celular por congelamento e por sonicação produziria resultados melhores em termos de recuperação da atividade enzimática intracelular, foram realizados testes conforme item 3.3.5. O extrato enzimático foi produzido a partir de vinhaça de soja pura e vinhaça de soja suplementada.

Após os procedimentos de rompimento celular via congelamento seguido de sonicação, foi realizada a análise de atividade enzimática, em U/mL. Os dados obtidos se encontram nas TABELAS 23 e 24 e também na forma de gráfico (FIGURA 27). Foram levadas em consideração as diluições das alíquotas, assim como os valores dos brancos.

Com os resultados obtidos, nota-se que para o extrato enzimático da vinhaça de soja pura (TABELA 23) a maior atividade enzimática de α -Gal foi encontrada para o sobrenadante após 24 h de fermentação, com valor de $0,08 \pm 0,01$ U/mL. Os extratos enzimáticos que passaram por ciclos de congelamento e descongelamento, submetidos ou não a um ou dois ciclos de sonicação, demonstraram valores de atividade enzimática menores do que as encontradas no sobrenadante (sem rompimento celular; atividade extracelular).

TABELA 23 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA PURA.

VINHAÇA DE SOJA PURA - Atividade enzimática (U/mL) + DP					
Tempo (h)	Sobrenadante	Congelado 1 vez*	Congelado 2 vezes*	Cong. 1x e 1 ciclo sonic.	Cong. 2 x e 2 ciclos sonic. *
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
4	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
18	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
24	0,08 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
28	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
42	0,05 \pm 0,02	0,07 \pm 0,06	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01

* Considerando o sobrenadante. ** Não houve diferença estatística em nível de $\alpha=5\%$ para as condições estudadas.

No caso da fermentação utilizando a vinhaça de soja ajustada a 30° Brix e suplementada com 0,5% (m/v) de extrato de levedura (TABELA 24), a condição com maior atividade enzimática foi para o rompimento celular via congelamento e 2 ciclos

de sonicação ($0,50 \pm 0,04$ U/mL), similar ao encontrado no tratamento com 1 ciclo de congelamento ($0,44 \pm 0,01$ U/mL), indicando que o processo de sonicação não foi efetivo para a recuperação da atividade enzimática de α -Gal a partir de *Lactobacillus agilis* LPB 56, bastando então somente uma aplicação de congelamento.

TABELA 24 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) PARA CULTIVO DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM VINHAÇA DE SOJA AJUSTADA.

VINHAÇA DE SOJA AJUSTADA - Atividade enzimática (U/mL) + DP					
Tempo (h)	Sobrenadante	Congelado 1 vez*	Congelado 2 vezes*	Cong. 1x e 1 ciclo sonic.*	Cong. 2 x e 2 ciclos sonic. *
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
4	$0,03 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
18	$0,01 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
24	$0,04 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,07$	$0,05 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$
28	$0,10 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,01$	$0,004 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$
42	$0,05 \pm 0,00$	$0,44 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,04$

* Considerando o sobrenadante. ** Os valores em negrito não apresentam diferença estatística entre si, mas são diferentes estatisticamente dos demais em nível de $\alpha=5\%$.

A FIGURA 26 apresenta a atividade enzimática de α -Gal para vinhaça pura e para vinhaça de soja ajustada nas condições de rompimento celular estudadas. Pelo gráfico, observa-se maior valor para a vinhaça ajustada (VA) em um tempo de 42 h com 2 etapas de congelamento e sonicação, seguida da atividade enzimática obtida com vinhaça ajustada e recuperada por rompimento via etapa única de congelamento, da qual não se observa diferença significativa. Este rompimento por um ciclo de congelamento seria, então, a melhor condição de rompimento para este estudo, visto que são necessárias menos etapas para liberação da enzima intracelular. Já em relação a vinhaça de soja pura (VP), o sobrenadante em 24 h de processo foi a melhor condição obtida.

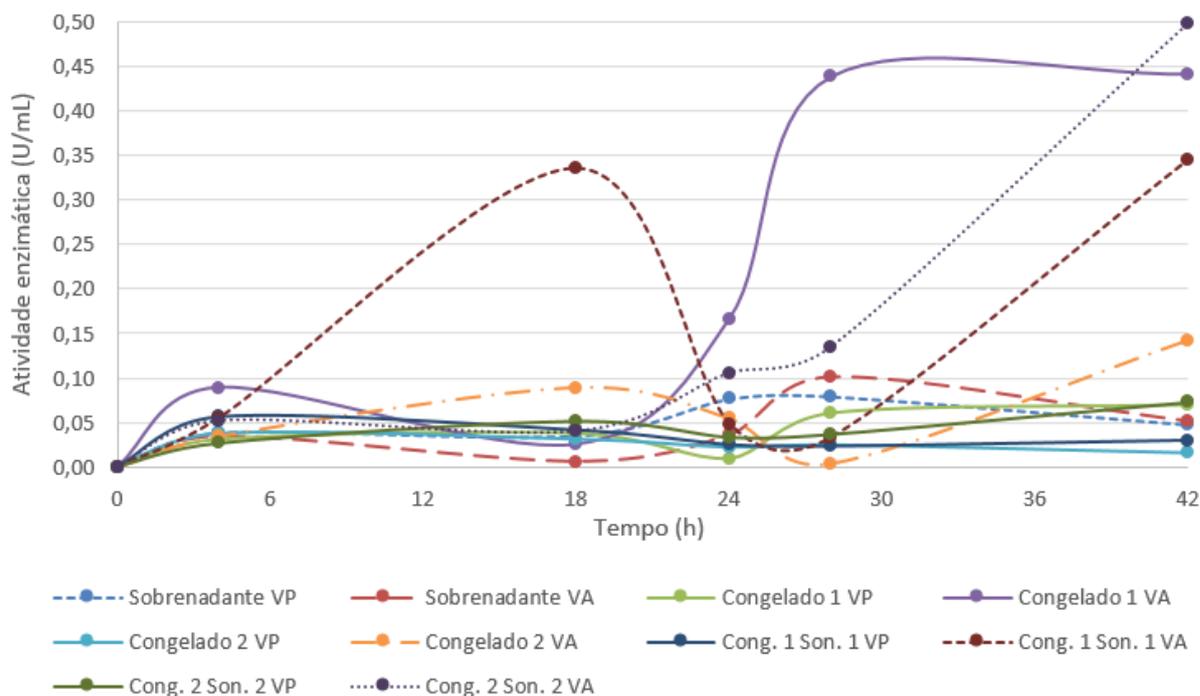


FIGURA 26 - ATIVIDADE DE α -GAL PRODUZIDA POR *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM VINHAÇA PURA (VP) E AJUSTADA (VA) – SOBRENADANTE, AMOSTRAS CONGELADAS UMA (CONG. 1) E DUAS VEZES (CONG. 2) E SONICADAS UMA (SON. 1) E DUAS VEZES (SON. 2).

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que para a fermentação em vinhaça de soja pura há uma tendência a conduzir produção de α -Gal extracelular após 24 h. Por outro lado, a vinhaça de soja ajustada propiciou uma atividade intracelular após 42h de processo.

Sobre o rompimento celular, é possível sugerir que com o congelamento os cristais de gelo formados lisem as células, liberando a enzima para o meio extracelular. Isto porque os cristais de gelo formados em congelamento lento são capazes de lisar as células devido à sua geometria, liberando os metabólitos internos para o meio extracelular. Este fenômeno já foi estudado para a dosagem de enzimas intracelulares tanto para a obtenção de fitase por *Rhodotorula gracilis* (BINDU *et al.*, 1998), quanto para enzimas de *Lactococcus lactis* (DOOLAN e WILKINSON, 2009) e também para liberação de catalases produzidas por leveduras (SEKHAR *et al.*, 1999).

A sonicação, por outro lado, causa rompimento por meio da cavitação, que também rompe a membrana celular permitindo a saída da enzima. No entanto, este processo gera calor que pode ocasionar desnaturação de macromoléculas sensíveis à temperatura (FOLADORI *et al.*, 2007).

Os resultados de atividade enzimática obtidos no presente trabalho estão bem abaixo do descrito por SANADA (2009), de aproximadamente 6,0 U/mL, em meio otimizado fermentado por *Lactobacillus agilis* em vinhaça de soja. Deste modo, foi também testada a produção de α -Gal de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em meio sintético de modo a encontrar uma alternativa para produção e mais fácil recuperação da enzima.

4.2.5 Produção de α -Gal por *Lactobacillus agilis* LPB 56 em meio sintético suplementado com fontes de carbono indutoras

Para o teste com caldo MRS adicionado de 1% (m/v) dos carboidratos indutores, as ativações, preparo do inóculo e fermentação utilizando *Lactobacillus agilis* LPB 56 ocorreram conforme descrito no item 3.3.6 do capítulo “Material e Métodos”. Como resultados, foram obtidos os valores de biomassa em g/L, atividade enzimática e pH.

Os resultados estão apresentados na TABELA 25 e na FIGURA 27. A produção de α -Gal no sobrenadante (enzima extracelular) obtido com a adição de rafinose (1% m/v) no meio de cultivo foi a que apresentou maior atividade ($0,5962 \pm 0,0884$ U/mL).

Entretanto, para as amostras submetidas ao rompimento celular, a produção da enzima com adição de amido levou a uma atividade de $0,3252 \pm 0,0626$ U/mL, valor ainda bem abaixo do descrito em literatura, de aproximadamente 6,0 U/mL (SANADA, 2009). Mesmo com a mudança na composição do meio, com meio MRS suplementado com fontes de carbono indutoras, a produção e recuperação da enzima α -Gal por *Lactobacillus agilis* LPB 56 não se apresenta satisfatória, devendo ser testadas outras alternativas e fontes de produção enzimática.

TABELA 25 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA α -GAL – SOBRENADANTE E APÓS ROMPIMENTO CELULAR DO MEIO FERMENTADO DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56.

MRS com carboidratos indutores - Atividade enzimática (U/mL)						
	Amido	Dextrose	Lactose	Maltose	Melibiose	Rafinose
Sobrenadante	0,1355 \pm 0,0271	0,1897 \pm 0,0271	0,1355 \pm 0,0813	0,3794 \pm 0,1084	0,2981 \pm 0,0813	0,5962 \pm 0,0884
Após rompimento celular	0,3252 \pm 0,0626	0,1376 \pm 0,0813	0,2168 \pm 0,0184	0,2710 \pm 0,0002	0,2710 \pm 0,0426	0,0813 \pm 0,0271

* Aplicando-se análise estatística, não houve diferença significativa entre as amostras em nível de $\alpha=5\%$, exceto para o sobrenadante do meio de cultivo contendo 1% (m/v) de rafinose.

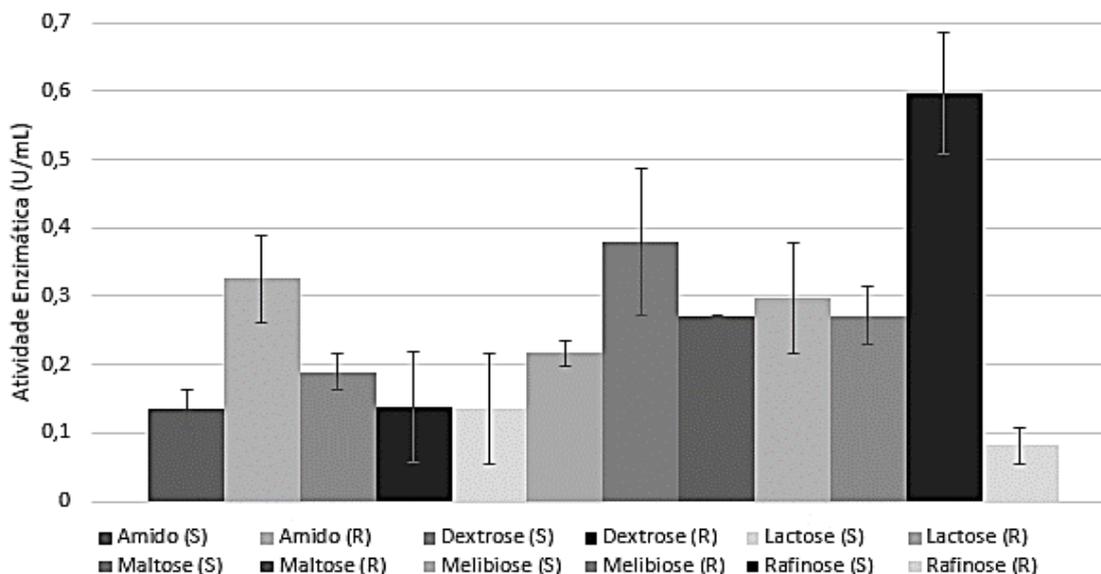


FIGURA 27 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SOBRENADANTE (S) E ROMPIMENTO CELULAR (R) EM U/mL POR *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES APÓS 24H DE FERMENTAÇÃO.

Em relação à produção de biomassa em g/L durante o processo de produção de α -Gal (FIGURA 28 e TABELA 26), observa-se que não houve diferença expressiva entre o crescimento de *Lactobacillus agilis* LPB 56 em meio contendo as diferentes fontes de carbono indutoras: amido, dextrose, lactose, maltose, melibiose e rafinose. O menor crescimento ocorreu com a adição de rafinose, sendo que a produção da enzima foi mais alta neste caso. Com isso, sugere-se que para a linhagem testada e condições empregadas, a produção de α -Gal não dependeu diretamente do crescimento. Esta condição pode ser justificada pelo caldo MRS já ter em sua composição os substratos suficientes para o aumento de biomassa, enquanto que os carboidratos suplementares poderiam, então, ser utilizados para a produção de enzima.

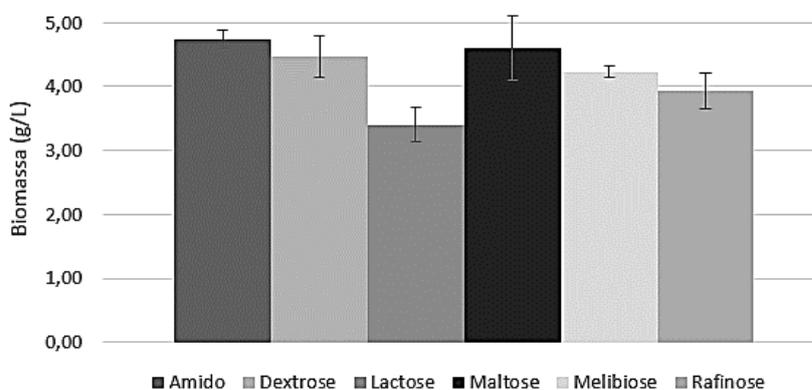


FIGURA 28 - BIOMASSA EM MASSA SECA (G/L) PARA FERMENTAÇÃO EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES APÓS 24H DE FERMENTAÇÃO.

TABELA 26 – EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) PARA FERMENTAÇÃO DE *LACTOBACILLUS AGILIS* LPB 56 EM CALDO MRS ADICIONADO DE INDUTORES.

	Biomassa (g/L)					
	Amido	Dextrose	Lactose	Maltose	Melibiose	Rafinose
24 h	4,73 ± 0,14	4,47 ± 0,32	3,40 ± 0,27	4,60 ± 0,50	4,23 ± 0,09	3,93 ± 0,28

* Aplicando-se análise estatística, não houve diferença significativa em nível de $\alpha=5\%$ para as amostras de biomassa (g/L) quando aplicadas diferentes fontes de carbono.

Para os valores de pH, observou-se que apesar da diminuição do valor para as seis condições testadas não houve diferença expressiva entre os seis carboidratos indutores. Mesmo assim, a maior diferença de acidificação ocorreu para caldo MRS adicionado de 1% (m/v) de dextrose (redução de 6,06 para 4,83). Nestas condições, ocorreu provavelmente maior produção de ácidos orgânicos.

Deste modo, outras linhagens bacterianas foram elencadas para teste de produção de α -Gal, baseando-se em outras culturas descritas na literatura e disponíveis no banco de linhagens do Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.

4.3 PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LACTOBACILLUS CURVATUS* NRRL1 E *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM MEIO SINTÉTICO E EM VINHAÇA DE SOJA

Para a produção de α -Gal foram realizadas as ativações e preparo do inóculo das linhagens *Lactobacillus curvatus* NRRL1 e *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, as quais ocorreram de acordo com o descrito no item 3.1.2 do capítulo de “Material e Métodos”, enquanto que as condições de fermentação foram as determinadas no item 3.4.

A condição de 30°C a que apresentou melhor crescimento (observação visual do turvamento do meio) para as duas linhagens, comprovando o valor de temperatura indicado em literatura (ATCC, 2014a e ATCC, 2014b). Portanto, para cada ativação e posterior repique, a temperatura aplicada foi 30°C por tempo de 24 h.

Para este tempo, foram realizadas as análises de pH e de atividade enzimática em U/mL para as três condições de meio de cultivo aplicadas (MRS adicionado de 1% (m/v) de rafinose, vinhaça pura e vinhaça ajustada a 30° Brix e suplementada com 0,5% (m/v) de extrato de levedura).

A produção de α -Gal extra e intracelular pelas duas cepas, em U/mL do sobrenadante, é mostrada na TABELA 27 e FIGURA 29 nas três condições testadas. O melhor resultado foi obtido com a vinhaça pura: 4,21 U/mL para *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 e aproximadamente 1,92 U/mL para *Lactobacillus curvatus* NRRL 1, no sobrenadante. Em relação à produção de α -Gal pelas duas linhagens em amostras submetidas ao rompimento celular, os dados indicam baixas atividades enzimáticas, sendo 1,11 U/mL por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 e 1,41 U/mL por *Lactobacillus curvatus* NRRL 1, ambos em vinhaça pura.

TABELA 27 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRA E INTRACELULAR DE α -GAL POR *LACTOBACILLUS CURVATUS* NRRL1 E *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23.

Condições estudadas	Atividade enzimática (U/mL) + DP					
	<i>Lactobacillus curvatus</i> NRRL 1			<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23		
	MRS + 1% rafinose	Vinhaça Pura	Vinhaça Ajustada	MRS + 1% rafinose	Vinhaça Pura	Vinhaça Ajustada
Sobrenadante	0,7071 \pm 0,0001	1,9192 \pm 0,1662	1,0606 \pm 0,1515	0,5051 \pm 0,0000	4,2121 \pm 0,3566	1,8182 \pm 0,4121
Após rompimento celular	0,3030 \pm 0,1010	1,4141 \pm 0,0000	0,8586 \pm 0,0505	0,3030 \pm 0,2020	1,1111 \pm 0,2020	1,1111 \pm 0,0000

* Aplicando-se análise estatística, houve diferença significativa em nível de $\alpha=5\%$ somente para a produção de α -Gal extracelular por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja pura (sem suplementação), quando comparada aos demais testes aplicados.

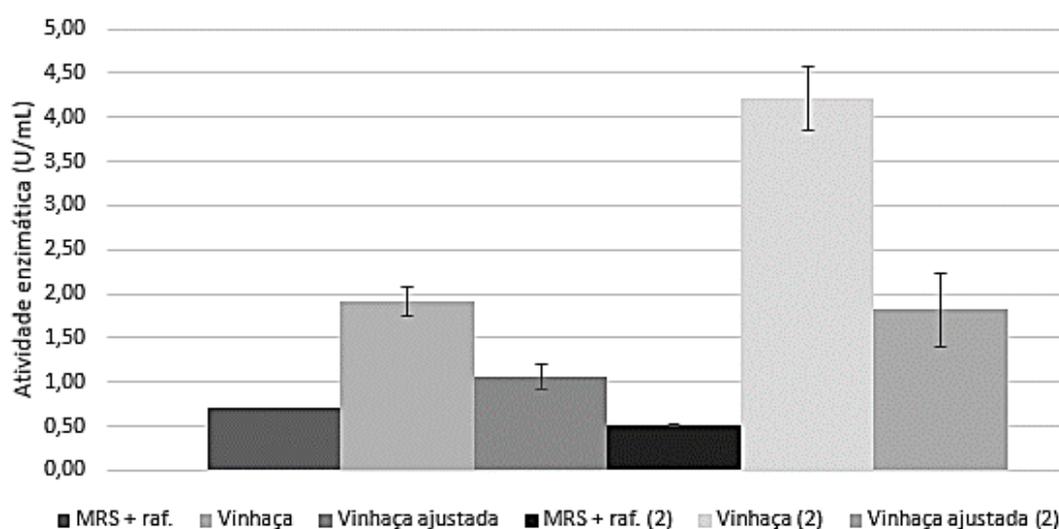


FIGURA 29 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRA E INTRACELULAR DE α -Gal POR *LACTOBACILLUS CURVATUS* NRRL1 E *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 (2).

Em geral, os melhores valores de obtenção da enzima α -Gal ocorreram para a cepa *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja pura, sem que houvesse a necessidade de rompimento celular, o que comprova a atividade predominante extracelular. Tal fato é uma vantagem, pois elimina uma etapa de recuperação, o rompimento celular, além de evitar perdas por desnaturação das proteínas devido ao processo de rompimento.

Os valores de pH do meio durante o processo de produção da enzima α -Gal indicaram que a maior diminuição ocorreu para o meio sintético (4,35 para as duas cepas) enquanto que em vinhaça pura não ocorreu diminuição significativa do pH, que permaneceu próximo a 4,8-4,9 para as duas linhagens. A vinhaça apresenta provavelmente um efeito tamponante, o que pode ser benéfico tanto para a estabilidade de α -Gal no meio, quanto para a produção de biomassa, pois sabe-se que a produção de ácido no meio de cultivo pode prejudicar o aumento de células (GHOSH *et al.*, 2007).

A partir dos testes aplicados, conclui-se que o melhor meio para produção de α -Gal foi a vinhaça de soja pura, tanto pelo valor de atividade em U/mL, quanto pelo efeito tamponante, que pode ter conferido maior estabilidade para a proteína produzida.

4.4 PRODUÇÃO DE INÓCULO DE *LEUCONOSTOC MENTEROIDES* INRA 23

A partir desta etapa, foi realizado um estudo detalhado com a cepa *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 para a produção de α -Gal.

O estudo da produção de inóculo ocorreu segundo metodologia descrita no item 3.4.3, do tópico “Material e Métodos”, inicialmente com 2 ativações da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em estufa a 30°C, seguida de teste de crescimento de inóculo em 6 diferentes condições, previamente descritas.

Em cinco tempos de fermentação (0 h, 6 h, 12 h, 24 h e 30 h) foram retiradas amostras destinadas às análises de crescimento de biomassa em UFC/mL e pH.

Pode-se perceber na TABELA 31 e FIGURA 30 que a condição de crescimento em estufa a 30°C apresentou fase exponencial de 6 a 12 h de cultivo ($7,2 \cdot 10^{11}$ UFC/mL para caldo MRS puro e $5,9 \cdot 10^{11}$ UFC/mL para caldo MRS enriquecido), enquanto que para a agitação de 120 rpm, esta fase ocorreu em 24 h, correspondendo a $7,75 \cdot 10^{11}$

UFC/mL para caldo MRS puro e $1,01 \cdot 10^{12}$ UFC/mL para caldo MRS enriquecido. Para a agitação de 50 rpm, as curvas ficaram em região intermediária às outras condições, mas também com crescimento máximo próximo a 24h: $7,73 \cdot 10^{11}$ UFC/mL para caldo MRS puro e $7,5 \cdot 10^{11}$ UFC/mL para caldo MRS enriquecido.

A TABELA 28 apresenta todos os valores da cinética de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 testada, para as seis condições estudadas.

TABELA 28 - EVOLUÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS (UFC/mL) DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM CALDO MRS.

Biomassa (UFC/mL)						
Tempo (h)	0 rpm p	0 rpm e.l.	50 rpm p	50 rpm e.l.	120 rpm p	120 rpm e.l.
0	$1,47 \cdot 10^9$	$2,64 \cdot 10^9$	$1,95 \cdot 10^9$	$2,35 \cdot 10^9$	$2,62 \cdot 10^9$	$1,50 \cdot 10^9$
6	$5,93 \cdot 10^{10}$	$3,05 \cdot 10^{10}$	$2,80 \cdot 10^{10}$	$1,22 \cdot 10^{10}$	$1,43 \cdot 10^{10}$	$1,78 \cdot 10^{10}$
12	$7,20 \cdot 10^{11}$	$5,90 \cdot 10^{11}$	$1,23 \cdot 10^{11}$	$4,55 \cdot 10^{11}$	$2,30 \cdot 10^{11}$	$3,50 \cdot 10^{10}$
24	$6,75 \cdot 10^{11}$	$4,20 \cdot 10^{11}$	$7,73 \cdot 10^{11}$	$7,50 \cdot 10^{11}$	$7,75 \cdot 10^{11}$	$1,01 \cdot 10^{12}$
30	$1,28 \cdot 10^{11}$	$1,14 \cdot 10^{11}$	$1,20 \cdot 10^{11}$	$9,30 \cdot 10^{10}$	$1,50 \cdot 10^{11}$	$2,43 \cdot 10^{11}$

* A letra "p" indica que foi aplicado caldo MRS puro, enquanto que "e.l." indica que foi adicionado extrato de levedura na formulação. ** Desvio-padrão desprezível.

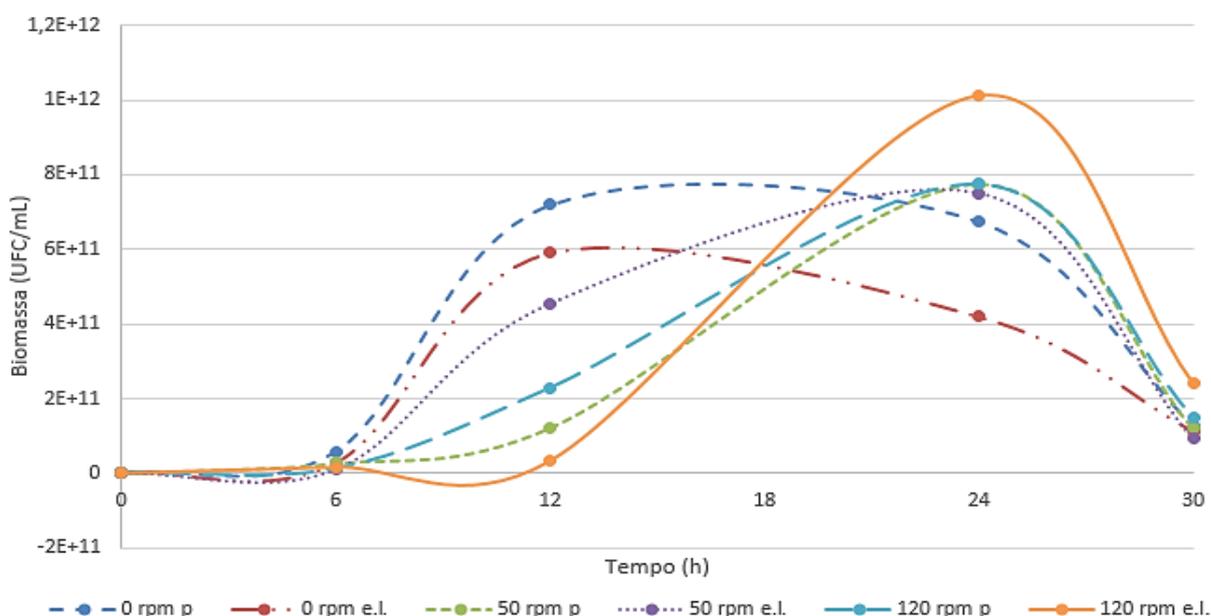


FIGURA 30 - EVOLUÇÃO DE BIOMASSA (UFC/mL) DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM CALDO MRS.

Em relação ao acompanhamento do pH dos meios de cultivo, não houve diferença significativa entre as amostras, que em geral apresentaram pH inicial

próximo de 5,70 e pH final variando de 4,23 a 4,38. Esta acidificação está relacionada ao aumento de biomassa de culturas lácticas (GHOSH *et al.*, 2007).

Com base nos resultados obtidos para produção do inóculo, a condição escolhida para prosseguimento nos testes foi a com agitação de 120 rpm com caldo MRS enriquecido com 0,3% de extrato de levedura (m/v). Isto porque, além da maior contagem de biomassa ($1,01 \cdot 10^{12}$ UFC/mL), facilita o processo de escalonamento em caso industrial, principalmente em relação à homogeneização do meio de cultivo.

Entretanto, é interessante salientar que o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi capaz de se desenvolver em todas as condições estudadas, sendo que a biomassa obtida a 50 rpm foi intermediária entre a condição cultivo estático e a de maior agitação.

4.5. TESTES DE ROMPIMENTO CELULAR PARA RECUPERAÇÃO DA ENZIMA α -Gal PRODUZIDA POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA

O processo de rompimento celular para a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 seguiu o descrito no item 3.4.4, a fim de verificar se havia também produção intracelular de α -Gal. Foram realizados testes de sonicação e rompimento em “*French Press*”.

Para o teste de sonicação, foi utilizado meio fermentado obtido da fermentação em vinhaça pura após 24 h, com atividade extracelular inicial de $4,18 \pm 0,25$ U/mL. A amostragem foi feita a cada 5 min de procedimento. Entretanto, não houve liberação significativa de enzima α -Gal nos tempos estudados, sendo que acima de 15 min houve superaquecimento da amostra, impedindo procedimento em maior tempo.

Como modo de rompimento celular alternativo, também com meio fermentado de vinhaça de soja pura, foi testado o equipamento *French Press* aplicando-se diferentes condições de pressão do equipamento. Do mesmo modo que para o processo de sonicação, não houve liberação da enzima intracelular.

Deste modo, optou-se somente por trabalhar com a enzima extracelular produzida por *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 a partir da fermentação em meio à base de resíduo industrial de soja.

4.6 PRODUÇÃO DE α -Gal A PARTIR DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM MEIO SINTÉTICO

Os estudos de otimização das condições da produção da enzima α -Gal foram iniciados com testes em meio MRS modificado, conforme relatado por Yoon e Hwang (2008), como forma de comparação. Tal fato viria provavelmente facilitar a recuperação e purificação da enzima em questão, especialmente para fins terapêuticos.

4.6.1 Seleção de fontes de carbono suplementares da produção de α -Gal em meio sintético (MRSm)

Ensaio de otimização foram realizados conforme descrito na metodologia no item 3.4.5.1, sendo estudados os meios MRSm (controle) e MRSm adicionado de 1% (m/v) dos seguintes carboidratos: dextrose, lactose, maltose, melibiose e rafinose, após 24h de fermentação.

Na TABELA 29 e FIGURA 31, pode-se perceber que o maior valor para produção enzimática ocorreu para o meio controle de MRSm puro ($0,3157 \pm 0,0126$ U/mL), enquanto que o menor valor foi para adição de dextrose ($0,1010 \pm 0,0001$ U/mL). Tal fato demonstra que o meio MRSm possui a concentração necessária de carbono para o crescimento e produção da enzima. Contudo, a cepa não secreta a proteína de interesse em quantidades expressivas nestas condições.

A maior acidificação foi resultante do uso de lactose como fonte suplementar de carbono. Sugere-se que a mesma foi utilizada preferencialmente para a produção de ácido láctico em detrimento da produção de enzima.

TABELA 29 - ATIVIDADE DE α -Gal (U/ML) E PH EM MEIO MRSm SUPLEMENTADO COM FONTES DE CARBONO E FERMENTADO POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23.

	Atividade enzimática (U/mL)	pH inicial	pH final
Controle	$0,3157 \pm 0,0126$	$5,23 \pm 0,00$	$4,63 \pm 0,00$
Dextrose	$0,1010 \pm 0,0001$	$5,20 \pm 0,00$	$4,04 \pm 0,02$
Lactose	$0,1894 \pm 0,0379$	$5,26 \pm 0,00$	$3,99 \pm 0,01$
Maltose	$0,2020 \pm 0,0458$	$5,30 \pm 0,00$	$4,03 \pm 0,01$
Melibiose	$0,1641 \pm 0,0379$	$5,21 \pm 0,00$	$4,07 \pm 0,01$
Rafinose	$0,1768 \pm 0,0253$	$5,29 \pm 0,00$	$4,07 \pm 0,02$

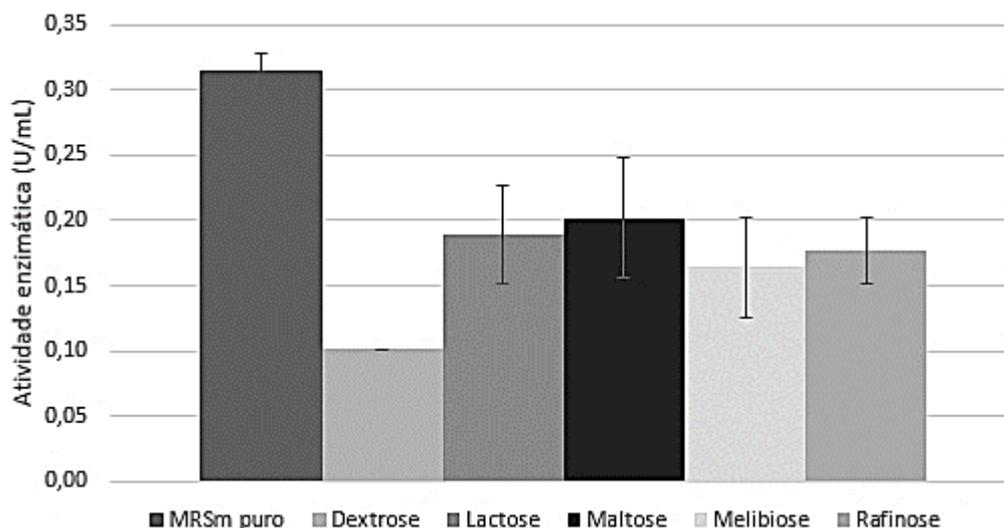


FIGURA 31 – ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 PARA MEIO MRSm SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

Partindo-se do melhor resultado encontrado com o MRSm, a próxima etapa de otimização consistiu na adição de fontes de nitrogênio como indutores de atividade enzimática no meio sintético.

4.6.2 Seleção de fontes de nitrogênio suplementares da produção de α -Gal em meio sintético (MRSm)

Tomando por base a análise com fontes de carbono, elencou-se a melhor condição de produção enzimática (caldo MRSm puro, com valor de 0,3157 U/mL) a fim de testar o aumento de atividade enzimática pela adição das seguintes fontes de nitrogênio, conforme item 3.4.5.2: extrato de carne, extrato de levedura, peptona, ureia e sulfato de amônio, tendo sido a quantidade de cada reagente determinada com base no teor de nitrogênio presente na adição de 0,3% (m/v) de extrato de levedura como referência.

Foram realizadas as análises de atividade enzimática (TABELA 30 e FIGURA 32) e de pH para os meios testados após 24h de fermentação. O melhor resultado foi para MRSm adicionado de ureia ($0,3535 \pm 0,0458$ U/mL), seguido do meio MRSm contendo extrato de carne ($0,2146 \pm 0,0484$ U/mL). A menor atividade enzimática ocorreu na adição de sulfato de amônio ($0,0884 \pm 0,0126$ U/mL). Os valores de pH após 24h variaram de 4,04 a 4,08.

TABELA 30 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE α -Gal (U/mL) E DE PH PARA *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM MEIO MRSm SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

	Atividade enzimática (U/mL)	pH inicial	pH final
Extrato de levedura	0,1768 \pm 0,0258	4,82 \pm 0,00	4,06 \pm 0,00
Extrato de carne	0,2146 \pm 0,0484	4,84 \pm 0,00	4,07 \pm 0,01
Peptona	0,1136 \pm 0,0379	4,85 \pm 0,00	4,06 \pm 0,00
Ureia	0,3535 \pm 0,0458	4,88 \pm 0,00	4,08 \pm 0,00
Sulfato de amônio	0,0884 \pm 0,0126	4,86 \pm 0,00	4,04 \pm 0,01

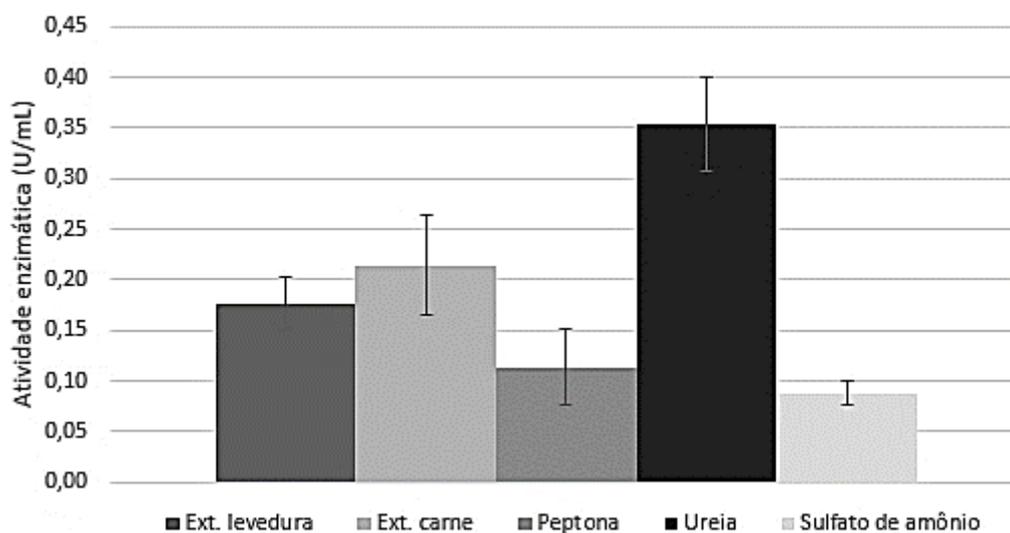


FIGURA 32 - ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 PARA MEIO MRSm CONTENDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

Os resultados obtidos indicam que a adição de ureia aumentou a produção enzimática por *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 em aproximadamente 12% quando comparado ao meio sintético MRSm puro. Isto se deve provavelmente ao fato da relação C/N nesta condição ter sido favorável ao crescimento e à concomitante produção da enzima. A ureia foi selecionada como fonte de nitrogênio para as próximas etapas de estudo.

4.6.3 Estudo da influência de diferentes sais sobre a atividade de α -Gal em meio sintético (MRSm)

O teste de produção enzimática de α -Gal a partir de *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 ocorreu conforme descrito no item 3.4.5.3, em que

meio sintético foi adicionado de diferentes sais, conforme Planejamento Fatorial Fracionado 2⁷⁻⁴. Os experimentos foram realizados em incubadora do tipo *shaker* com 120 rpm de rotação a 30°C de temperatura.

Onze ensaios foram aplicados, sendo obtidos os valores de atividade enzimática em U/mL (TABELA 31 e FIGURA 33). O melhor resultado para α-Gal foi resultante do ensaio 2, com 0,9596 ± 0,0505 U/mL, no qual o meio de cultivo sintético MRSm continha ureia (0,08% m/v), 0,15% (m/v) de FeSO₄.7H₂O, 0,15% (m/v) de ZnSO₄.7H₂O e 0,15% (m/v) de MnSO₄.H₂O.

TABELA 31 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (%) SOBRE A ATIVIDADE DE α-GAL DE *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES* INRA 23 EM MRSm POR PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2⁷⁻⁴.

Ensaio	FeSO ₄ .7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ .H ₂ O	NaH ₂ .PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O	α-Gal (U/mL)
1	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200	0,150	0,000	0,3788 ± 0,0253
2	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,150	0,9596 ± 0,0505
3	0,000	0,200	0,000	0,000	0,200	0,000	0,150	0,4040 ± 0,0505
4	0,150	0,200	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,9091 ± 0,0303
5	0,000	0,000	0,200	0,200	0,000	0,000	0,150	0,7071 ± 0,0001
6	0,150	0,000	0,200	0,000	0,200	0,000	0,000	0,4040 ± 0,0253
7	0,000	0,200	0,200	0,000	0,000	0,150	0,000	0,3535 ± 0,0000
8	0,150	0,200	0,200	0,200	0,200	0,150	0,150	0,3283 ± 0,0253
9 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075	0,7071 ± 0,0505
10 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075	0,7323 ± 0,0126
11 (C)	0,075	0,100	0,100	0,100	0,100	0,075	0,075	0,7195 ± 0,0758

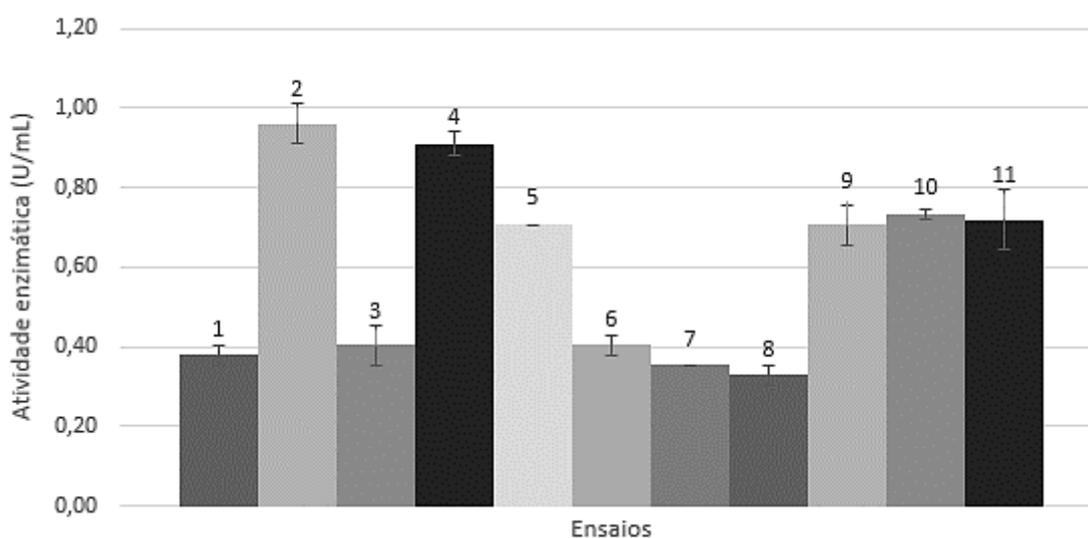


FIGURA 33 - ATIVIDADE DE α-Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES* INRA 23 EM MRSm CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).

O pH dos ensaios variou de 4,67 a 4,92, indicando que a produção de ácidos durante o processo não foi significativa em função da adição de sais.

Sobre as análises estatísticas, foi usado o *software* STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.), sendo gerados a tabela de análise de variância – ANOVA (TABELA 32) e gráfico de Pareto. O valor do coeficiente de correlação (R^2) foi de aproximadamente 0,89, ou seja, 89% dos valores estão ajustados. Somente o sal $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ foi significativo para a produção enzimática, com valor p inferior a 0,05 (0,0377). Os demais sais não apresentaram efeito sobre a atividade de α -Gal.

TABELA 32 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	0,071745	1	0,071745	3,64437	0,152272
(2) KH_2PO_4 (%)	0,025833	1	0,025833	1,31220	0,335094
(3) $CaCl_2 \cdot H_2O$ (%)	0,092149	1	0,092149	4,68084	0,119179
(4) $NaH_2 \cdot PO_4$ (%)	0,005111	1	0,005111	0,25960	0,645509
(5) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	0,249995	1	0,249995	12,69884	0,037725
(6) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	0,020402	1	0,020402	1,03635	0,383622
(7) $MnSO_4 \cdot H_2O$ (%)	0,015629	1	0,015629	0,79390	0,438565
Error	0,059059	3	0,019686		
Total SS	0,539923	10			

Já os coeficientes de regressão constam na TABELA 33.

TABELA 33 – COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).

Fator	Reg. Coeff.	Std. Err.	t (3)	p	-95 % Cnf. Limt	+95 % Cnf. Limt
Mean/Interc.	0,82755	0,137896	6,00126	0,00927	0,38870	1,266397
(1) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	1,26267	0,661420	1,90902	0,15227	-0,84227	3,367601
(2) KH_2PO_4 (%)	-0,56825	0,496065	-1,14551	0,33509	-2,14695	1,010451
(3) $CaCl_2 \cdot H_2O$ (%)	-1,07325	0,496065	-2,16353	0,11918	-2,65195	0,505451
(4) $NaH_2 \cdot PO_4$ (%)	0,25275	0,496065	0,50951	0,64551	-1,32595	1,831451
(5) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	-1,76775	0,496065	-3,56354	0,03773	-3,34645	-0,189049
(6) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	-0,67333	0,661420	-1,01801	0,38362	-2,77827	1,431601
(7) $MnSO_4 \cdot H_2O$ (%)	0,58933	0,661420	0,89101	0,43857	-1,51560	2,694268

Pelos dados obtidos, nota-se que houve diferença significativa somente para o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Conforme gráfico de Pareto (FIGURA 34) o valor negativo indica que o sal deveria ser retirado do meio de cultivo para promover melhor condição de produção enzimática.

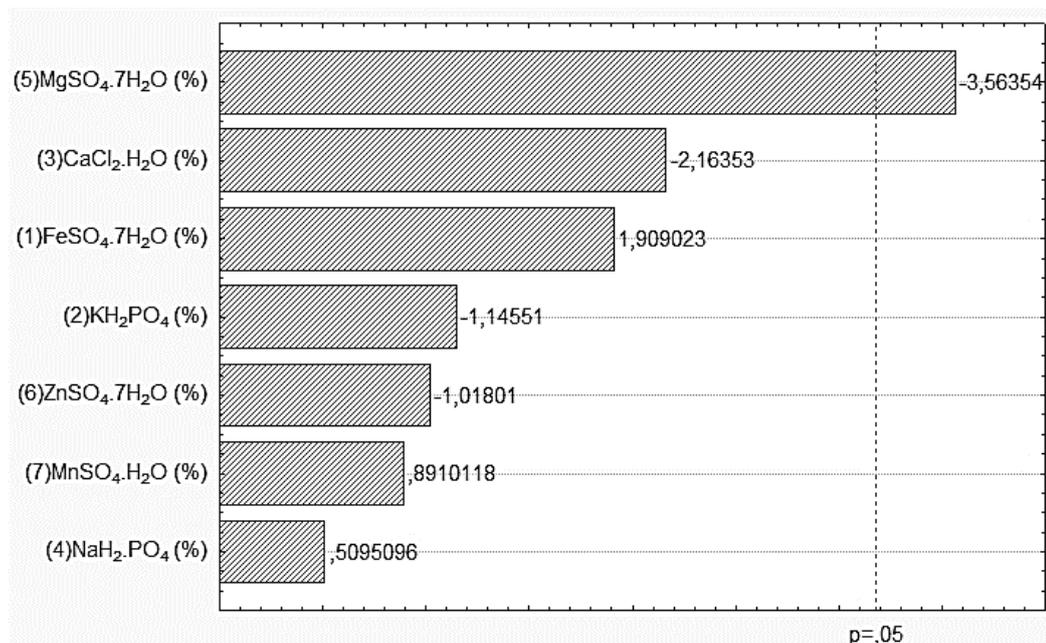


FIGURA 34 - GRÁFICO DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ PARA DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO CONTENDO SAIS E ADICIONADOS DE UREIA (0,08% M/V).

Após o estudo da influência de sais sobre a atividade enzimática, deve-se considerar que houve aumento da produção quando comparado ao meio sintético MRSm ($0,3157 \pm 0,0126$ U/mL) e caldo MRSm adicionado de ureia como fonte de nitrogênio ($0,3535 \pm 0,0458$ U/mL), chegando ao valor de $0,9596 \pm 0,0505$ U/mL. Por isto, julgou-se necessário mais testes de otimização, considerando maior faixa de estudo para adição de rafinose (na constituição do caldo MRSm) e ureia a fim de verificar qual a concentração ideal de cada componente no meio de cultivo. Julgou-se igualmente necessário aplicar ensaios com diferentes níveis de adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, que apesar de ter sido indicada por análise estatística sua retirada do meio de cultivo, sabe-se que é um grande indutor de α -Gal (ANISHA, SUKURUMARAN e PREMA, 2008).

4.6.4 Otimização da composição do meio de produção de α -Gal – Estudo da concentração de sais, fontes de carbono e nitrogênio

O estudo da adição de sais e fontes de carbono e nitrogênio em diferentes concentrações para produção de α -Gal consistiu em aplicar planejamento Fatorial

Fracionado 2³⁻¹, com 3 pontos centrais e 1 variável de resposta (atividade enzimática de α -Gal em U/mL), conforme descrito no item 3.4.5.4 de “Material e Métodos”.

Os experimentos contendo sais seguiram com adição de rafinose de 0 a 10% (m/v) (na composição do caldo MRSm), MgSO₄.7H₂O de 0 a 0,15% (m/v) e ureia de 0 a 0,15% (m/v). O melhor resultado de produção de α -Gal foi de 0,6664 ± 0,0852 U/mL para o meio de cultivo contendo 10,0% (m/v) de rafinose, 0,15% (m/v) de MgSO₄.7H₂O e 0,15% (m/v) de adição de ureia, conforme os dados da TABELA 34 e FIGURA 35.

TABELA 34 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23.

	Rafinose (%)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	Ureia (%)	Atividade α -Gal (U/mL)
1	0,000	0,000	0,000	0,2455 ± 0,0175
2	0,000	0,075	0,150	0,4560 ± 0,0351
3	0,000	0,150	0,075	0,2104 ± 0,0001
4	5,000	0,000	0,150	0,1403 ± 0,0401
5	5,000	0,075	0,075	0,4209 ± 0,0000
6	5,000	0,150	0,000	0,3507 ± 0,0401
7	10,000	0,000	0,075	0,2455 ± 0,0121
8	10,000	0,075	0,000	0,4910 ± 0,0501
9	10,000	0,150	0,150	0,6664 ± 0,0852
10	5,000	0,075	0,075	0,5261 ± 0,0105
11	5,000	0,075	0,075	0,5963 ± 0,0105
12	5,000	0,075	0,075	0,6313 ± 0,0701

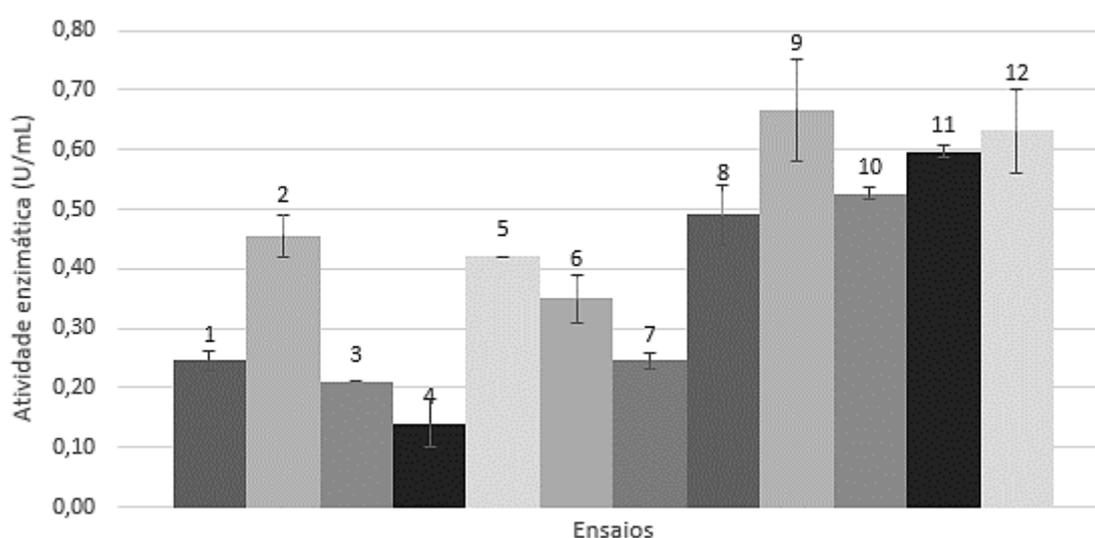


FIGURA 35 - ATIVIDADE DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 RESULTANTE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.

Observou-se queda da atividade enzimática de α -Gal do teste anterior ($0,9596 \pm 0,0505$ U/mL) para a otimização atual ($0,6664 \pm 0,0852$ U/mL), podendo indicar alguma repressão catabólica dos componentes nos níveis estudados para a produção da enzima. Sobre o pH final do meio após a fermentação, este variou de 3,95 para o ensaio 5 até 4,76, para o ensaio 2.

Aplicando-se o *software* STATISTICA 7® - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.) para as análises estatísticas, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,71. Foi gerado o Diagrama de Pareto (FIGURA 36), em que não houve diferença mínima significativa na adição dos reagentes citados em nível de 5% de significância, sendo verificada também a condição de α igual a 10%, em que $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ foi o único fator significativo para a produção enzimática, diferente do observado no tópico anterior (item 4.6.3). É provável que este sal esteja relacionado aos maiores níveis de fontes de carbono e nitrogênio testados para a atividade de α -Gal, sendo um indutor de produção. Tal indução já havia sido relatada por Anisha, Sukurumaran e Prema (2008).

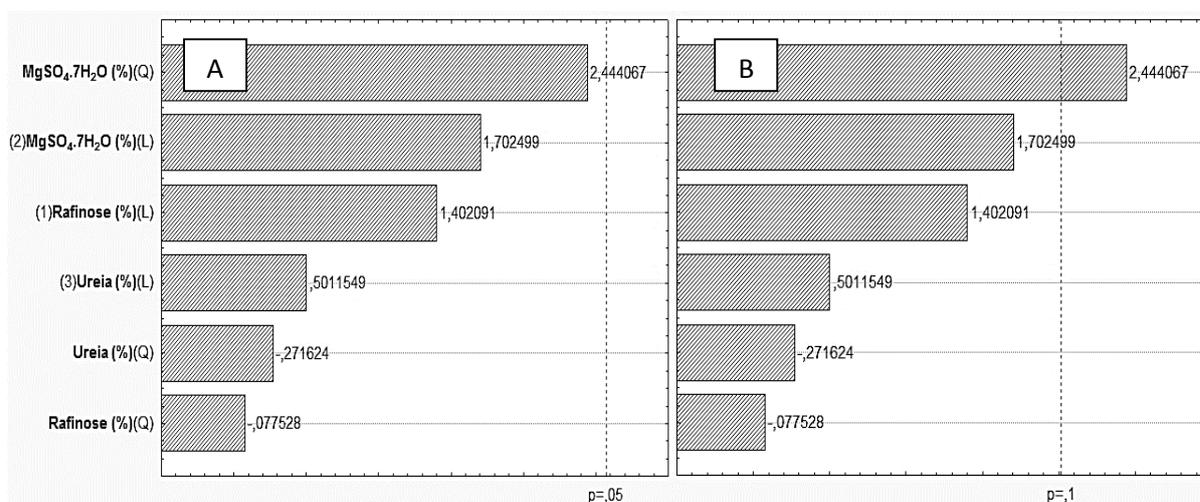


FIGURA 36 - GRÁFICOS DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ (A) E $\alpha = 10\%$ (B) PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.

Também foi gerada a Análise de variância ANOVA (TABELA 35) para erro de 10%, em que se observou diferença estatística do sal $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%) em sua interação quadrática.

TABELA 35 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Rafinose %(L)	0,040180	1	0,040180	1,965860	0,219816
Rafinose %(Q)	0,000123	1	0,000123	0,006011	0,941210
(2)MgSO ₄ .7H ₂ O %(L)	0,059242	1	0,059242	2,898502	0,149395
MgSO ₄ .7H ₂ O %(Q)	0,122091	1	0,122091	5,973463	0,058361
(3)Ureia %(L)	0,005133	1	0,005133	0,251156	0,637542
Ureia %(Q)	0,001508	1	0,001508	0,073780	0,796769
Error	0,102195	5	0,020439		
Total SS	0,341609	11			

Já os coeficientes de regressão, também para nível de significância de 10% constam na TABELA 36.

TABELA 36 – COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO MRSm.

Fator	Reg. Coeff.	Std. Err.	t (3)	p	-90 % Cnf. Limt	+90 % Cnf. Limt
Mean/Interc.	0,1099	0,12243	0,89745	0,410605	-0,1368	0,35657
(1) Rafinose %(L)	0,0136	0,03800	0,35687	0,735757	-0,0630	0,09014
Rafinose %(Q)	0,0003	0,00362	0,07753	0,941210	-0,0070	0,00757
(2) MgSO ₄ .7H ₂ O %(L)	7,2180	2,53364	2,84884	0,035872	2,1125	12,32337
MgSO ₄ .7H ₂ O %(Q)	-39,287	16,07448	-2,44407	0,058361	-71,6780	-6,89625
(3) Ureia %(L)	-0,2649	2,53364	-0,10457	0,920785	-5,3703	4,84048
Ureia %(Q)	4,3662	16,07448	0,27162	0,796769	-28,0246	36,75708
	0,1099	0,12243	0,89745	0,410605	-0,1368	0,35657

A superfície de resposta (FIGURA 37) indica que a adição de MgSO₄.7H₂O é benéfica para a produção enzimática quando na faixa de 0,08 a 0,10% (m/v), juntamente da suplementação de ureia no meio de cultivo.

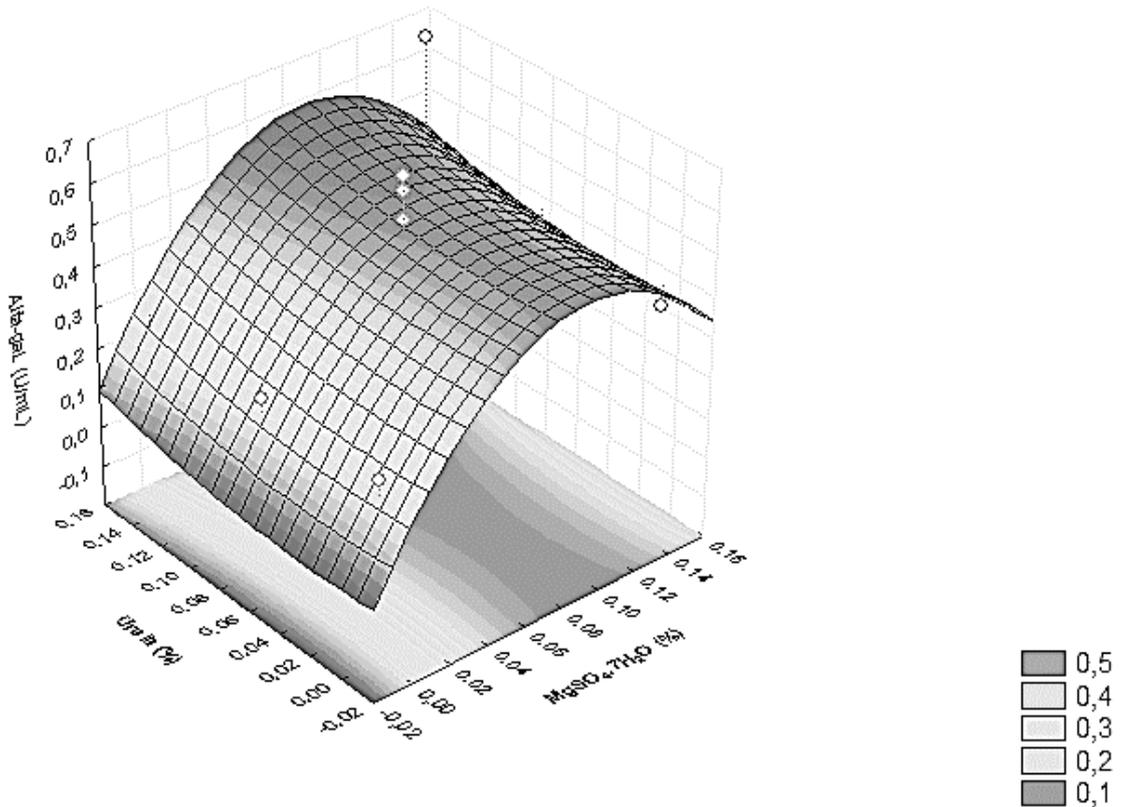


FIGURA 37 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADIÇÃO DE UREIA E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ EM MRSm PARA PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES* INRA 23.

A produção da enzima α -Gal com base na concentração de ureia e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pode ser obtida através do modelo:

$$z = 0,1847 + 7,2180 \cdot A - 39,2871 \cdot A^2 - 0,2649 \cdot B + 4,3662 \cdot B^2 \quad (4)$$

Em que Z é a α -Gal (U/mL), A é a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em % (m/v) e B é a porcentagem de ureia (m/v).

Também foi gerada a superfície de resposta da FIGURA 38, em que podemos perceber a influência da adição de rafinose na atividade de α -Gal, em que o aumento do oligossacarídeo e a adição de 0,08 a 0,10% (m/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ estimulam a produção enzimática.

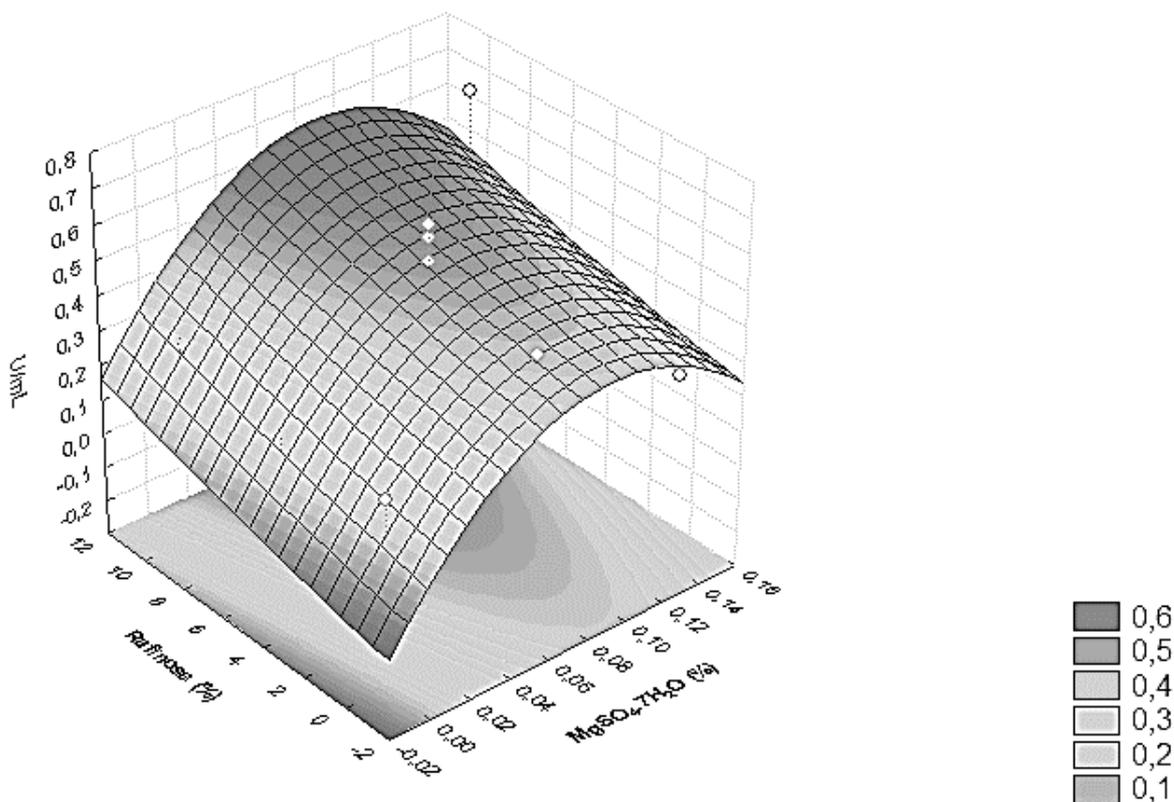


FIGURA 38 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADIÇÃO DE RAFINOSE E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ EM MRSm PARA A PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23.

A superfície de resposta acima apresentada é descrita pelo modelo:

$$z = 0,1146 + 7,2180.A - 39,2871.A^2 - 0,0136.C + 0,0003.C^2 \quad (5)$$

Em que Z é a α -Gal (U/mL), A é a concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em % (m/v) e C é a porcentagem de rafinose (m/v).

A partir dos resultados obtidos pelo planejamento utilizando caldo MRSm como meio sintético, conclui-se que a melhor composição de meio para a produção da enzima estudada foi: 10,0% (m/v) de rafinose, 0,15% (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,15% (m/v) de ureia, a 30°C e com 120 rpm de agitação, resultando em atividade enzimática de $0,67 \pm 0,09$ U/mL.

Contudo, os resultados de produção de α -Gal extracelular em MRSm continuaram a não ser satisfatórios quando comparado ao descrito em literatura, tais como para *Leuconostoc mesenteroides* JK55 (5,47 U/mL) (YOON e HWANG, 2008) e para *Lactobacillus agilis* LPB 56 (SANADA, 2009). Isto levou à continuação dos estudos em meio alternativo vinhaça de soja.

4.7 PRODUÇÃO DE α -Gal A PARTIR DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA

A produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 foi testada em meio sintético (caldo MRSm), conforme citado no item anterior, e também para a vinhaça de soja, que é um resíduo industrial com composição rica em oligossacarídeos essenciais para a produção da α -Gal. Deste modo, foram feitos estudos de suplementação e otimização a fim de verificar incremento na atividade enzimática.

4.7.1 Seleção de fontes de nitrogênio sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja

O estudo da adição de fontes de nitrogênio a vinhaça de soja seguiu a metodologia descrita no item 3.4.6.1. Foram estudadas as condições de vinhaça de soja pura (controle) e vinhaça de soja adicionada de extrato de carne, extrato de levedura, peptona, ureia e sulfato de amônio.

A quantidade de cada reagente foi determinada com base no teor de nitrogênio presente na adição de 0,3% (m/v) de extrato de levedura como referência.

Foram realizadas as análises de atividade enzimática (U/mL) e de pH para os meios testados após 24h de fermentação, sendo os resultados expostos na TABELA 37 e FIGURA 39. O melhor resultado foi para a vinhaça de soja pura ($4,4485 \pm 0,0505$), seguida do meio contendo peptona bacteriológica ($4,0909 \pm 0,3535$ U/mL). A menor atividade enzimática ocorreu na adição de ureia ($3,3586 \pm 0,4798$ U/mL). Dos valores de pH, a vinhaça de soja pura apresentou maior efeito tamponante ($4,83 \pm 0,02$), enquanto que a peptona bacteriológica e o sulfato de amônio foram os meios de cultivo com maior acidificação, de $4,66 \pm 0,00$ e $4,66 \pm 0,01$, respectivamente.

TABELA 37 - ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) E PH PARA *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

	Atividade enzimática (U/mL)	pH final
Vinhaça de soja pura	$4,4485 \pm 0,0505$	$4,83 \pm 0,02$
Extrato de levedura	$2,7273 \pm 0,5051$	$4,78 \pm 0,01$
Extrato de carne	$3,8889 \pm 0,1515$	$4,70 \pm 0,02$
Peptona	$4,0909 \pm 0,3535$	$4,66 \pm 0,00$
Ureia	$3,3586 \pm 0,4798$	$4,69 \pm 0,00$
Sulfato de amônio	$3,5859 \pm 0,4586$	$4,66 \pm 0,01$

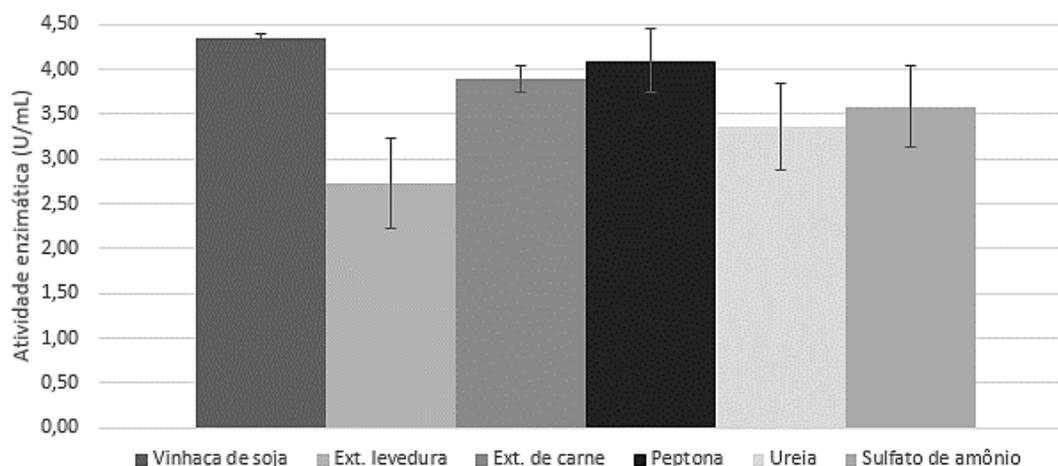


FIGURA 39 - ATIVIDADE DE α -Gal PARA *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

Os resultados obtidos indicam que não é necessária a adição de fonte de nitrogênio para que ocorra aumento da atividade enzimática por parte da fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23.

4.7.2 Seleção de fontes de carbono suplementares sobre a atividade de α -Gal em vinhaça de soja

O estudo de seleção de fontes de carbono para a produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja seguiu a metodologia descrita no item 3.4.6.2. Neste caso, foram adicionados ao meio de cultivo os seguintes açúcares na condição de 1% (m/v): dextrose, maltose, melibiose, lactose e rafinose. O controle foi realizado com a vinhaça de soja sem suplementação de carboidratos.

A TABELA 38 apresenta os resultados da atividade enzimática em U/mL e de pH. A maior atividade de α -Gal foi obtida com a adição de rafinose ($5,9596 \pm 0,3030$ U/mL), seguida de maltose ($4,7475 \pm 0,6061$ U/mL) e da vinhaça de soja pura ($4,2929 \pm 0,3566$ U/mL). Em relação ao controle, a rafinose resultou em aumento de aproximadamente 39% de α -Gal, comprovando que este oligossacarídeo é um indutor de produção para a enzima em questão.

A FIGURA 40 apresenta de forma gráfica os valores de atividade enzimática da TABELA 38.

TABELA 38 - ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

Indutores	Atividade enzimática (U/mL)	pH final
Controle	4,2929 \pm 0,3566	4,75 \pm 0,01
Dextrose	2,5253 \pm 0,4040	4,32 \pm 0,01
Lactose	3,8384 \pm 0,4040	4,55 \pm 0,00
Maltose	4,7475 \pm 0,6061	4,37 \pm 0,01
Melibiose	3,1061 \pm 0,6313	4,53 \pm 0,01
Rafinose	5,9596 \pm 0,3030	4,70 \pm 0,00

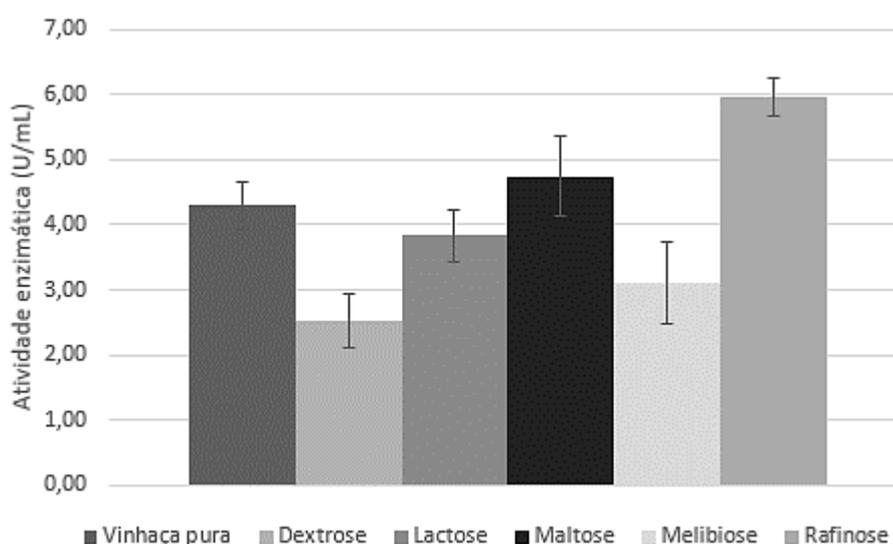


FIGURA 40 - ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA SUPLEMENTADA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

Estes resultados de produção enzimática foram superiores aos citados em literatura, como por exemplo para *Lactobacillus fermenti* NRRL B-585 (1,1 U/mL) (MUDGETT e MAHONEY, 1985) e *Lactobacillus fermentum* CRL 722 (5,0 U/mL) (LE BLANC *et al.*, 2005). Também foi superior ao *Leuconostoc mesenteroides* JK55 (5,47 U/mL), estudado por Yoon e Hwang (2008), que foi uma das referências para a seleção de novas linhagens do presente trabalho.

Em relação ao pH, a vinhaça de soja pura (4,75 \pm 0,01) apresentou maior efeito tamponante, além da vinhaça de soja contendo 1% (m/v) de rafinose (4,70 \pm 0,00). O que promoveu a maior produção de ácido foi vinhaça de soja adicionada de 1% (m/v) de dextrose (4,32 \pm 0,01).

Partindo-se da melhor condição encontrada (1% (m/v) de rafinose), foram testadas mais condições (adição de sais, interações entre concentrações de fontes de

carbono e nitrogênio) a fim de verificar o incremento na produção enzimática de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23.

4.7.3 Otimização das concentrações de sais sobre a α -Gal em vinhaça de soja

O teste de produção enzimática de α -Gal a partir de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 ocorreu conforme descrito no item 3.4.6.3 do tópico “Material e Métodos”, no qual meio contendo vinhaça de soja suplementada somente com 1% (m/v) de rafinose foi submetida ao planejamento experimental do Fatorial Fracionado 2^{7-4} , contendo 7 variáveis independentes (7 sais), 1 variável de resposta (atividade enzimática em U/mL), adicionados de 3 pontos centrais. A temperatura do *shaker* variou até 2,8°C acima da temperatura ótima.

Com os 11 ensaios aplicados, foram obtidos os valores de atividade α -Gal em U/mL (TABELA 39 e FIGURA 41), sendo que o melhor resultado foi resultante do ensaio 3, de $6,41 \pm 0,16$ U/mL, com meio de cultivo contendo 1% (m/v) de rafinose, 0,05% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15% de KH_2PO_4 , 0,10% de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,10% de NaH_2PO_4 , 0,20% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,15% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, incubado em *shaker* com 120 rpm de rotação e a 30°C.

TABELA 39 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (% M/V) SOBRE A α -Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{7-4} .

Ensaio	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	NaH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	α -Gal (U/mL)
1	0,05	0,05	0,10	0,20	0,20	0,15	0,05	$3,6869 \pm 0,8586$
2	0,15	0,05	0,10	0,10	0,10	0,15	0,15	$1,9697 \pm 0,2525$
3	0,05	0,15	0,10	0,10	0,20	0,05	0,15	$6,4141 \pm 0,1616$
4	0,15	0,15	0,10	0,20	0,10	0,05	0,05	$2,3232 \pm 0,1010$
5	0,05	0,05	0,20	0,20	0,10	0,05	0,15	$2,6768 \pm 0,5556$
6	0,15	0,05	0,20	0,10	0,20	0,05	0,05	$3,1313 \pm 0,8182$
7	0,05	0,15	0,20	0,10	0,10	0,15	0,05	$2,4242 \pm 0,1010$
8	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	$3,5354 \pm 0,9091$
9 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	$4,1919 \pm 0,8586$
10 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	$3,3838 \pm 0,1515$
11 (C)	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	$2,2222 \pm 0,5051$

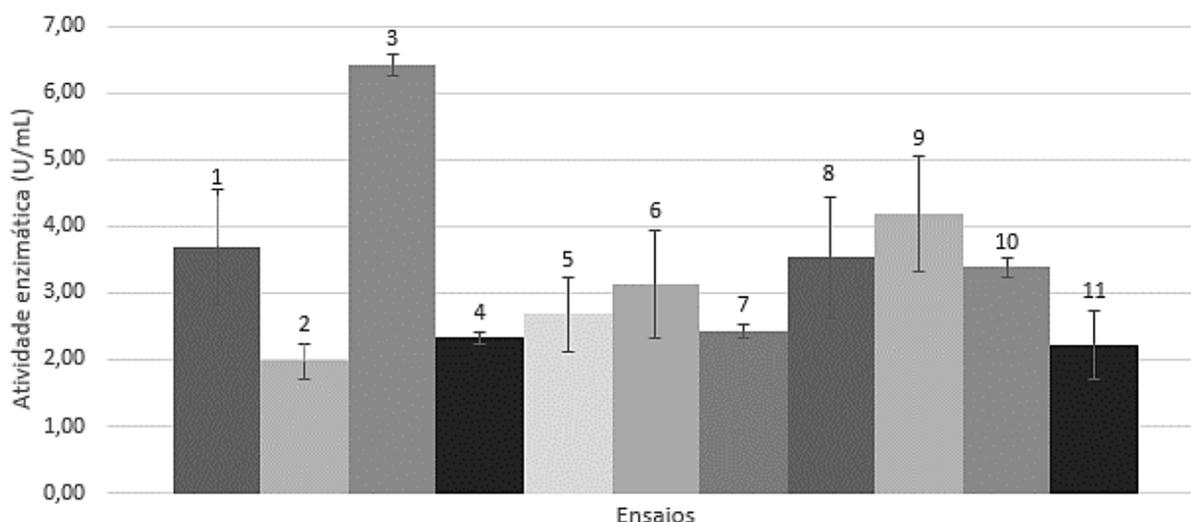


FIGURA 41 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SAIS (%) SOBRE A α -Gal (U/mL) PARA *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2⁷⁻⁴.

Em relação ao pH, o que apresentou maior efeito tamponante foi o meio de cultivo de número 1, contendo 0,05% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de KH_2PO_4 , 0,10 % de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,20% de NaH_2PO_4 , 0,20% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Para as análises estatísticas, foi usado o *software* STATISTICA 7[®] - Versão Trial (StatSoft, Inc.), sendo gerados a tabela de análise de variância – ANOVA (TABELA 40) e gráfico de Pareto. O coeficiente de correlação (R^2) de aproximadamente 0,88, ou seja, 88% dos valores estão ajustados, com valor mínimo recomendado de 70%.

TABELA 40 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA DIFERENTES ENSAIOS DE VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.

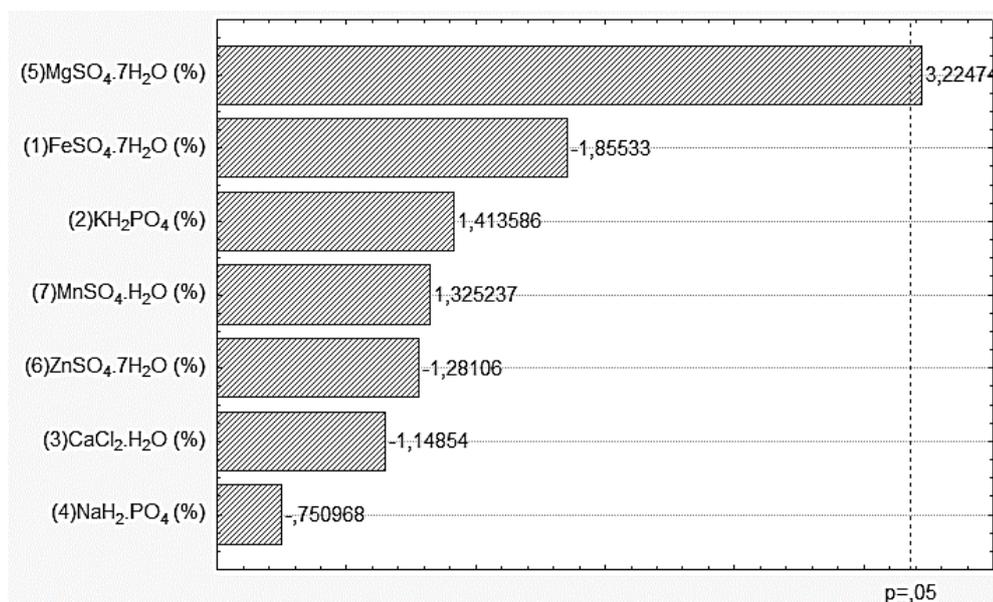
Fator	SS	df	MS	F	p
(1) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	2,24977	1	2,249770	3,44226	0,160572
(2) KH_2PO_4 (%)	1,30599	1	1,305989	1,99823	0,252382
(3) $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (%)	0,86216	1	0,862157	1,31914	0,334020
(4) NaH_2PO_4 (%)	0,36858	1	0,368585	0,56395	0,507210
(5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	6,79650	1	6,796500	10,39897	0,048409
(6) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	1,07259	1	1,072595	1,64112	0,290224
(7) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (%)	1,14784	1	1,147842	1,75625	0,276982
Error	1,96072	3	0,653574		
Total SS	15,76416	10			

Os coeficientes de regressão para erro de 5% constam na TABELA 41.

TABELA 41 – COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA DIFERENTES ENSAIOS DE VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.

Fator	Reg. Coeff.	Std. Err.	t (3)	P	-95 % Cnf. Limt	+95 % Cnf. Limt
Mean/Interc.	2,3600	1,890073	1,24861	0,300372	-3,6551	8,37502
(1) FeSO ₄ .7H ₂ O (%)	-10,6061	5,716530	-1,85533	0,160572	-28,7986	7,58649
(2) KH ₂ PO ₄ (%)	8,0808	5,716530	1,41359	0,252382	-10,1117	26,27336
(3) CaCl ₂ .H ₂ O (%)	-6,5657	5,716530	-1,14854	0,334020	-24,7582	11,62689
(4) NaH ₂ .PO ₄ (%)	-4,2929	5,716530	-0,75097	0,507210	-22,4855	13,89962
(5) MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	18,4343	5,716530	3,22474	0,048409	0,2418	36,62689
(6) ZnSO ₄ .7H ₂ O (%)	-7,3232	5,716530	-1,28106	0,290224	-25,5158	10,86932
(7) MnSO ₄ .H ₂ O (%)	7,5758	5,716530	1,32524	0,276982	-10,6168	25,76831

O diagrama de Pareto (FIGURA 42) também indica que somente o sal MgSO₄.7H₂O sal apresentou efeito significativo sobre a produção da enzima.

FIGURA 42 - DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE α -GAL DE *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA CONTENDO SAIS.

Apesar da tendência do aumento de produção enzimática via suplementação dos meios de cultivo com KH₂PO₄ e com MnSO₄.H₂O, o resultado da análise de variância indicou que somente o sal MgSO₄.7H₂O foi significativo em nível de 5%, comprovando seu efeito indutor relatado por Anisha, Sukurumaran e Prema (2008). Na sequência, as concentrações dos componentes e suas interações com os outros fatores (como concentração de rafinose e da fonte de nitrogênio) foram estudadas a fim de verificar incremento na produção de α -Gal.

4.7.4 Otimização da composição do meio de produção de α -Gal em vinhaça de soja – Estudo da concentração de sais, fontes de carbono e nitrogênio

O estudo da adição de sais e fontes de carbono e nitrogênio em diferentes concentrações consistiu em aplicar Planejamento Experimental do tipo Fatorial Fracionado 2^{3-1} , com 3 pontos centrais e 1 variável de resposta (atividade enzimática em U/mL), conforme apresentado no item 3.4.6.4 de “Material e Métodos”.

Os experimentos contendo sais seguiram conforme a TABELA 42, com a porcentagem adicionada de cada fator. A adição de rafinose foi de 0 a 10% (m/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ de 0 a 0,50% (m/v) e $(NH_4)_2SO_4$ de 0 a 1,5% (m/v).

O melhor resultado para a atividade de α -Gal foi de $7,7778 \pm 0,1011$ U/mL para o meio de cultivo contendo 5,0% (m/v) de rafinose, 0,50% (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e nenhuma adição de $(NH_4)_2SO_4$.

Para os resultados de pH, o que apresentou maior efeito tamponante em relação ao inicial de 4,72 foi para vinhaça de soja pura.

TABELA 42 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23.

	Rafinose (%)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	α -Gal (U/mL)	pH final
1	0,0000	0,0000	0,0000	$6,3131 \pm 0,8687$	$4,72 \pm 0,01$
2	0,0000	0,2500	1,5000	$5,9091 \pm 0,6667$	$4,65 \pm 0,00$
3	0,0000	0,5000	0,7500	$4,4444 \pm 0,2020$	$4,65 \pm 0,00$
4	5,0000	0,0000	1,5000	$1,3636 \pm 0,5556$	$4,53 \pm 0,00$
5	5,0000	0,2500	0,7500	$1,4646 \pm 0,4545$	$4,50 \pm 0,00$
6	5,0000	0,5000	0,0000	$7,7778 \pm 0,1011$	$4,49 \pm 0,02$
7	10,0000	0,0000	0,7500	$1,3636 \pm 0,1515$	$4,46 \pm 0,00$
8	10,0000	0,2500	0,0000	$3,1818 \pm 0,0505$	$4,47 \pm 0,01$
9	10,0000	0,5000	1,5000	$2,5253 \pm 0,9091$	$4,48 \pm 0,00$
10	5,0000	0,2500	0,7500	$4,7980 \pm 0,4545$	$4,51 \pm 0,01$
11	5,0000	0,2500	0,7500	$4,6780 \pm 0,7778$	$4,51 \pm 0,00$
12	5,0000	0,2500	0,7500	$4,7268 \pm 0,5556$	$4,52 \pm 0,00$

Já em relação à atividade de α -Gal, a FIGURA 43 expõe de forma gráfica a produção enzimática, sendo que o ensaio 6 apresentou resultado superior às outras condições estudadas, com valor de $7,78 \pm 0,10$ U/mL. Os ensaios 4 e 7 apresentaram atividade de aproximadamente 1,36 U/mL.

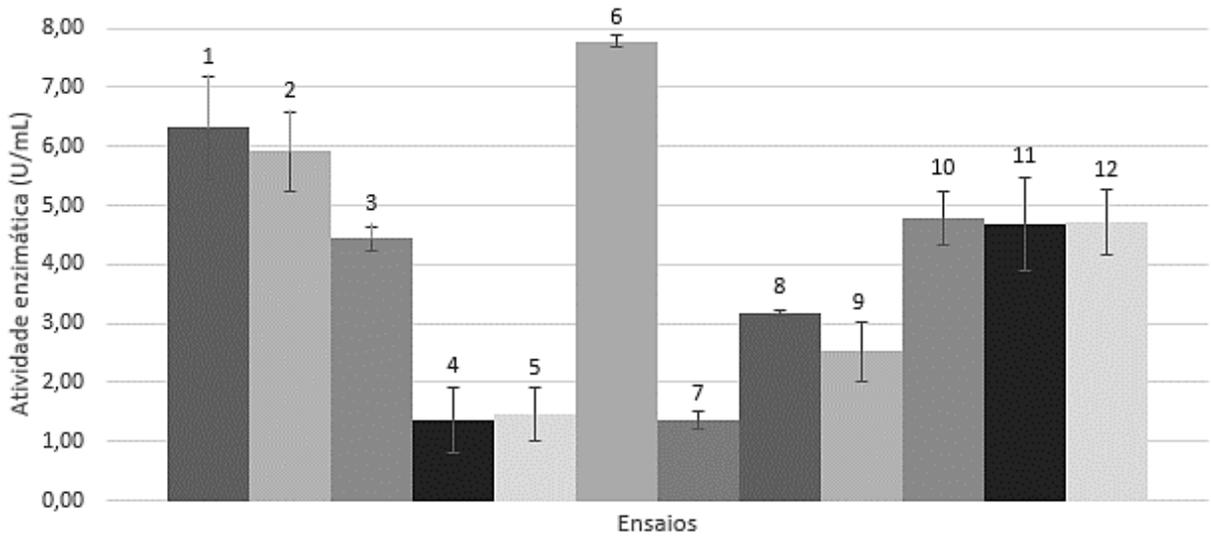


FIGURA 43 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23.

Aplicando-se o *software* STATISTICA 7[®] - Versão *Trial* (StatSoft, Inc.) para as análises estatísticas, foram gerados o Diagrama de Pareto e a tabela de análise de variância – ANOVA, com coeficiente de correlação (R^2) de 0,72.

O Diagrama de Pareto (FIGURA 44) demonstra que não houve diferença significativa na adição dos reagentes citados em nível de 5% de significância, sendo verificada também a condição de α igual a 10%, em que a rafinose foi o único fator que apresentou diferença.

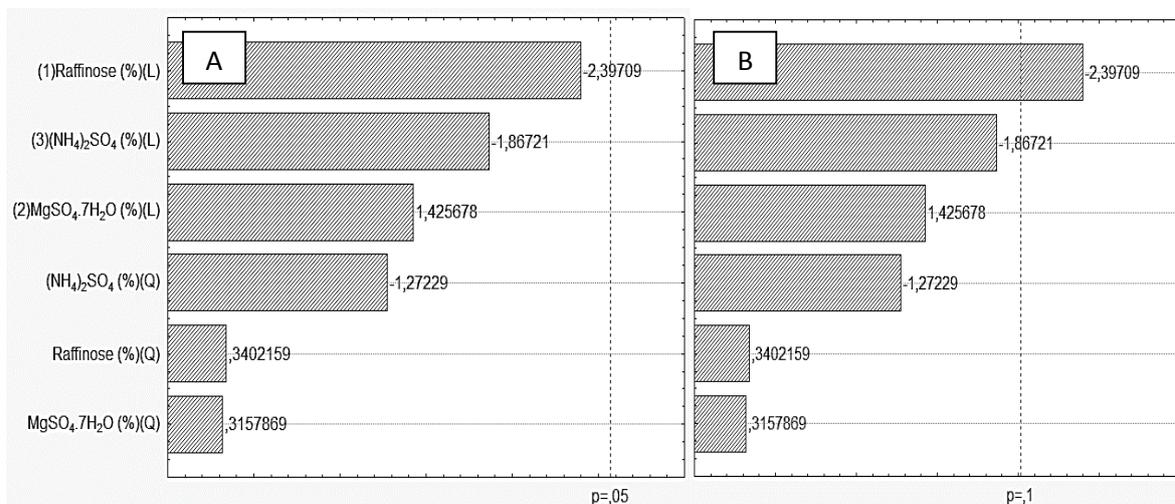


FIGURA 44 - GRÁFICOS DE PARETO COM $\alpha = 5\%$ (A) E $\alpha = 10\%$ (B) PARA COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) POR *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23.

Também foi gerada a Análise de variância ANOVA (TABELA 43) para erro de 10%, em que se observou diferença estatística da rafinose (% m/v) quando adicionada ao meio de cultivo à base de vinhaça de soja.

TABELA 43 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Rafinose (%) (L)	15,34688	1	15,34688	5,746032	0,061843
Rafinose (%) (Q)	0,30914	1	0,30914	0,115747	0,747521
(2) MgSO ₄ .7H ₂ O (%) (L)	5,42869	1	5,42869	2,032557	0,213287
MgSO ₄ .7H ₂ O (%) (Q)	0,26634	1	0,26634	0,099721	0,764920
(3) (NH ₄) ₂ SO ₄ (%) (L)	9,31186	1	9,31186	3,486456	0,120847
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%) (Q)	4,32339	1	4,32339	1,618723	0,259226
Error	13,35433	5	2,67087		
Total SS	47,76663	11			

Já os coeficientes de regressão, também para nível de significância de 10% constam na TABELA 44.

TABELA 44 – COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.

Fator	Reg. Coeff.	Std. Err.	t (3)	p	-90 % Cnf. Limt	+90 % Cnf. Limt
Mean/Interc.	6,17967	1,39951	4,41559	0,006920	3,3596	8,99975
(1) Rafinose (%) (L)	-0,1792	0,43444	-0,41249	0,697071	-1,0546	0,69622
Rafinose (%) (Q)	-0,0141	0,04134	-0,34022	0,747521	-0,0974	0,06924
(2) MgSO ₄ .7H ₂ O (%) (L)	6,41600	8,68887	0,73842	0,493442	-11,0925	23,92450
MgSO ₄ .7H ₂ O (%) (Q)	-5,2224	16,53774	-0,31579	0,764920	-38,5467	28,10194
(3) (NH ₄) ₂ SO ₄ (%) (L)	-5,1678	2,89629	-1,78430	0,134449	-11,0040	0,66832
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%) (Q)	2,33787	1,83753	1,27229	0,259226	-1,3648	6,04057

A superfície de resposta (FIGURA 45) indica que a quantidade de rafinose deve ser diminuída do meio (10% foi excessivo), enquanto que a adição de MgSO₄.7H₂O deve ser intermediária, confirmando as condições do resultado de 7,7778 ± 0,1011 U/mL como sendo a ideal: 5,0% (m/v) de rafinose, 0,50% (m/v) de MgSO₄.7H₂O e nenhuma adição de fonte de nitrogênio.

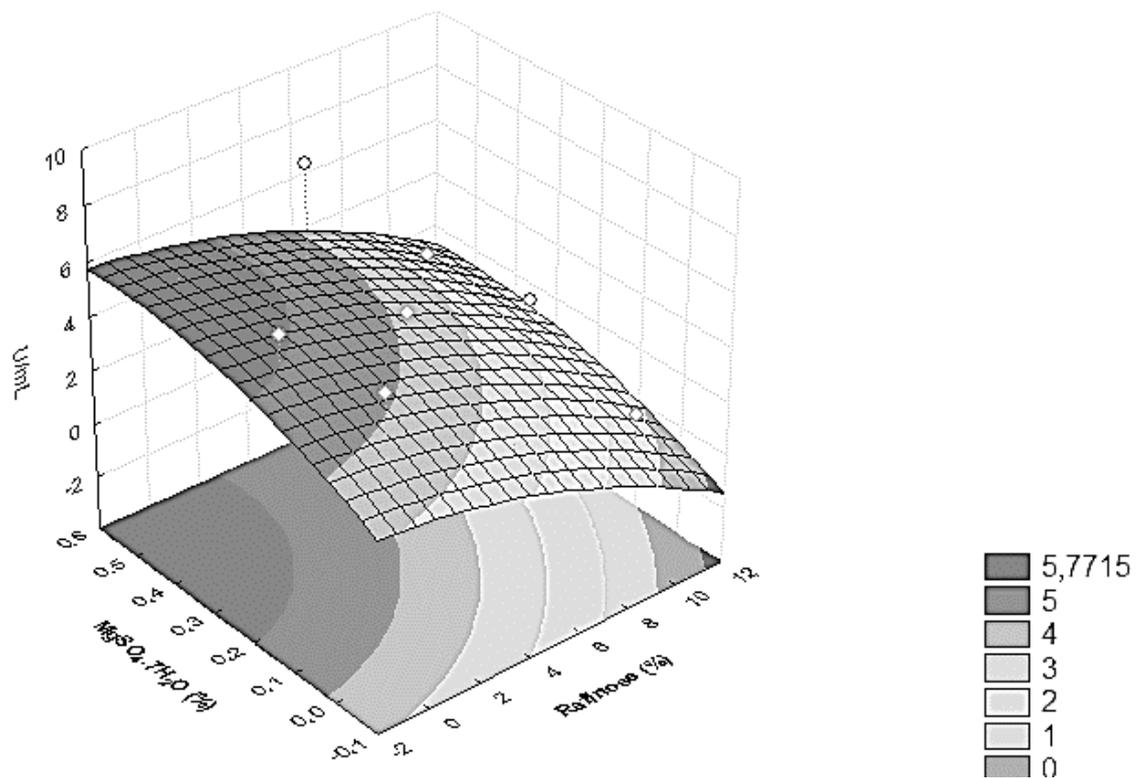


FIGURA 45 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE RAFINOSE E $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ NA α -GAL POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.

A produção da enzima α -Gal com base na concentração de rafinose e de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pode ser obtida através do modelo:

$$z = 3,6502 - 0,1416 \cdot A - 0,0178 \cdot A^2 + 7,1671 \cdot B - 6,7246 \cdot B^2 \quad (6)$$

Em que Z é a atividade de α -Gal em U/mL, A é a concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em % (m/v) e B é a concentração de rafinose em % (m/v).

Também foi verificada a superfície de resposta que relaciona a atividade enzimática em U/mL com a fonte de nitrogênio ($(NH_4)_2SO_4$) e com o sal $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (FIGURA 46).

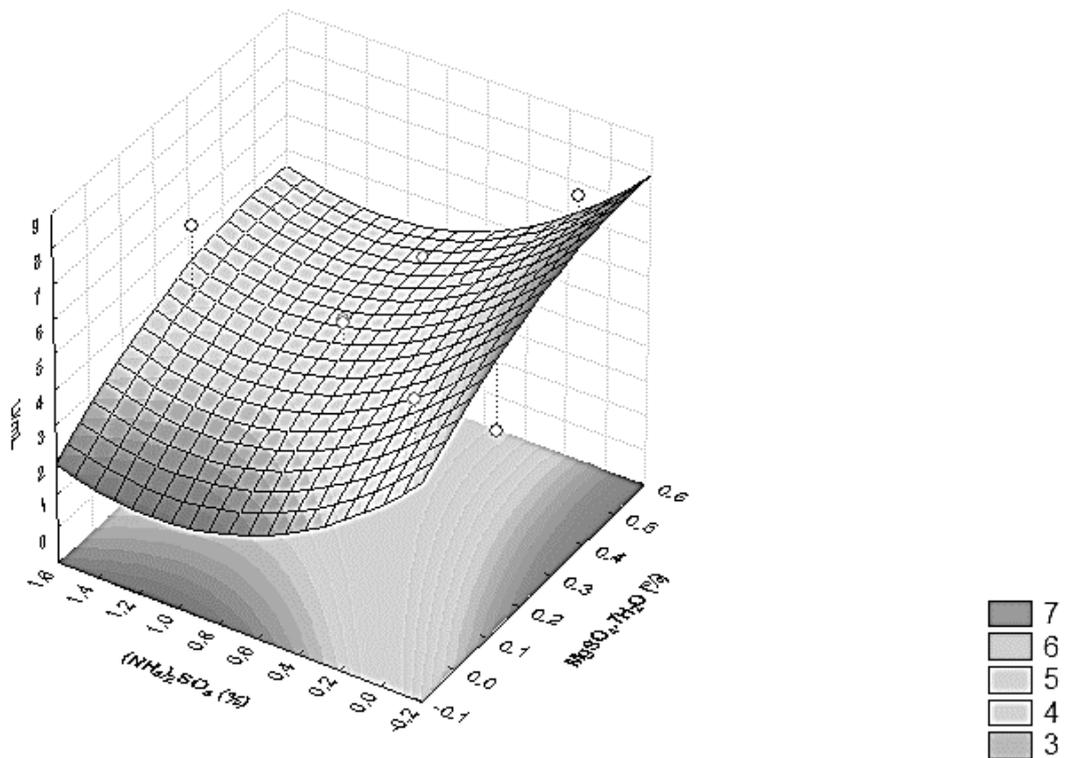


FIGURA 46 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ NA α -GAL POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM MEIO DE VINHAÇA DE SOJA.

Com base na superfície de resposta gerada, o modelo para determinação de α -Gal encontrado foi:

$$z = 4,9632 + 7,1671 \cdot A - 6,7246 \cdot A^2 - 4,9175 \cdot B + 2,1710 \cdot B^2 \quad (7)$$

Em que Z é a atividade de α -Gal em U/mL, A é a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em % (m/v) e B é a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em % (m/v).

A partir dos resultados obtidos pelos planejamentos experimentais utilizando a vinhaça de soja como meio de cultivo base, conclui-se que a melhor condição para produzir a enzima α -Gal foi a do resíduo contendo 5,0% (m/v) de rafinose e 0,50% (m/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, à 30° C e com 120 rpm de agitação.

4.7.5 Estudo da taxa de inoculação para a produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja

O teste da melhor condição de inoculação seguiu a metodologia do item 3.4.7, em que foram analisadas 3 taxas de inoculação: 5% (v/v), 10% (v/v) e 15% (v/v) em triplicata em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo vinhaça de soja enriquecida com 5% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio.

Os dados obtidos (TABELA 45) indicam que 10% (v/v) foi a condição em que houve maior produção da enzima α -Gal em vinhaça de soja ($7,17 \pm 0,94$ U/mL), enquanto que com 15% (v/v) a produção de enzima diminuiu ($5,35 \pm 0,54$ U/mL). Tal fato pode estar relacionado ao maior consumo dos substratos do meio de cultivo devido à maior quantidade de biomassa, causando então a diminuição das condições necessárias para a produção enzimática.

TABELA 45 - ATIVIDADE DE α -GAL PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23.

Inóculo	pH inicial	pH final	Atividade enzimática (U/mL)
5% (v/v)	$4,80 \pm 0,00$	$4,55 \pm 0,02$	$6,70 \pm 0,70$
10% (v/v)	$4,87 \pm 0,00$	$4,55 \pm 0,03$	$7,17 \pm 0,94$
15% (v/v)	$4,94 \pm 0,00$	$4,55 \pm 0,00$	$5,35 \pm 0,54$

Com a melhor condição de taxa de inoculação definida, foi realizada a cinética de produção enzimática, apresentada no item a seguir.

4.7.6 Cinética de produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em frascos de Erlenmeyer

O estudo da cinética de produção de α -Gal pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23 ocorreu conforme especificado no item 3.4.8, utilizando vinhaça de soja enriquecida com 5% (m/v) de rafinose e 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio, com 10% (v/v) de inóculo e à 30°C em 120 rpm de agitação.

Na TABELA 46 é possível observar os dados de biomassa em massa-seca (g/L), açúcares totais (g/L), pH, atividade de α -Gal (U/mL) e produtividade (U/mL.h) nos tempos de 0h, 6h, 12h, 24h, 30h, 36h, 48h e 72h.

TABELA 46 - VALORES DE BIOMASSA (g/L), AÇÚCARES TOTAIS (g/L), ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h) PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM VINHAÇA DE SOJA POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM ERLNMEYERS.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Açúcares totais (g/L)	pH	Atividade α -Gal (U/mL)	Produtividade (U/mL.h)
0	0,23 \pm 0,07	131,52 \pm 0,48	4,80 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,0000
6	5,55 \pm 1,10	105,71 \pm 0,51	4,68 \pm 0,00	2,65 \pm 0,47	0,4419
12	6,20 \pm 1,85	95,39 \pm 1,40	4,67 \pm 0,00	6,53 \pm 0,09	0,5445
24	8,25 \pm 1,70	91,52 \pm 0,77	4,66 \pm 0,00	7,48 \pm 0,47	0,3117
30	8,90 \pm 1,35	88,25 \pm 1,33	4,53 \pm 0,04	5,73 \pm 0,43	0,1910
36	10,58 \pm 1,85	95,02 \pm 2,59	4,05 \pm 0,00	4,88 \pm 0,14	0,1355
48	10,70 \pm 1,15	94,44 \pm 1,43	4,04 \pm 0,00	2,79 \pm 0,14	0,0582
72	11,95 \pm 1,30	92,15 \pm 1,89	4,19 \pm 0,02	2,27 \pm 0,09	0,0316

O pico de de α -Gal (FIGURA 47) ocorreu em 24h, o mesmo período de crescimento de biomassa até seu ponto máximo da fase logarítmica, correspondendo a 7,4811 \pm 0,4735 U/mL. A partir de 24h, a produção enzimática extracelular decai, chegando a 2,2727 \pm 0,0947 em 72h de amostragem. Já a maior produtividade foi de 0,545 U/mL.h em 12h de fermentação.

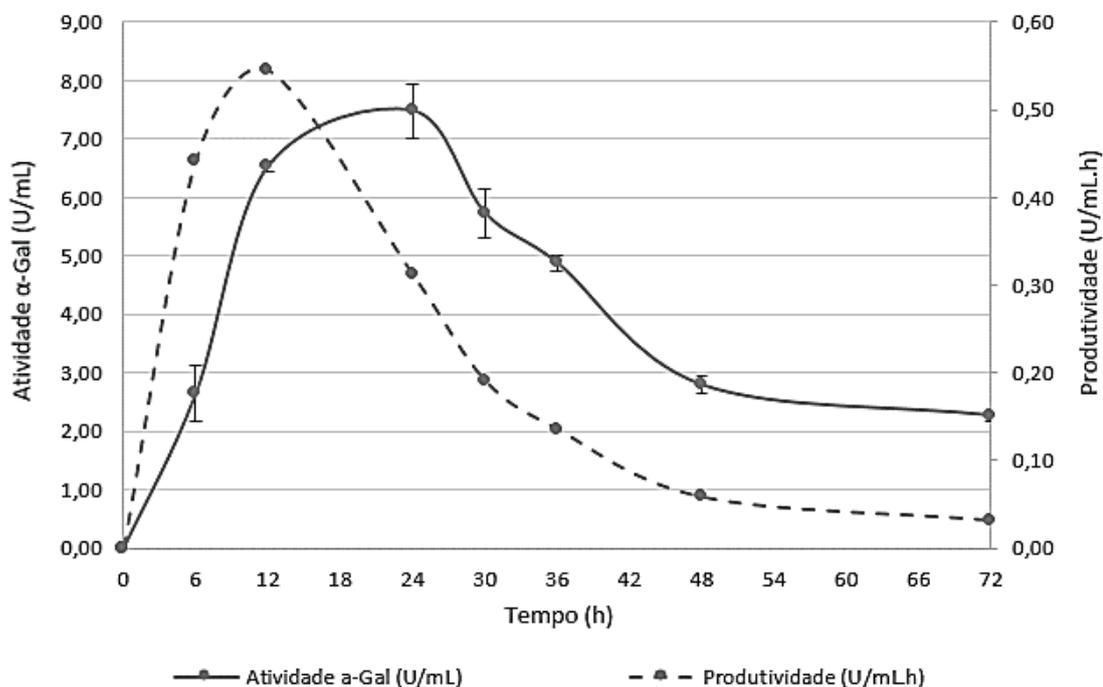


FIGURA 47 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM ERLNMEYERS - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h).

A relação entre consumo de açúcares totais (g/L) e a produção de biomassa (g/L) pode ser observada pela FIGURA 48, em que o aumento de biomassa está relacionada ao consumo de carboidratos especialmente até o período de 24 h, que corresponde à fase exponencial de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23. Para a acidez, o valor inicial da fermentação era de 4,80, chegando a aproximadamente 4,00 no final do estudo aplicado.

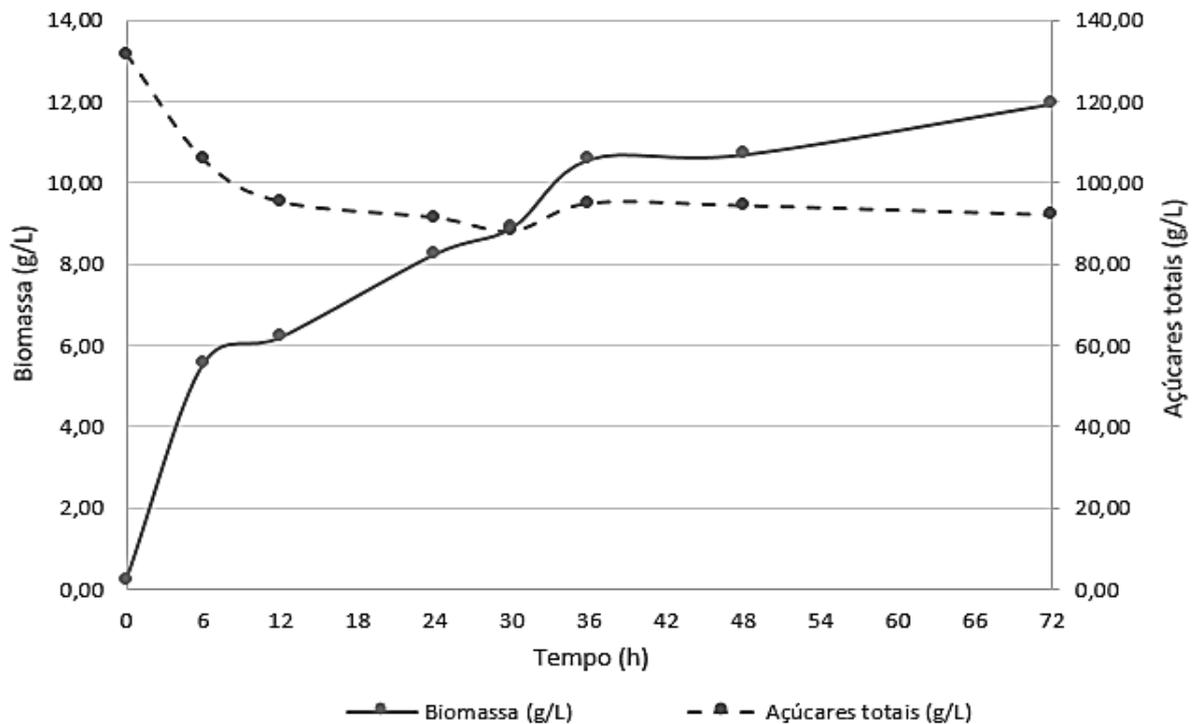


FIGURA 48 - EVOLUÇÃO DA BIOMASSA (G/L) DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (G/L) - FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM ERLENMEYERS.

Para a cinética de produção de α -Gal em Erlenmeyers, foi realizada a determinação da velocidade específica de crescimento em sistema de batelada, conforme a equação proposta por Bailey e Ollis (1986) e também aplicado por Gonzaga *et al.* (2009):

$$\ln \frac{C_x}{C_x^0} = \mu_{esp} \cdot t \quad (8)$$

Onde:

C_x^0 = concentração de biomassa inicial (g/L)

C_x = concentração de biomassa (g/L) em certo ponto do processo.

μ_{esp} = velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}).

A fim de obter o valor de $\mu_{\text{esp.}}$ para a biomassa (g/L) em vinhaça de soja por FSm, foi gerada a curva da FIGURA 49 com base nas concentrações de 12, 18 e 24 h de fermentação, correspondentes ao intervalo de fase logarítmica para a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23. O coeficiente angular gerado pela equação da linha de tendência indica $\mu_{\text{esp.}}$ de $0,0238 \text{ h}^{-1}$, com ajuste dos dados de 99,81%.

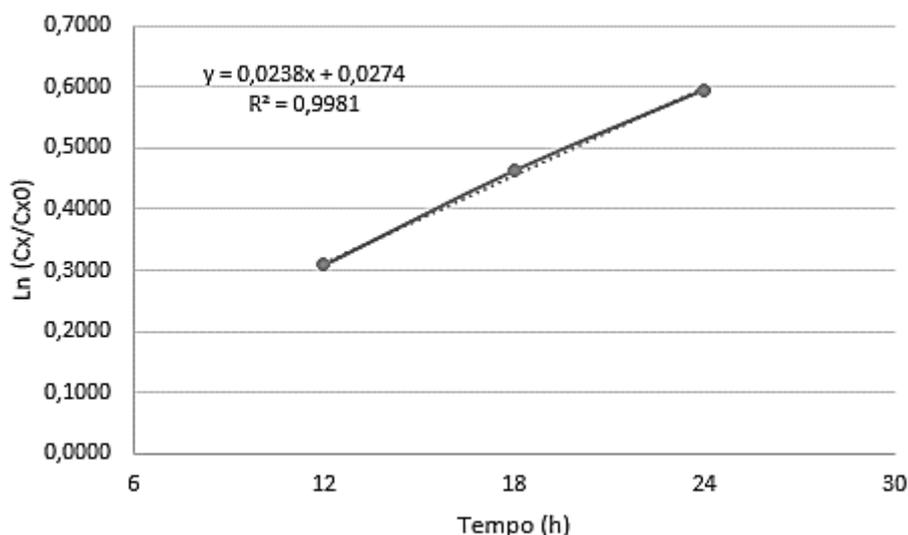


FIGURA 49 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{esp.}}$) EM SISTEMA DE BATELADA PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM ERLNMEYERS.

Com os valores obtidos, conclui-se que a melhor condição para produção de α -Gal extracelular via *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 a partir de vinhaça de soja enriquecida em FSm ocorreu em 24h, a 30°C e 120 rpm de agitação.

4.7.7 Cinética de produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em biorreator

Para a cinética da produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em biorreator (FIGURA 50), a vinhaça de soja foi empregada nas mesmas condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer, contendo 5% (m/v) de rafinose, 0,5% (m/v) de sulfato de magnésio, inóculo a 10% (v/v) e temperatura de 30°C . A agitação foi de 300 rpm e 1 vvm de aeração.



FIGURA 50 - PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA.

Na TABELA 47, observam-se os valores de biomassa em massa seca (g/L), açúcares totais (g/L), pH, atividade enzimática (U/mL) e produtividade (U/mL.h). A maior atividade de α -Gal encontrada foi de $8,84 \pm 0,05$ U/mL para o tempo de 24h de fermentação, superior em aproximadamente 18% quando comparado ao mesmo processo em escala de Erlenmeyers ($7,48 \pm 0,47$ U/mL).

A produtividade mais alta foi de 0,5724 U/mL.h em 12 h de fermentação, mesmo tempo em que ocorreu para menor escala de processo (0,5445 U/mL.h). Este resultado foi superior aos dados encontrados em literatura: 0,21 U/mL.h para produção de α -Gal via *Lactobacillus agilis* LPB 56 para fermentação em biorreator (SANADA, 2009) e 0,21 U/mL.h via *Lactobacillus fermentum* CRL 722 (LE BLANC *et al.*, 2004).

TABELA 47 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -Gal POR *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM BIORREATOR.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Açúcares totais (g/L)	pH	Atividade α -Gal (U/mL)	Produtividade (U/mL.h)
0	0,22 \pm 0,16	114,21 \pm 0,70	4,86 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	0,0000
4	2,43 \pm 0,31	113,22 \pm 0,96	4,60 \pm 0,01	1,42 \pm 0,40	0,3561
8	5,47 \pm 0,42	109,33 \pm 0,19	4,40 \pm 0,01	3,33 \pm 0,30	0,4167
12	9,20 \pm 1,42	108,37 \pm 0,43	4,27 \pm 0,02	6,87 \pm 0,40	0,5724
24	13,22 \pm 0,14	97,87 \pm 0,63	3,99 \pm 0,01	8,84 \pm 0,05	0,3681
48	15,22 \pm 0,44	96,04 \pm 1,10	3,92 \pm 0,01	5,91 \pm 0,16	0,1231
72	17,18 \pm 0,71	92,33 \pm 0,25	3,76 \pm 0,01	2,87 \pm 0,57	0,0399
96	20,55 \pm 1,53	85,94 \pm 0,22	3,90 \pm 0,01	0,90 \pm 0,25	0,0094

A atividade enzimática (U/mL) e produtividade (U/mL.h) também são apresentadas na FIGURA 51, em que a atividade é maior em 24h (8,84 \pm 0,05 U/mL), enquanto a maior produtividade ocorre a 12h (0,5724 U/mL.h) de fermentação. Após este período a atividade cai, mostrando que existe uma perda de atividade causada talvez pela desnaturação da enzima devido a diversos fatores.

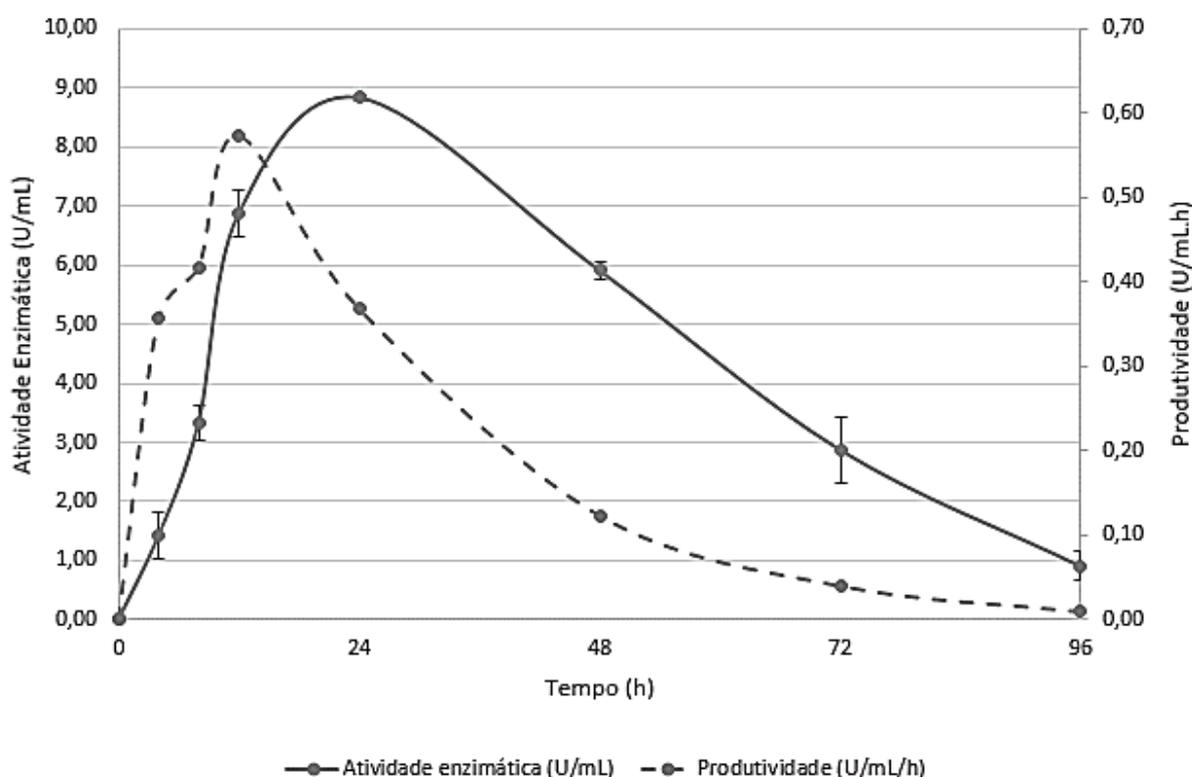


FIGURA 51 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GALACTOSIDADE EM BIORREATOR - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PRODUTIVIDADE (U/mL.h).

Sobre a biomassa em massa seca (g/L) (FIGURA 52) observa-se a fase exponencial especialmente entre 8 h ($5,47 \pm 0,42$ g/L) e 24 h ($13,22 \pm 0,14$ g/L) de fermentação, com posterior desaceleração do crescimento celular. Nota-se também que o aumento de células está diretamente relacionado ao consumo de açúcares, conforme os dados de açúcares totais (g/L) apresentados na figura a seguir.

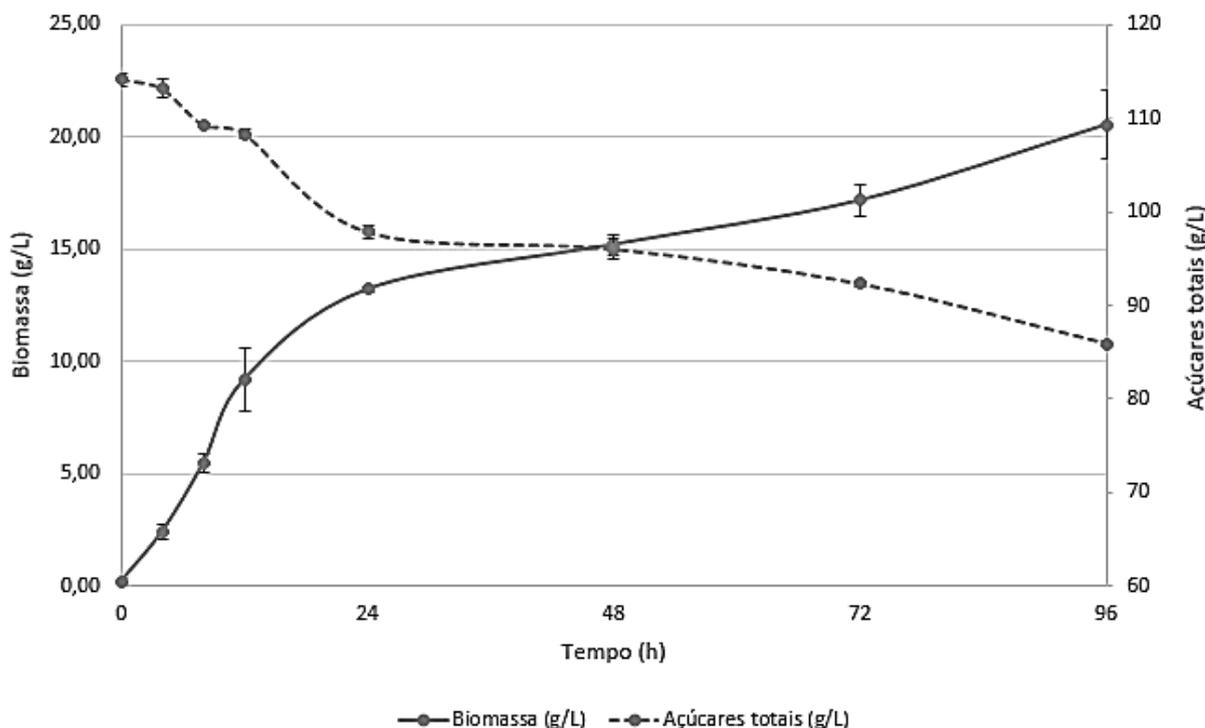


FIGURA 52 - EVOLUÇÃO DA BIOMASSA (G/L) DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* INRA 23 E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (G/L) - FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR.

Conforme os dados apresentados, houve aumento da produção da biomassa (g/L) em biorreator ($13,22 \pm 0,14$ g/L) quando comparado ao processo em Erlenmeyers (item 4.7.6), em que a 24 h de fermentação o valor obtido foi de $8,25 \pm 1,70$ g/L. Provavelmente a maior agitação e aeração promovida no biorreator do tipo tanque agitado promoveram melhores condições de crescimento celular para a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, gerando também aumento da atividade de α -Gal, de $7,48 \pm 0,47$ U/mL para $8,84 \pm 0,05$ U/mL, um incremento de 18% na produção.

Sobre a acidificação do meio fermentado, esta também esteve relacionada à maior produção de biomassa, apresentando maior taxa de queda até o período de 24h, havendo estabilização após este tempo. Conforme observado nos estudos

anteriores a vinhaça apresenta razoável efeito tamponante, sendo o menor valor de pH, próximo a 4,0.

A velocidade específica de crescimento de biomassa (g/L) em sistema de batelada para a produção de α -Gal em biorreator foi calculada conforme a equação proposta por Bailey e Ollis (1986), apresentada no item 4.7.6.

Com base nas concentrações de biomassa (g/L) de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 nos tempos de 8, 12 e 24 h foi gerada a curva da FIGURA 53. O coeficiente angular gerado pela equação da linha de tendência indica $\mu_{\text{esp.}}$ de $0,035 \text{ h}^{-1}$, com ajuste dos dados de 98,04%.

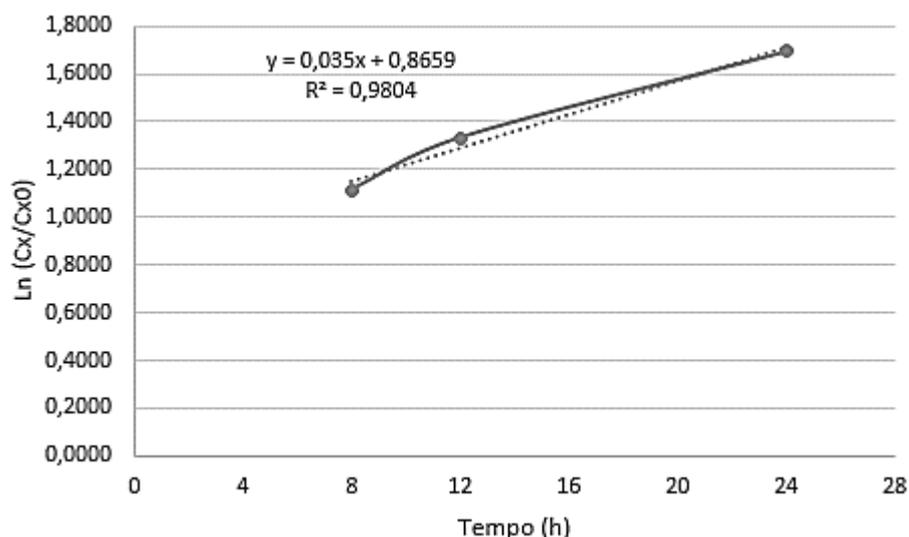


FIGURA 53 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{esp.}}$) EM SISTEMA DE BATELADA PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM BIORREATOR.

De acordo com os valores obtidos, conclui-se que em biorreator a enzima α -Gal tem sua máxima atividade no tempo de 24 h, com $8,84 \pm 0,05 \text{ U/mL}$, sendo 18% maior do que atividade produzida nas condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer ($7,48 \pm 0,47 \text{ U/mL}$), coincidindo com a fase logarítmica da linhagem bacteriana *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23. Tal fato significa que a produção da enzima é associada ao crescimento.

4.8 EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E DA PRODUTIVIDADE (U/mL.h) PARA PRODUÇÃO DE α -GAL EM VINHAÇA DE SOJA

A evolução da atividade enzimática de α -Gal (U/mL) (TABELA 48) baseou-se na condição inicial testada, vinhaça de soja pura sem adição de qualquer fonte suplementar, cuja atividade foi de $4,29 \pm 0,36$ U/mL. Com os estudos de fontes de carbono e nitrogênio suplementares, este valor aumentou para $5,96 \pm 0,30$ U/mL. Após a otimização com sais, obteve-se $6,41 \pm 0,16$ U/mL, chegando a um valor de $7,78 \pm 0,10$ U/mL após planejamento experimental em Erlenmeyers. Esta atividade enzimática teve novo incremento quando escalonado para biorreator do tipo tanque agitado, atingindo uma produção final de $8,84 \pm 0,05$ U/mL, mais do que o dobro para a condição inicial testada.

TABELA 48 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA PARA CADA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO.

Etapa	Atividade de α -Gal (U/mL)	Aumento de atividade (%)
Vinhaça de soja pura	$4,2929 \pm 0,3566$	-
Otimização com fontes de carbono e nitrogênio	$5,9596 \pm 0,3030$	38,82
Otimização com sais	$6,4141 \pm 0,1616$	49,41
Planejamento com fontes de carbono, nitrogênio e sais em Erlenmeyer	$7,7778 \pm 0,1011$	81,18
Cinética em biorreator	$8,8353 \pm 0,0537$	105,81

Estes resultados de produção enzimática foram superiores aos citados em literatura (TABELA 49), como por exemplo para *Lactobacillus fermenti* NRRL B-585 (1,1 U/mL) (MUDGETT e MAHONEY, 1985) e *Lactobacillus fermentum* CRL 722 (5,0 U/mL) (LE BLANC *et al.*, 2005). Também foi superior ao *Leuconostoc mesenteroides* JK55 (5,47 U/mL), estudado por Yoon e Hwang (2008) e que foi uma das referências para a seleção de novas linhagens do presente trabalho. O valor final de α -Gal (U/mL) obtida em biorreator para *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23, de $8,84 \pm 0,05$ U/mL também foi maior do que *Lactobacillus agilis* LPB 56 (SANADA, 2009) em Erlenmeyers, com 6,0 U/mL, ficando inferior somente para a condição de biorreator, que para esta linhagem levou a uma produção de 11,0 U/mL.

TABELA 49 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM RELAÇÃO AO DESCRITO EM LITERATURA.

Linhagem/Condição	Atividade de α-Gal (U/mL)	Referência
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 (Erlenmeyers)	7,78 U/mL em vinhaça de soja	O Autor
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 (Biorreator)	8,84 U/mL em vinhaça de soja	O Autor
<i>Lactobacillus fermenti</i> NRRL B-585 (Erlenmeyers)	1,10 U/mL em caldo MRS	MUDGETT e MAHONEY (1985)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 722 (Erlenmeyers)	5,00 U/mL em caldo MRS	LE BLANC <i>et al.</i> (2005)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JK55 (Erlenmeyers)	5,47 U/mL em caldo MRSm	YOON e HWANG (2008)
<i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 (Erlenmeyers)	6,00 U/mL em vinhaça de soja	SANADA (2009)
<i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 (Biorreator)	11,00 U/mL em vinhaça de soja	SANADA (2009)

Apesar da boa produção de α -Gal quando analisado o valor de U/mL, verificou-se também a produtividade (U/mL.h) obtida no processo de fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja, quando comparada ao descrito em estudos de outros autores (TABELA 50).

TABELA 50 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -GAL DE *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* INRA 23 EM VINHAÇA DE SOJA EM RELAÇÃO AO DESCRITO EM LITERATURA.

Linhagem/Condição	Produtividade (U/mL.h)	Referência
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 (Erlenmeyer)	0,5445	O Autor
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> INRA 23 (Biorreator)	0,5724	O Autor
<i>Lactobacillus fermenti</i> NRRL B-585 (Erlenmeyer)	0,0178	MUDGETT e MAHONEY (1985)
<i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56 (Biorreator)	0,0769	SANADA (2009)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIM – 5146 (Erlenmeyer)	0,0833	GOTE <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 722 (Erlenmeyer)	0,2083	LE BLANC <i>et al.</i> (2005)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JK55 (Erlenmeyer)	0,2279	YOON e HWANG (2008)

Em relação à produtividade (U/mL.h), que considera a atividade enzimática por tempo de processo, tanto a produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em Erlenmeyer (0,5445 U/mL.h) quanto em biorreator (0,5724 U/mL.h) foram maiores do que as demais linhagens citadas, como *Leuconostoc mesenteroides* JK55 em Erlenmeyer (0,2279 U/mL.h) (YOON e HWANG, 2008) e para *Lactobacillus agilis* LPB 56 (SANADA, 2009), em biorreator (0,0769 U/mL.h).

4.9 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA α -Gal

4.9.1. Microfiltração em sistema de filtração à vácuo e ultrafiltração por centrifugação

A metodologia para microfiltração por Sistema de Filtração à Vácuo PES 0,22 μm (KASVI®) e ultrafiltração via membranas de 100.000 (FIGURA 54) e 10.000 MWCO (FIGURA 55) Vivaspin (GE Healthcare®) ocorrerem conforme descrito no item 3.5.

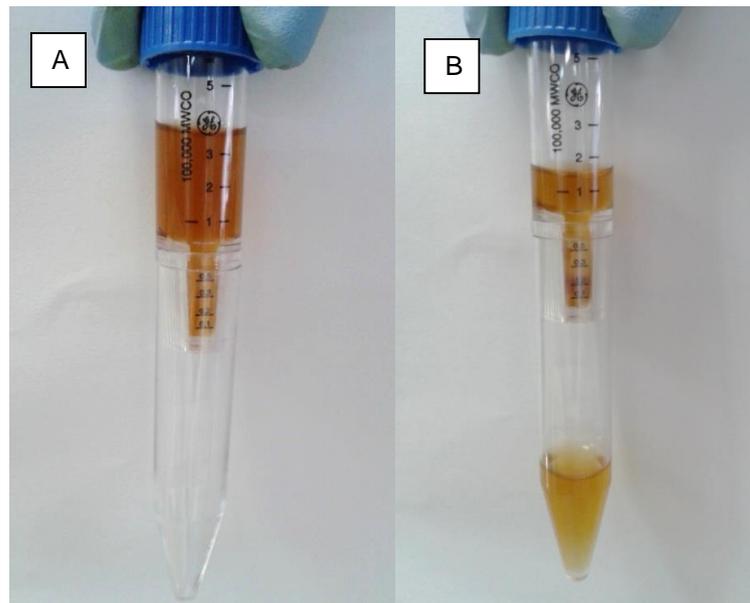


FIGURA 54 – (A) MEMBRANA VIVASPIN (GE HEALTHCARE®) DE 100.000 MWCO CONTENDO AMOSTRA. (B) MEMBRANA COM FRAÇÕES DE RETIDO E PERMEADO.



FIGURA 55 – MEMBRANA VIVASPIN (GE HEALTHCARE®) DE 10.000 MWCO CONTENDO FRAÇÕES DE RETIDO E PERMEADO.

Foi utilizado como extrato bruto o meio fermentado proveniente da fermentação de vinhaça de soja em biorreator (FIGURA 56), acondicionado a -18°C até o dia do teste de purificação.



FIGURA 56 – MEIO FERMENTADO A PARTIR DE VINHAÇA DE SOJA EM BIORREATOR.

No processo de microfiltração, notou-se a formação de filme de vinhaça de soja sobre a membrana, causando maior tempo de processo e dificuldade de passagem de permeado.

Considerando somente a atividade de α -Gal (TABELA 51) e partindo-se do valor inicial de $1,4767 \pm 0,0869$ U/mL, houve um aumento da atividade enzimática, chegando a $2,5624 \pm 0,0434$ U/mL. Isto pode ter ocorrido possivelmente por uma concentração da α -Gal que ficou retida na membrana durante o processo de centrifugação.

TABELA 51 – ATIVIDADE DE α -Gal (U/mL) PARA MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO APLICANDO SISTEMA DE FILTRAÇÃO KASVI E VIVASPIN.

Etapas	Ativ. enz. (U/mL)
Extrato bruto	$1,4767 \pm 0,0869$
Retido MF	$0,6080 \pm 0,0679$
Permeado MF	$0,6515 \pm 0,1303$
Retido na UF 100.000 MWCO	$2,5624 \pm 0,0434$
Permeado da UF 100.000 MWCO	$1,4332 \pm 0,2172$
Retido na UF 10.000 MWCO	$0,9121 \pm 0,0434$
Permeado da UF 10.000 MWCO	$0,5646 \pm 0,1303$

A fim de calcular as taxas de recuperação e purificação da α -Gal, levou-se em consideração as proteínas totais (mg) com base nos dados de volume (mL) e nas análises de Bradford para cada etapa do processo (TABELA 52). Dos 100 mL iniciais contendo 147,67 U, a maior recuperação obtida foi de 33% na membrana de 100.000 MWCO, com 48,05 U. O fator de purificação baseou-se na atividade específica (U/mg), que de 0,3051 U/mg no início do processo atingiu 0,4634 U/mg.

TABELA 52 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PROTEÍNAS TOTAIS (MG/ML) PARA MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO DE α -Gal USANDO SISTEMA DE FILTRAÇÃO KASVI E VIVASPIN.

Etapa	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Ativ. total (U)	Ativ. esp. (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	100	484,0479	147,6656	0,3051	100	1,0
Retido MF	50	268,9573	30,4017	0,1130	21	0,4
Permeado MF	50	269,9475	32,5733	0,1207	22	0,4
Retido na UF 100.000 MWCO	19	103,6811	48,0456	0,4634	33	1,5
Permeado da UF 100.000 MWCO	31	171,0070	44,7883	0,2619	30	0,9
Retido na UF 10.000 MWCO	17	89,7285	15,5049	0,1728	11	0,6
Permeado da UF 10.000 MWCO	16	48,9900	8,8219	0,1801	6	0,6

Os menores valores constaram para a ultrafiltração a 10.000 MWCO, indicando que a α -Gal já havia sido retida na etapa anterior por ter massa molecular superior a 100.000 MWCO ou devido ao fenômeno de *fouling*. Tal fenômeno é causado pelo bloqueamento dos poros da membrana pela sedimentação de partículas sobre a mesma, causando descréscimo do fluxo de permeado (ZEMAN e ZYDNEY, 1996).

Para a atividade total (U), observou-se que ocorreu um aumento na fração retida de 100.000 MWCO, podendo ser justificada por uma possível concentração enzimática.

Deste modo, para o procedimento de purificação e concentração enzimática via microfiltração em Sistema de Filtração à Vácuo PES 0,22 μ m (KASVI®) e ultrafiltração por membranas de filtração 100.000 e 10.000 MWCO Vivaspín (GE Healthcare®), a maior condição para recuperação de α -galactosidade foi para o retido da ultrafiltração a 100.000 MWCO. Entretanto, para confirmar a eficiência do procedimento, julgou-se necessário a identificação da massa molecular enzimática para a α -Gal, a fim de verificar se o resultado justifica a retenção proteica ou se sofreu influência de *fouling*.

4.9.2. Micro e ultrafiltração em sistema MILLIPORE®

Conforme método descrito no item 3.5.3, o equipamento de purificação foi montado e realizou-se enxágue do sistema. Em seguida, seguiu-se com o processo, em que 560 mL do meio fermentado a partir de vinhaça de soja proveniente de biorreator foram adicionados ao sistema de purificação, inicialmente com membrana Pellicon 2 para microfiltração (MERCK MILLIPORE®). Foi obtido permeado de 558 mL de volume, de onde 36 mL foram separados para análises posteriores e o volume restante seguiu para ultrafiltração em membrana Pellicon de 30kDa (MERCK MILLIPORE®), restando-se 455 mL e permeando-se 41 mL.

Das frações separadas (FIGURA 57) nota-se visualmente maior viscosidade do extrato bruto, devido aos sólidos ainda em suspensão da vinhaça de soja. O permeado da microfiltração, por sua vez, apresentou coloração amarelo clara, assim como o retido da ultrafiltração, ambos translúcidos. Já a fração obtida no permeado da ultrafiltração foi incolor.

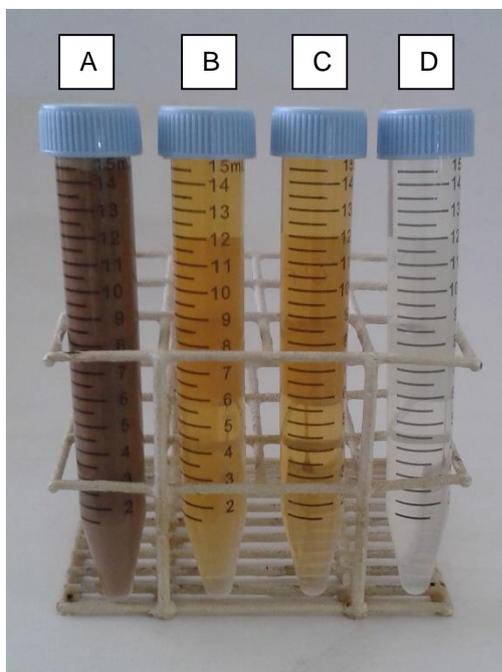


FIGURA 57 – (A) EXTRATO BRUTO; (B) PERMEADO DA MICROFILTRAÇÃO; (C) RETIDO DA ULTRAFILTRAÇÃO; (D) PERMEADO DA ULTRAFILTRAÇÃO.

Em relação aos dados de atividade enzimática de α -Gal em U/mL (TABELA 53), o permeado da microfiltração apresentou maior valor ($0,8252 \pm 0,0434$ U/mL) quando comparado ao extrato bruto ($0,6515 \pm 0,0323$ U/mL). Este resultado pode ter ocorrido devido a uma concentração enzimática, ou ainda, por algum desnaturante do extrato inicial (protease, por exemplo) ter sido retido na etapa de microfiltração, provocando este efeito de incremento.

TABELA 53 – ATIVIDADE DE α -GAL (U/mL) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO EM SISTEMA MILLIPORE.

Etapa	Ativ. enz. (U/mL)
Extrato bruto	$0,6515 \pm 0,0323$
Permeado da MF	$0,8252 \pm 0,0434$
Retido na UF 30 kDa	$0,6949 \pm 0,0869$
Permeado da UF 30 kDa	$0,0869 \pm 0,0000$

A TABELA 54 apresenta a atividade total (U) e específica (U/mg) considerando os volumes de cada fase amostrada durante o procedimento. Percebe-se que a microfiltração, com 460,46 U, levou a uma recuperação de 126% quando comparado ao extrato inicial de 364,82 U. Já o fator de purificação de maior valor foi correspondente a 2,1 para a mesma etapa, seguido do retido na membrana de 30 kDa, com 1,9 vezes de purificação. Os menores valores encontrados correspondem ao permeado da membrana de 30kDa, com atividade específica de 0,1091 U/mg e fator de purificação 0,7, indicando que a α -Gal foi retida na membrana de ultrafiltração.

TABELA 54 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL) E PROTEÍNAS TOTAIS (mg/mL) PARA MICRO E ULTRAFITLRAÇÃO APLICANDO SISTEMA MILLIPORE.

Etapa	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Ativ. total (U)	Ativ. esp. (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	560	2355,7818	364,8208	0,1549	100	1
Permeado da MF	558	1426,8534	460,4560	0,3227	126	2,1
Retido na UF 30 kDa	455	1070,6624	316,1781	0,2953	87	1,9
Permeado da UF 30 kDa	41	3,2641	0,3561	0,1091	0	0,7

De maneira geral, pode-se dizer que o sistema de purificação e concentração pelo sistema Millipore foi viável e a enzima α -Gal foi ao mesmo tempo purificada e

concentrada, apesar de perdas provenientes nas lavagens das membranas. Além disso, este sistema é mais indicado do que a aplicação de membranas Vivaspin (GE Healthcare®) quanto ao escalonamento, já que a filtração em membranas Pellicon simula o processo que ocorreria em volumes industriais.

Entretanto, notou-se grande perda da atividade enzimática do extrato bruto durante sua estocagem em *freezer* doméstico, já que ao ser retirado do biorreator apresentava $8,84 \pm 0,05$ U/mL. Uma das sugestões futuras é acondicionar o meio fermentado sob refrigeração, a fim de melhorar o desempenho geral do processo.

4.10 ELETROFORESE SDS-PAGE

Com base na metodologia aplicada no item 3.6, foram obtidas as bandas para o marcador de massa molecular e para a fração enzimática purificada e concentrada. Entretanto, a coloração da banda proteica ficou bastante clara, provavelmente pelo fato de a α -Gal não ter obtida concentração tão alta como as comercialmente encontradas, além do fato de ter ocorrido perda de estabilidade após fermentação em biorreator, quando o extrato foi acondicionado a -18°C .

Apesar desta diminuição da atividade enzimática, foi possível verificar a formação da banda, que correspondeu a aproximadamente 60 kDa (FIGURA 58).

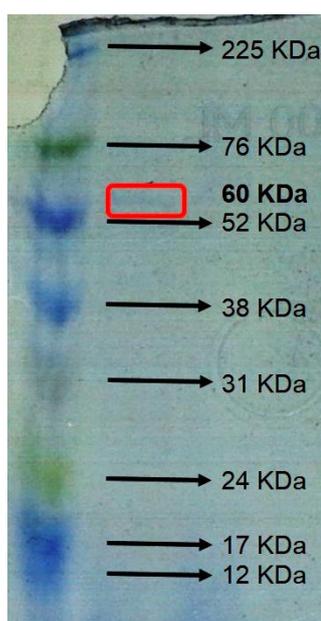


FIGURA 58 – ELETROFORESE SDS-PAGE DA α -GAL COM MARCADOR DE PESO MOLECULAR RAINBOW. FONTE: O AUTOR.

De acordo com o levantamento bibliográfico, a α -Gal obtida por fermentação via *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em meio à base de vinhaça de soja se aproxima da enzima estudada por Ademark *et al.* (2001) e obtida por fermentação com *Aspergillus niger* ATCC 46890, com 64 kDa. A massa molecular também ficou similar ao descrito por Anisha, John e Prema. (2009), que obtiveram duas enzimas do tipo α -Gal por *Streptomyces griseoloalbus* MTCC 7447, com 72 e 57 kDa, respectivamente.

5. CONCLUSÃO

Para a produção de α -Gal a partir do resíduo industrial de soja estudado (vinhaça de soja), o maior rendimento encontrado foi para a linhagem bacteriana de *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 para produção em biorreator, a 24h de processo e 30°C de temperatura, com 300 rpm de agitação e 1 vvm de aeração.

A atividade enzimática referente a tal fermentação submersa foi de $8,84 \pm 0,05$ U/mL em meio otimizado à base de vinhaça de soja, contendo 5,0% (m/v) de rafinose, 0,5% (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 10% (v/v) de inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* padrão INRA 23. A produção da enzima foi extracelular, ou seja, secretada no meio de produção, fato que contribuiu para posterior separação e purificação.

Para o processo de purificação e concentração, o sistema de filtração tangencial na configuração quadro e placas é o mais indicado, uma vez que permite melhor escalonamento, já que a filtração em membranas Pellicon simula o processo que ocorreria em volumes industriais.

A enzima purificada e concentrada foi submetida à identificação em Eletroforese SDS-PAGE, com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, similar ao citado por referências na área de engenharia enzimática.

Deste modo, comprovou-se a viabilidade técnica do bioprocesso de obtenção de α -Gal através da fermentação submersa em resíduo industrial de soja em suas etapas de produção, recuperação e purificação, permitindo inclusive o depósito de uma patente (ANEXO C).

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A produção de α -Gal por *Leuconostoc mesenteroides* INRA 23 em vinhaça de soja mostrou-se viável tecnicamente. Deste modo, sugere-se para etapas futuras a identificação da enzima por MALD-TOF, além de mais testes otimização em escala de reator, acompanhada de análises de consumo de oxigênio para a produção enzimática.

Sugere-se também mais testes de purificação e concentração enzimática, tendo em vista a possibilidade de aplicação industrial, assim como a formulação de um produto comercial concentrado com testes de estabilidade em condições otimizadas, a fim de verificar perdas na atividade enzimática do produto.

Com estas etapas definidas, recomenda-se a aplicação do produto para comprovar sua eficiência na redução de oligossacarídeos, tanto em produtos derivados de soja, como também na produção de açúcar de beterraba.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIS_ENCYCLOPEDIA. *Lactobacillus agilis*. Disponível em: <<http://www.tgw1916.net/Lactobacillus/agilis.html>>.

ABRAFF- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE DOENÇA DE FABRY. Doença de Fabry. Disponível em: <<http://www.fabry.org.br/tratamento-especifico.php>>. Acesso em: 20/11/2013.

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STÅLBRAND, H. Multiple alpha-galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 441–448, 2001.

ADLER-NISSEN, J.; DEMAIN, A. L. Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 335–343, 1994.

AMAZON.COM. Bean-zyme - price. Disponível em: <<http://www.amazon.com/Bean-zyme-Anti-Gas-Digestive-Capsules-Supplement/dp/B000CQY9EK>>. .

ANISHA, G. S.; JOHN, R. P.; PREMA, P. Biochemical and hydrolytic properties of multiple thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*: Obvious existence of a novel galactose-tolerant enzyme. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 327–333, 2009.

ANISHA, G. S.; ROJAN, P. J.; NICEMOL, J.; NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 631–635, 2008.

ANISHA, G. S.; SUKUMARAN, R. K.; PREMA, P. Statistical optimization of alpha galactosidase production in submerged fermentation by *Streptomyces griseoloalbus* using response surface methodology. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 46, n. 2, p. 171–177, 2008.

ARNAUD, N.; BUSH, D. A. **Alpha-galactosidase production.**, 1976. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US3966555>>

ATCC. *Lactobacillus agilis* (ATCC® 43616 TM) - *Lactobacillus agilis* Weiss et al. (JCM 1050). 2012.

ATCC. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (ATCC® 9135™). 2014a.

ATCC. *Lactobacillus curvatus* (ATCC® 51436™). 2014b.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Segunda Ed ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Education., 1986.

BAILLON, M.-L. et al. **Food product and process for their preparation by enzymatic galactosyltransfer with lactobacillus alpha-galactosidase.**, 2004. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/WO2004074496A1?cl=en&dq=Food+product+and+process+for+their+preparation+by+enzymatic+galactosyltransfer+with+lactobacillus+alpha-galactosidase.+2004.&hl=pt-BR&sa=X&ei=gcq2VJKdLY3nsAS1tYC4AQ&ved=0CCAQ6AEwAA>>

BASELINE.NUTRITIONALS.COM. Baseline - price. Disponível em: <<https://www.baselinenutritionals.com/shop.php>>. Acesso em: 4/11/2014.

BASELINE_NUTRITIONALS®. Digestive Enzymes. Disponível em: <[tp://www.baselinenutritionals.com/products/digestive-enzymes.php](http://www.baselinenutritionals.com/products/digestive-enzymes.php)>. Acesso em: 30/10/2013.

BEANO®. Alpha-galactosidase - enzyme tablets. Disponível em: <<http://therapy.epnet.com/nat/GetContent.asp?siteid=EBSCO&chunkiid=104337>>. Acesso em: 30/7/2014.

BEAN-ZYME®. Alpha galactosidase from *Aspergillus niger*. Disponível em: <<http://www.bean-zyme.com/>>. Acesso em: 28/10/2013.

BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2ª Edição ed. Londres: CAB International, 2010.

BINDU, S.; SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. A comparative study on permeabilization treatments for in situ determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 336–340, 1998.

BIOCHEMISTRY, O. Melibiose. Disponível em: <<http://content.answcdn.com/main/content/img/oxford/oxfordBiochemistry/0198529171.melibiose.1.jpg>>. Acesso em: 29/10/2013.

BORCH, E.; GÖRAN, M. The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix* and *Carnobacterium* in batch cultures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 174, p. 81–88, 1989.

BOYAVAL, P. Lactic acid bacteria and metal ions. **Lait**, v. 69, p. 87–113., 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 15, 2011.

BURY, D.; JELEN, P.; KALAB, M. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 23–29, 2001.

CALHOUN, D. H.; COPPOLA, G. **Recombinant alpha-galactosidase, a therapy for fabry disease.** Res Corp Technologies Inc, , 1990. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/WO1990011353A1?cl=en&dq=calhoun+Recombinant+alpha-galactosidase,+a+therapy+for+Fabry+disease.&hl=pt-BR&sa=X&ei=zsu2VO7FBujksATThoCABQ&ved=0CBwQ6AEwAA>>

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.**, 2001. Universidade Federal de Santa Catarina.

CASTANEDA, J. A.; LIM, M. J.; COOPER, J. D.; PEARCE, D. A. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. **Acta Neuropathol.**, v. 115, p. 159–174, 2008.

CHOONIA, H. S.; LELE, S. S. Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for β -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 49–57, 2013. Elsevier B.V.

CHROST, B. ; SCHIMITZ, K. Changes in soluble sugar and activity of α -galactosidases and acid invertase during muskmelon (*Cucumis melo*) fruit development. **Journal of Plant Physiology, Stuttgart**, v. 151, p. 41–50, 1997.

DOLS, M.; CHRAIBI, W.; REMAUD-SIMEON, M.; LINDLEY, N. D.; MONSAN, P. F. Growth and Energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranucrase Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2159–2165, 1997.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; FERRARI, G. Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of the disruption valve geometry. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 362–370, 2013.

DOOLAN, I. A.; WILKINSON, M. G. Comparison of the effects of various attenuation methods on cell permeability and accessibility of intracellular enzymes in *Lactococcus lactis* strains. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 215–221, 2009.

DU, F.; ZHU, M.; WANG, H.; NG, T. Plant Physiology and Biochemistry Purification and characterization of an α -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides. **Plant physiology and biochemistry**, v. 69, p. 49–53, 2013.

DU, F.; ZHU, M.; WANG, H.; NG, T. Purification and characterization of an α -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 69, p. 49–53, 2013.

ELLEBELLEUK®. Digestive Health Supplement. Disponível em: <http://www.ellebelleuk.com/womens-health-supplements/digestive-health-supplement?cPath=63_128&>. Acesso em: 28/10/2013.

ELLEBELLEUK®. Digestive Health Supplement - Price. Disponível em: <<http://www.ellebelleuk.com/womens-health-supplements/digestive-health-supplement/>>. Acesso em: 13/11/2014.

ESCOBAR-CORTÉS, K.; BARRA-CARRASCO, J.; PAREDES-SABJA, D. Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, p. 25–31, 2013.

FALLAHPOUR, MASOUD; MIRDAMADI, SAEED; BAKHTIARI, M. R. Design and characterization of a simulated immobilized enzyme system for raffinose removal in beet molasses. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S77–S78, 2007.

FIALHO, L. DA S. **Purificação e caracterização de uma alfa-galactosidase em sementes de Tachigali multijuga e clonagem parcial do gene da estaquiase sintase de soja**, 2007. Federal University of Viçosa.

FOLADORI, P.; LAURA, B.; GIANNI, A.; GIULIANO, Z. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry — Fecal indicators, wastewater and activated sludge. **Water Research**, v. 41, p. 235–243, 2007.

FOUCAUD, C.; FRANCOIS, A.; RICHARD, J. Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 301–4, 1997.

FRANCESCO, P. N. F.; MUCCI, J. M.; CECI, R.; FOSSATI, C. A.; ROZENFELD, P. A. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. **Molecular genetics and metabolism**, v. 109, n. 1, p. 93–9, 2013. Elsevier Inc.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F. DE; OLIVER, G.; GIORI, G. S. DE. Purification of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. , v. 45, n. 95, p. 103–109, 1996.

GASTONI, W.; FILHO, V. Ultra e Microfiltração de Licor de Acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 305–311, 2005.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541–553, 2002.

GHOSH, M. K.; GHOSH, U. K. **Comparative Batch Growth Studies of Pure Lactobacillus Strains and Their Co-culture in Synthetic Medium with Different Neutralizing Agents**. Saharanpur, India, 2007.

GÓES, S. P. DE; LUCIA, M.; RIBEIRO, L. α -galactosidase: general aspects and its application on soybean oligosaccharides. **Ciências Agrárias**, v. 23, p. 111–119, 2002.

GONZAGA, M. C.; GIORDANO, R. C.; NUCCI, E. R.; IEMMA, M. R. C. Cinética de crescimento de *Bacillus megaterium* recombinante para a produção de penicilina G acilase (PGA). **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.**, 2009.

GOTE, M. M.; KHAN, M. I.; KHIRE, J. M. Active site directed chemical modification of α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146): Involvement of lysine, tryptophan and carboxylate residues in catalytic site. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1312–1320, 2007.

GOTE, M.; UMALKAR, H.; KHAN, I.; KHIRE, J. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1723–1729, 2004.

GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E. G.; FELIX, C. R. Characterization of alpha-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 67–73, 2001a.

GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E. G.; FELIX, C. R. Characterization of alpha-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 67–73, 2001b.

GURKOK, S.; CEKMECELIOGLU, D.; OGEL, Z. B. Optimization of culture conditions for *Aspergillus sojae* expressing an *Aspergillus fumigatus* α -galactosidase. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4925–9, 2011. Elsevier Ltd.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais., 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2014. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201403comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201403comentarios.pdf)>. Acesso em: 1/4/2014.

IHERB.COM. Beano - price. Disponível em: <<http://www.iherb.com/Beano-Food-Enzyme-100-Tablets/5645?gclid=COORnqOq4cECFUtp7AodOi8Akw>>. Acesso em: 4/11/2014.

IMCOPA. Vinhaça de soja. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/empresa>>. Acesso em: 13/3/2015.

IUBMB ENZYME NOMENCLATURE (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY). EC 3.2.1.22. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/22.html>>. Acesso em: 29/10/2013.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; et al. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1765–72, 2011a. Elsevier Ltd.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; et al. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, 2011b. Elsevier Ltd.

KASTER, B. **Efeitos das condições operacionais na microfiltração do suco de maçã.**, 2009. Universidade Federal de Santa Catarina.

KOTWAL, S. M.; GOTE, M. M.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I.; KHIRE, J. M. Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp . in solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 337–343, 1998.

KOTWAL, S. M.; GOTE, S. R.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I.; KHIRE, J. M. Production of alpha-galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp . in solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 337–343, 1998.

KREFT, M. E.; JELEN, P. Stability and Activity of beta-Galactosidase in Sonicated Cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as Affected by Temperature and Ionic Environments. **Food Microbiology and Safety**, v. 65, n. 8, p. 1364–1368, 2000.

KUMAR, D. J. M.; SURESH, K.; SARANYA, G. M.; et al. Production, optimization and characterization of α -Galactosidase by *Bacillus* sp. SPE10 and *Bacillus* sp. SPE15 Isolated from soy effluent. **European Journal of Experimental Biology.**, v. 2, n. 3, p. 774–780, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; IUCCI, L.; SARACINO, P.; GUERZONI, M. Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. **Food Chemistry**, v. 102, n. 2, p. 542–550, 2007.

LAZI, M. L.; VELJKOVI, V. B.; VU, J. I.; VRVI, M. M. Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 15, n. August 1992, p. 334–338, 1993.

LE BLANC, J. G.; GARRO, M. S.; SAVOY DE GIORI, G. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, alpha-galactosidase activity and fermentation products. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 119–23, 2004.

LE BLANC, J. G.; PIARD, J.-C.; SESMA, F.; DE GIORI, G. S. *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active alpha-galactosidase activity in the small intestine of rats. **FEMS microbiology letters**, v. 248, n. 2, p. 177–82, 2005.

LIU, C.; RUAN, H.; SHEN, H.; et al. Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology. **Journal of food science**, v. 72, n. 4, p. M120–5, 2007.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir de melaço de soja.**, 1999. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. DELLA; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 72–77, 2005.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS.** Brasília, 2013.

MARTIN, S.S., NARUM, J.A., CHAMBERS, K.H., 2001. Sugarbeet biochemical changes during pile storage. Part I. Sugars. **J. Sugar Beet Res.**, v. 38, p. 35–53, 2001.

MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; SILVA, L. F. Suco de acerola microfiltrado: avaliação da vida-de-prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 293–297, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry, Washington**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MUDGETTT, R. E.; MAHONEY, R. R. Kinetic properties of -D-galactosidase from *Lactobacillus fermenti*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 207–211, 1984.

MUJER, C. V.; RAMIREZ, D. A.; MENDONZA, E. M.; T. a-D-galactosidase deficiency in coconut endosperm: its possible pleiotropic effects in makapuno. **Phytochemistry**, v. 23, n. 4, n. New York, p. 893–894, 1984.

NAKATA, H.; SAKURAI, H.; NAGURA, T.; et al. Raffinose production using alpha-galactosidase from *Paraphaeosphaeria* sp. **Mycoscience**, v. 54, n. 4, p. 247–251, 2012. Elsevier B.V.

NAUMOV, D. G. Phylogenetic analysis of alpha-galactosidases of the GH27 family. **Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 463–476, 2004.

NARITA, S. K. et al. **United States Patents.** Tokyo, Japan., 1975.

NIH - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. The structure of alpha-galactosidase. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3065945/figure/F1/>>. Acesso em: 24/10/2013.

NUTRITECH.COM. Nutritech - price. Disponível em: <<http://www.nutriteck.com/galactosidase.html>>. Acesso em: 4/11/2014.

NUTRITECK®. Alpha-galactosidase. Disponível em: <<http://www.nutriteck.com/galactosidase.html>>. Acesso em: 30/7/2014.

OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V. M.; LIMA E BORGES, E. E. DE; et al. Purificação e caracterização de alfa-galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens*. **Sociedade de investigações florestais**, v. 29, n. 4, p. 535–543, 2005.

PAREDES-SABJA, D.; SARKER, M. R. Adherence of *Clostridium difficile* spores to CaCO₂ cells in culture. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. Pt 9, p. 1208–18, 2012.

PELENC, V.; REMAUD, M.; BITON, J.; et al. Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 77–85, 1993.

PLIHON, F.; TAILLANDIER, P.; STREHAIANO, P. Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 117–122, 1995.

POLETTI, C. I. A. **Caracterização de membranas de poliamida 66 preparadas pelo método de inversão de fases.**, 2010. Universidade de Caxias do Sul.

PORUBCAN, R. S.; YONAK, S. L. **Enzyme and Prebiotic Combinations for Enhancing Probiotic Growth and Efficacy.**, 2014b. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US20140170115?dq=Enzyme+and+Prebiotic+Combinations+for+Enhancing+Probiotic+Growth+and+Efficacy&hl=pt-BR&sa=X&ei=99K2VPrOHe7IsATSp4CgCQ&ved=0CCkQ6AEwAQ>>

REZENDE, S. T. DE; GUIMARÃES, V. M.; RODRIGUES, M. D. C.; FELIX, C. R. Purification and Characterization of an α -Galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. March, p. 195–202, 2005.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa**, n. ISSN 9192-0099, p. 1–12, 2005.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H.; MERÇON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 98–101, 2003.

RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEIROS, F. Utilización de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya. **Alimentaria**, v. 33, p. 127–132, 1995.

SANADA, C. T. N. **Produção de alpha-galactosidase a partir de vinhaça de soja**, 2009. Federal University of Parana.

SANADA, C. T. N.; KARP, S. G.; SPIER, M. R.; et al. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 476–483, 2009. Elsevier Ltd.

SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 1–6, 2005.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 39, n. 3, p. 213–9, 1998.

SCHAFFER, A.; ZHIFANG, G. **Alkaline alpha-galactosidase**. Israel., 2003. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US6607901?dq=Alkaline+alpha-galactosidase.&hl=pt-BR&sa=X&ei=qNO2VleFE8nZsATdmoK4DQ&ved=0CDAQ6AEwAg>>

SCHIFFMANN, R.; RIES, M.; TIMMONS, M.; FLAHERTY, J. T.; BRADY, R. O. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, n. 2, p. 345–54, 2006.

SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. **Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria**. In: **WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria. v. 2**. London: Blackie Academic and Professional, 1995.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2ª Edição ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2001.

SEKHAR, S.; BHAT, N.; BHAT, S. G. Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 349–354, 1999.

SHAALTIEL, Y.; BEN-MOSHE, T.; AZULAY, Y. Alkaline alpha galactosidase for the treatment of fabry disease. ,2011. Protalix Ltd.

SHANKAR, S. K.; MULIMANI, V. H. Alpha-galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 98, n. 4, p. 958–61, 2007.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–63, 2008.

SMID, B. E.; HOOGENDIJK, S. L.; WIJBURG, F. A; HOLLAK, C. E. M.; LINTHORST, G. E. A revised home treatment algorithm for Fabry disease: influence of antibody formation. **Molecular genetics and metabolism**, v. 108, n. 2, p. 132–7, 2013. Elsevier Inc.

STARBARD, N. **Beverage Industry Microfiltration**. Primeira E ed. Iowa, EUA.: Wiley-Blackwell, 2009.

SUPPLETE.COM. AOR Zymes - Pancreatic enzymes & alpha-galactosidase. Disponível em: <<http://www.supplete.com/product-p/aor04109.htm>>. Acesso em: 13/11/2014.

TODOROV, S.D., M. BOTES, S. T. Probiotic properties of *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions. **Journal of Applied Microbiology**, p. 103, 629, 2007.

TOGAWA, T.; TSUKIMURA, T.; KODAMA, T.; et al. Fabry disease: biochemical, pathological and structural studies of the α -galactosidase A with E66Q amino acid substitution. **Molecular genetics and metabolism**, v. 105, n. 4, p. 615–20, 2012. Elsevier Inc.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GOULAS, T. **Alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* and its use.**, 2014. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/CA2634273C?cl=en&dq=Alpha-galactosidase+from+bifidobacterium+bifidum+and+its+use.&hl=pt-BR&sa=X&ei=Rdq2VOwp09qwBlvTgagH&ved=0CCcQ6AEwAQ>>

UFRJ. Classificação das enzimas. Disponível em: <<http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/classificacao.pdf>>.

UNESP. Estaquiase. Disponível em: <<http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/imagens/estaquiase.GIF>>. Acesso em: 29/10/2013a.

UNESP. Rafinose. Disponível em: <<http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/imagens/rafinose.GIF>>. Acesso em: 29/10/2013b.

VEIGA, P. G.; VIOTTO, W. H. Fabricação de queijo petit suisse por ultrafiltração de leite coagulado, efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 267–272, 2001.

VENTURELLI, M. Automação de biorrefinarias de etanol de Segunda Geração. Disponível em: <<http://www.automacaoindustrial.info/automacao-biorrefinarias-etanol-segunda-geracao/>>. Acesso em: 3/8/2015.

VINCENT, S. F.; BELL, P. J. L.; BISSINGER, P.; NEVALAINEN, K. M. H. Comparison of melibiose utilizing baker's yeast strains produced by genetic engineering and classical breeding. **Letters in Applied Microbiology**, v. 101, p. 148–152, 1999.

VITACOST®. Gas Enzyme - Alpha galactosidase. Disponível em: <<http://www.vitacost.com/vitacost-gas-enzyme-alpha-galactosidase-300-galu-per-serving-120-chewable-tablets>>. Acesso em: 4/11/2014.

WATER, R.; BY, T.; EVALUATION, O.; et al. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 13, p. 78–87, 2008.

WEIDEMANN, F.; NIEMANN, M.; BREUNIG, F.; et al. Long-term effects of enzyme replacement therapy on fabry cardiomyopathy: evidence for a better outcome with early treatment. **Circulation**, v. 119, n. 4, p. 524–9, 2009.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. Seventh Ed ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

XIAO, M.; TANAKA, K.; QIAN, X. M.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium brevis* grown on raffinose. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 747–751, 2000.

YAMAGUISHI, C. T. **Processo biotecnológico para a produção de feijão desidratado com baixo teor de oligossacarídeos da família rafinose**, 2008. Federal University of Parana.

YERNOOL, D. et al. **Thermostable alpha-galactosidase and methods of use.**, 2000. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US6150171?dq=Thermostable+alpha-galactosidase+and+methods+of+use.&hl=pt-BR&sa=X&ei=Ed-2VL7ZIPXasASsmYLYAw&ved=0CB4Q6AEwAA>>

YOON, M. Y.; HWANG, H.-J. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of alpha-D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. **Food microbiology**, v. 25, n. 6, p. 815–23, 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existente. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZEMAN, L. J.; ZYDNEY, A. L. **Microfiltration and Ultrafiltration - Principles and Applications**. Primeira E ed. Nova Iorque: Marcel Dekker INC., 1996.

ANEXO A – PREPARO DE SOLUÇÕES

TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 100 mM pH 5,0

Foram adicionados 148 mL de solução de ácido acético 200 mM com 352 mL de acetato de sódio 200 mM, completou-se o volume para 1000 mL com água deionizada e homogeneizou-se. Verificou-se o pH e a solução foi acondicionada em frasco âmbar e armazenada sob refrigeração.

SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 200 mM

Dissolveram-se 16,4 g de acetato de sódio ($C_2H_3O_2Na$) (Acetato de sódio P.A., Vetec[®], Brasil) ou 27,2 g de acetato de sódio triidratado ($C_2H_5O_2Na.3H_2O$) em 500 mL de água deionizada. Avolumou-se com água deionizada para 1000 mL.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 200 mM

Transferiu-se 11,6 mL de ácido acético glacial (Ácido acético P.A. glacial, Vetec[®], Brasil) para balão de 1000 mL, já contendo 100 mL de água deionizada. Avolumou-se e a solução com água deionizada e esta foi armazenada em frasco âmbar sob temperatura de refrigeração.

SOLUÇÃO DE CARBONATO DE SÓDIO 0,5 M

Baseando-se na massa molecular do carbonato de sódio (105,9885 g/mol), foram pesados aproximadamente 52,9943 g de carbonato de sódio (Carbonato de sódio anidro P.A. Na_2CO_3 , Vetec[®], Brasil) e avolumado com tampão de acetato de sódio 100 mM em balão volumétrico de 1000 mL. A solução foi acondicionada em frasco âmbar e armazenada sob refrigeração.

ANEXO B – SOLUÇÕES PARA APLICAÇÃO DE ELETROFORESE SDS-PAGE

SDS-PAGE - Laemmli, 1970

- Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD)
- Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio.
- Cuidado: fazer uso de luvas, pois a acrilamida é neurotóxica.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Acrilamida mix, 30% - Armazenamento em frasco âmbar a 4° C.

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água milli-q	qsp 100 mL

Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8 – Armazenamento a 4° C.

Tris	18,15 g
Água milli-q	qsp 100 mL
Ajustar o pH com HCl	

Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8 – Armazenar a 4° C.

Tris	12,0 g
Água milli-q	qsp 100 mL
Ajustar o pH com HCl	

SDS, 10% - Armazenar à temperatura ambiente.

SDS	10 g
Água milli-q	qsp 100 mL

TEMED – Armazenar a 4° C.

É utilizado concentrado

Distribuir em alíquotas para evitar contaminação

Persulfato de amônio, 10% - Armazenar a -20° C, distribuído em alíquotas.

Persulfato de amônio	1 g
Água milli-q	qsp 10 mL

Tampão de amostra sem redução 2x – Armazenar a -20° C, distribuído em alíquotas.

Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8	0,5 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS, 10%	1,6 mL
Azul de bromofenol, 2%	0,2 mL
Água milli-q	0,9 mL

Tampão de amostra com redução 2x – Armazenar a -20° C, distribuído em alíquotas.

Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8	0,5 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS, 10%	1,6 mL
B-mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol, 2%	0,2 mL
Água milli-q	0,5 mL

Tampão corrida – Armazenar a 4° C.

Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Água milli-q	1000 mL

Gel de separação 12% - Para volume de 15 mL

Componentes	V (mL)
Água ultrapura	4,9
Solução de acrilamida 30%	6,0
1,5 M Tris (pH 6,8)	3,8
SDS 10%	0,15
Persulfato de amônio 10%	0,15
TEMED	0,006

Gel de empilhamento 5% - Para volume de 3 mL

Componentes	V (mL)
Água ultrapura	2,1
Solução de acrilamida 30%	0,5
1,0 M Tris (pH 8,8)	0,38
SDS 10%	0,03
Persulfato de amônio 10%	0,03
TEMED	0,003

ANEXO C – PATENTE DEPOSITADA PARA PRODUÇÃO DE α -GAL

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO GERAL
 15/05/2015 16:20 DEPR
 01515000864



BR 10 2015 011273 4

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI
 INSTITUTO NACIONAL
 DA PROPRIEDADE
 INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:
	Título do Documento:			1/3
Depósito de Pedido de Patente			Código:	Versão:
			EQ001	2
			Procedimento:	
			DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná
 1.2 Qualificação: Autarquia Federal
 1.3 CNPJ/CPF: 75095679/0001-49
 1.4 Endereço Completo: Rua João Negrão, 280 2º andar Curitiba/PR
 1.5 CEP: 80010-200
 1.6 Telefone: 41-33607441 1.7 Fax: 41-33607416
 1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

 continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO VINHAÇA DE SOJA
 COMO SUBPRODUTO/RESÍDUO INDUSTRIAL

 continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa