

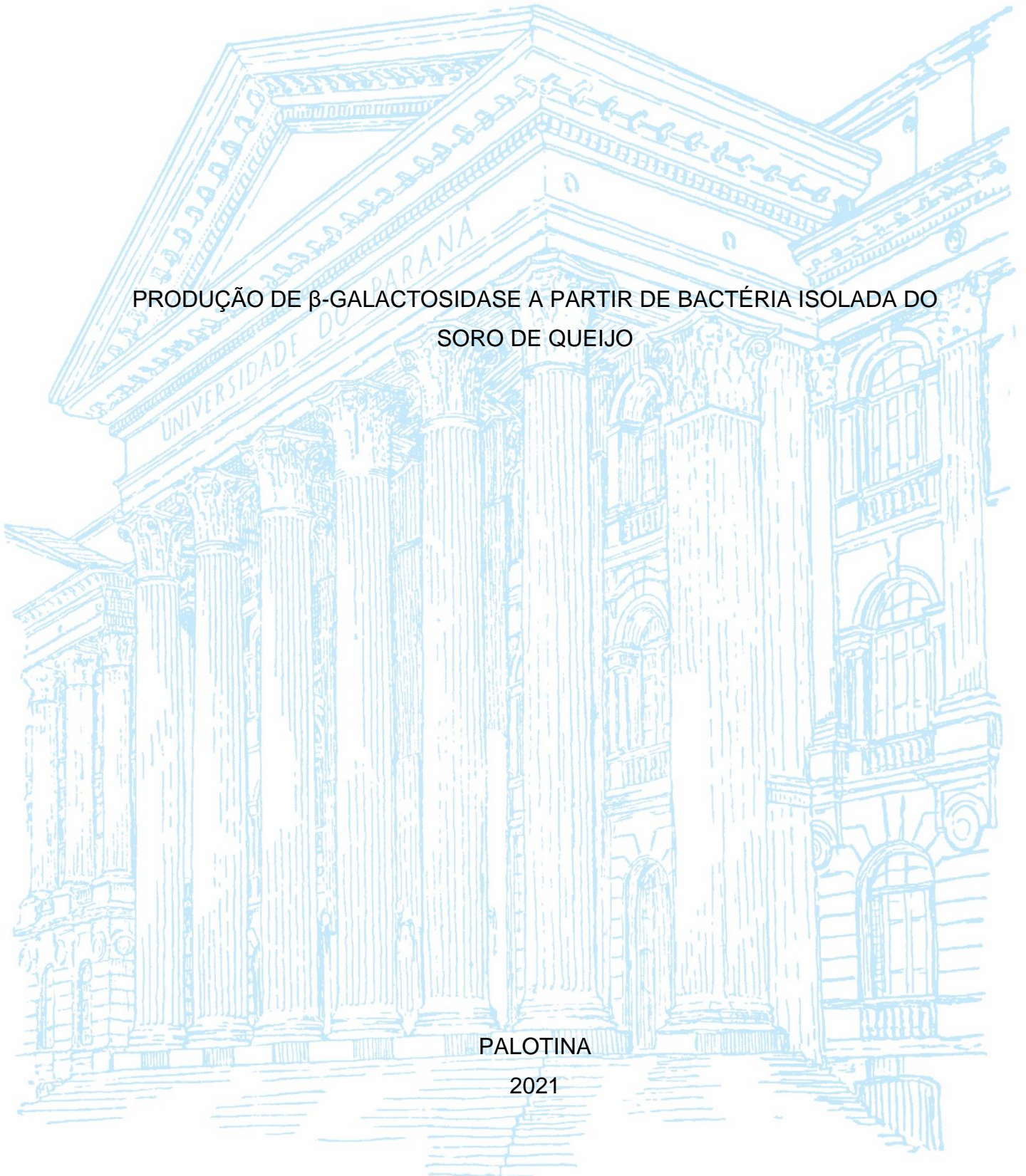
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

POLINE WILKE

PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE A PARTIR DE BACTÉRIA ISOLADA DO  
SORO DE QUEIJO

PALOTINA

2021



POLINE WILKE

PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE A PARTIR DE BACTÉRIA ISOLADA DO  
SORO DE QUEIJO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Ströher

PALOTINA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

## ATA DE REUNIÃO

Aos treze dias do mês de dezembro do ano de 2021, às vinte horas, na Sala virtual [h?ps://teams.microsoft.com/join/19%3aFykaC7Hwlhsv01o\\_q\\_ew5N0pu5icYd5xia?tzgDWqg1%40thread.tacv2/1636737109319?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22f89e20d1-e5da-4d00-bbb3-fe21963c7c73%22%7d](https://teams.microsoft.com/join/19%3aFykaC7Hwlhsv01o_q_ew5N0pu5icYd5xia?tzgDWqg1%40thread.tacv2/1636737109319?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22f89e20d1-e5da-4d00-bbb3-fe21963c7c73%22%7d) da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Produção de Beta-Galactosidase a partir de Bactéria Isolada do Soro de Queijo" apresentado pela discente Poline Wilke, orientada pela Prof.(a) Dr.(a) Raquel Stroher, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Prof. (a) Dr.(a) Raquel Stroher, nota: 98 (noventa e oito), Prof.(a) Dr.(a) Eliane Hermes, nota: 98 (noventa e oito), e Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: 98 (noventa e oito). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 98 (noventa e oito). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2021, às 21:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2021, às 21:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ELIANE HERMES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2021, às 21:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4112927** e o código CRC **04B145C7**.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Dra. Raquel Ströher, pela orientação, dedicação, paciência, amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Eliane Hermes e Prof. Dr. Isac George Rosset. Muito obrigada por aceitarem fazer parte da banca e se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

À minha família, pelo incentivo e por todo o apoio.

À Prof. Adriana por toda dedicação e auxílio na identificação do microrganismo.

Às Professoras Leidi e Eliane por terem permitido o uso do laboratório no decorrer dos experimentos.

Aos meus amigos, por toda ajuda e apoio, em especial à Cassia Ingrid e Karen.

À UFPR setor Palotina pela oportunidade de realizar mais esta etapa da minha formação acadêmica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

O soro de queijo é um subproduto das indústrias de laticínios e em sua composição há grande parte da lactose contida no leite. Uma das alternativas de aproveitamento do soro que vem sendo estudada é sua utilização como substrato para produção de enzimas, pois apresenta benefícios econômicos e ambientais. A enzima responsável por hidrolisar a lactose é a  $\beta$ -galactosidase, também conhecida como lactase. A fonte para produção da lactase pode ser de origem animal, microbiana ou vegetal, sendo que aquela extraída de fontes bacterianas tem apresentado diversas vantagens, como alta atividade, facilidade de fermentação e estabilidade. As bactérias que produzem lactase podem ser encontradas no soro de queijo, devido à quantidade de lactose presente. O objetivo do presente trabalho foi isolar uma bactéria produtora de lactase do soro de queijo e analisar a influência de diferentes temperaturas e concentrações de lactose na atividade dessa enzima. Para isso, a seleção dos microrganismos foi realizada utilizando-se a técnica de diluição em série de amostras do soro de queijo em água destilada e o microrganismo foi repicado em placas de petri contendo meio MRS (seletivo para *Lactobacillus*). Para avaliação da produção de enzima, foi realizado um planejamento experimental do tipo fatorial completo  $2^2$  com quadruplicata no ponto central, tendo como variáveis a temperatura (30, 37 e 43 °C) e a concentração de lactose adicionada ao meio (0, 35 e 70 g L<sup>-1</sup>); os frascos ficaram sob agitação a 150 rpm e as amostras eram retiradas para análise após 24, 48 e 72 h. Com o objetivo de extrair a enzima, o método utilizado foi agitação em vórtex com pérolas de vidro. A atividade enzimática foi quantificada através dos métodos ONPG e Lane-Eynon. A variável que apresentou maior efeito significativo foi a temperatura, cujos valores mais elevados alcançaram melhores resultados. O ensaio que apresentou maior atividade enzimática foi utilizando-se 0 g L<sup>-1</sup> de lactose, a 43 °C, após 24 h de reação, alcançando o valor de 1,97 U mL<sup>-1</sup>. O método Lane-Eynon também evidenciou a importância que a temperatura exerce na atividade da enzima. Dessa forma, foi possível realizar o isolamento de microrganismo produtor da enzima lactase do soro de queijo e avaliar a influência da temperatura e concentração de lactose na atividade da mesma.

Palavras-chave: lactase, microrganismo, atividade enzimática, subproduto.

## ABSTRACT

Cheese whey is a byproduct of dairy industries and its composition includes most of the lactose contained in milk. One alternative for whey utilization that has been widely studied is its use as a substrate for enzyme production, since it presents economic and environmental benefits. The enzyme that hydrolyzes lactose is  $\beta$ -galactosidase, also known as lactase. The source for lactase production can be from animal, microbial, or plant.  $\beta$ -galactosidase extracted from bacterial sources has shown a variety of advantages, like high activity, facility of fermentation, and stability. Lactase producing bacteria can be found in cheese whey, due to the amount of lactose present. The aim of this study was to isolate a lactase-producing bacteria from cheese whey and analyze the influence of different temperatures and lactose concentrations on the enzyme activity. For this purpose, the selection of microorganisms was performed using the technique of serial dilution of cheese whey samples in distilled water and the microorganism was plated on petri plates containing MRS medium (selective for *Lactobacillus*). To evaluate the enzyme production, an experimental design of the complete factorial type  $2^2$  was performed with quadruplicate in the central point, having as variables the temperature (30, 37 and 43 °C) and the lactose concentration added to the medium (0, 35 and 70 g L<sup>-1</sup>); the flasks were stirred at 150 rpm and the samples were removed for analysis after 24, 48 and 72 h. In order to extract the enzyme, the method used was vortex agitation with glass beads. The enzyme activity was quantified using the ONPG and Lane-Eynon methods. The variable that showed the most significant effect was the temperature, whose higher values achieved better results. The assay that reached the highest enzymatic activity was the one with 0 g L<sup>-1</sup> of lactose, at 43 °C, after 24 h of reaction, reaching a value of 1,97 U mL<sup>-1</sup>. The Lane-Eynon method also showed the importance of temperature on enzyme activity. Therefore, it was possible to isolate a lactase producing from cheese whey and evaluate the influence of temperature and lactose concentration on its activity.

Keywords: lactase, microorganism, enzyme activity, byproduct.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE SOB INSPEÇÃO, EM BILHÕES DE LITROS .....	14
FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DA LACTOSE NAS CONFIGURAÇÕES $\alpha$ E $\beta$ .....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURA NATIVA DA ENZIMA LACTASE ISOLADA DE <i>Penicillium sp</i> .....	20
FIGURA 4 - PLACA COM ÁGAR CLED NO MOMENTO DA INOCULAÇÃO (A) E APÓS 48 H DE CRESCIMENTO (B) .....	33
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE REPOSTA DA AE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 (A), 48 (B) e 72 (C) HORAS DE REAÇÃO .....	35
FIGURA 6 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO .....	36
FIGURA 7 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO .....	38
FIGURA 8 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO .....	39
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE REPOSTA DA AE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 (A), 48 (B) e 72 (C) HORAS DE REAÇÃO .....	42
FIGURA 10 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO .....	43
FIGURA 11 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO .....	45
FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE EYNON APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO .....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARAVTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO .....	25
TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2 <sup>2</sup> COMPLETO.....	27
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO .....	32
TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2 <sup>2</sup> COMPLETO PARA O MÉTODO ONPG.....	34
TABELA 5 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO.....	36
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO.....	37
TABELA 7 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO .....	37
TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO.....	38
TABELA 9 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO .....	39
TABELA 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO.....	40
TABELA 11 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2 <sup>2</sup> COMPLETO PARA O MÉTODO DE LANE-EYNON.....	41
TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO.....	43
TABELA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO ...	44
TABELA 14 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO.....	44
TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO.....	45
TABELA 16 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO.....	46
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AE média	- Atividade enzimática média
AE	- Atividade enzimática
BAL	- Bactérias ácido lácticas
$\beta$	- Beta
$F_{\text{calc}}$	- Valor de F calculado
$F_{\text{tab}}$	- Valor de F tabelado
GL	- Graus de liberdade
GOS	- Galacto-oligossacarídeos
HL	- Taxa de lactose consumida na reação de hidrólise
L	- Concentração de lactose adicionada ao meio de cultivo
MQ	- Média dos quadrados dos desvios
SQ	- Soma dos quadrados dos desvios
T	- Temperatura
TF	- Título de Fehling

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	12
1.2 OBJETIVOS .....	13
1.2.1 Objetivo geral .....	13
1.2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 PRODUÇÃO DE LEITE .....	14
2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO .....	15
2.3 SORO DE QUEIJO .....	16
2.4 LACTOSE.....	17
2.4.1 Intolerância à lactose.....	18
2.4.2 Hidrólise da lactose .....	19
2.5 ENZIMA B-GALACTOSIDASE .....	20
2.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LACTASE .....	22
2.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	25
3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO SORO DE QUEIJO .....	25
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO .....	25
3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS .....	25
3.5 TESTE DE PRODUÇÃO DE LACTASE .....	26
3.6 PROCESSO FERMENTATIVO .....	26
3.6.1 Preparo do inóculo .....	26
3.6.2 Condições de cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase .....	27
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
3.8 EXTRAÇÃO DA ENZIMA .....	28
3.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	28
3.10 HIDRÓLISE DA LACTOSE .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO .....	32
4.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO .....	33
4.3 PROCESSO FERMENTATIVO .....	33

4.3.1 Atividade enzimática .....	34
4.3.2 Hidrólise da lactose .....	41
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o início da industrialização do Brasil, por volta da década de 1950, a produção de leite no país deixou de ser somente para subsistência e passou a ser utilizada também como fonte de renda (MORAES; FILHO, 2017).

Com o aumento da produção de leite e a sua industrialização, configurou-se o setor de produtos lácteos, que é composto pelos segmentos produtores de leite e seus derivados (queijo, manteiga, iogurte, creme de leite, entre outros). São classificados baseados em sua composição, na tecnologia usada durante a fabricação, nas regulamentações, além de outros critérios. O Brasil ocupa a 4ª posição no mercado mundial de produção desse tipo de produto (GOMES, et al., 2017) e a região sul é a segunda maior produtora de leite a nível nacional, atrás apenas da região sudeste (MORAES; FILHO, 2017).

A indústria de laticínios produz efluentes com diferentes características dependendo dos produtos fabricados, e o processo de tratamento aplicado a esses efluentes depende de suas características (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). O soro da fabricação de queijos provoca um efeito poluidor se lançado indevidamente em corpos d'água devido ao fato de microrganismos consumirem alguns componentes do soro (como a lactose) utilizando oxigênio e, com isso, a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) aumenta consideravelmente (FRIGON et al., 2009).

O tipo de microrganismo presente no soro depende de muitos fatores: higienização correta durante o processo, qualidade do alimento do gado, contaminações durante a ordenha, e do tipo de queijo produzido (PERRY, 2004). As bactérias ácido lácticas (BAL) produzem diversas enzimas glicolíticas, proteolíticas, lipolíticas e hidrolíticas, dentre elas a  $\beta$ -galactosidase, enzima responsável pela hidrólise da lactose presente no leite e seus derivados. Algumas bactérias utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono e podem crescer no soro de queijo, uma vez que grande parte da lactose presente no leite fica no soro após a fabricação do queijo (LIMA et al., 2009).

As BAL típicas são gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, desprovidas de citocromos, de hábitos anaeróbicos, ácido-tolerantes, e estritamente fermentativas, sendo o ácido láctico o principal produto formado durante a fermentação do açúcar. As BAL descritas como típicas são *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*

(AXELSSON, 2006). Espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por exemplo, são conhecidos probióticos e, portanto, têm sido altamente estudadas como possíveis fontes para produção de  $\beta$ -galactosidase (SAQIB et al., 2017).

Desde a década de 1970, quando a primeira  $\beta$ -galactosidase isolada se tornou comercialmente utilizável, processos de hidrólise enzimática vêm sendo utilizados em produtos lácteos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Estudos sobre a produção dessa enzima utilizando o soro de queijo como substrato se tornam uma alternativa interessante, devido às propriedades nutricionais e funcionais deste efluente (MARTINS et al., 2013). Sendo assim, o soro de queijo pode ser visto como um efluente com grande carga poluidora ou, se reaproveitado para outros fins, como um subproduto de alto valor agregado.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

O soro de queijo é um subproduto dos laticínios e é gerado em grandes quantidades. Segundo Oliveira, Bravo e Tonial (2012), devido à alta carga de matéria orgânica presente no soro, este pode provocar um efeito poluidor se lançado indevidamente em corpos d'água, podendo levar à eutrofização e toxicidade dos corpos receptores. Portanto, é imprescindível que seja dada a destinação adequada para o soro, realizando o seu tratamento antes da disposição final (FRIGON et al., 2009).

Uma alternativa para o soro de queijo seria a reutilização do material, tendo em vista a composição rica em nutrientes, lipídeos, lactose, vitaminas e minerais que também estão presentes no leite, apresentando um grande potencial na geração de produtos de valor agregado (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Ainda, o soro de queijo pode ser usado na produção de bebidas lácteas (na sua forma original) ou pode ser processado e concentrado para a utilização em diversos segmentos, desde ingrediente alimentício até na produção de medicamentos (ALVES et al., 2014). Porém, o custo de implementação de uma planta para o processamento deste subproduto ainda é muito elevado e necessita de um grande volume de soro para justificar seu funcionamento (SILVA; BUENO; SÁ, 2017).

Especialmente em relação aos processos biotecnológicos, algumas alternativas têm sido exploradas para o reaproveitamento do soro de queijo, trazendo benefícios econômicos e ambientais. A produção de enzimas é uma das opções, que

visa a produção dos biocatalisadores utilizando substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais. Outra possibilidade é o isolamento de microrganismos presentes no soro, além de utilizá-lo como meio para crescimento dos mesmos (CARDOSO et al., 2017).

As bactérias que produzem a enzima lactase podem ser encontradas, por exemplo, no soro de queijo, devido à quantidade de lactose (aproximadamente 5%) presente no mesmo (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2007). Essa enzima pode ser obtida através de diversas fontes (plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras), no entanto a  $\beta$ -galactosidase extraída de fontes bacterianas tem apresentado diversas vantagens, como alta atividade, facilidade de fermentação e estabilidade (SAQIB et al., 2017; CUNHA et al., 2008).

Sendo assim, ao utilizar o soro de queijo como meio para produção da enzima lactase, ocorre a diminuição da lactose presente no efluente e, conseqüentemente, a redução de sua demanda bioquímica de oxigênio. Além disso, a vantagem de se produzir a enzima a partir do próprio meio em que ela se encontra, é que esta, por sua vez, já estaria mais adaptada às condições do meio do que uma enzima comercial, podendo alcançar melhores resultados.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a produção de  $\beta$ -galactosidase utilizando o soro de queijo como meio de cultivo.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Isolamento do microrganismo do gênero *Lactobacillus* proveniente de soro de queijo;
- Produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por processo fermentativo, avaliando as variáveis temperatura e concentração de lactose adicionada no meio;
- Quantificação da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase;
- Quantificação da taxa de lactose consumida na reação de hidrólise utilizando-se a  $\beta$ -galactosidase.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

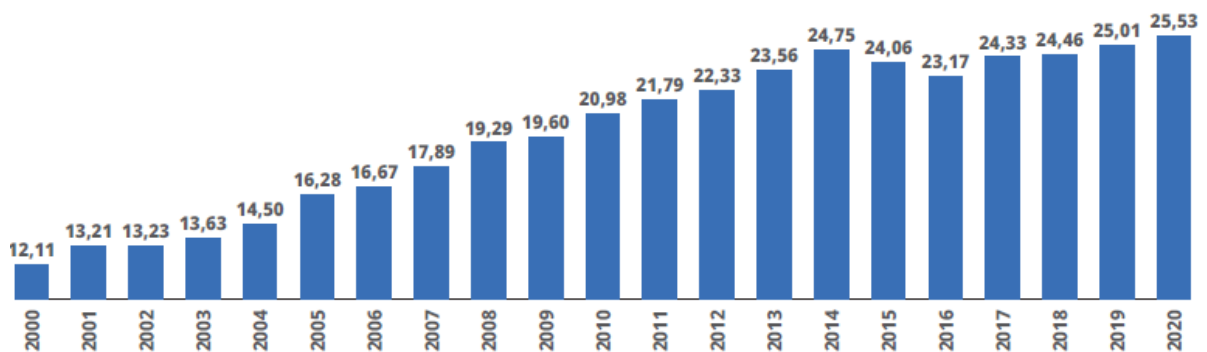
### 2.1 PRODUÇÃO DE LEITE

A cadeia produtiva de leite no Brasil possui diversos integrantes e gera um elevado valor agregado, emprega um grande contingente de mão-de-obra, além de entregar produtos considerados necessários para a alimentação humana (LEITE, 2020). Com importante participação na economia brasileira, contribui com a geração de emprego e renda no meio rural, empregando muitas vezes toda a família (ALVES et al., 2020).

A produção leiteira do país é muito heterogênea em relação ao tamanho do empreendimento, ao produto, às tecnologias empregadas e às características de produção, o que tem levado à redução do número de produtores, principalmente os de pequena escala. Em contrapartida, tem proporcionado a modernização da produção e, conseqüentemente, um aumento na produtividade do leite e seus derivados (LEITE, 2020).

O Brasil apresenta algumas vantagens em relação à produção de leite, quando comparado a outros países, como grandes áreas de pastagem e abundância de recursos naturais, mas ainda assim a participação do leite na balança de exportação apresenta um déficit de mais de 1 bilhão de reais (ALVES, 2020). A produção de leite vem aumentando significativamente a cada ano no país. A FIGURA 1 mostra a variação da produção das últimas duas décadas, atingindo mais de 25,5 bilhões de litros produzidos no ano de 2020.

FIGURA 1 - PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE SOB INSPEÇÃO, EM BILHÕES DE LITROS



FONTE: EMBRAPA (2021).

De acordo com dados do IBGE (2021), o Paraná é o segundo maior produtor de leite do Brasil, atrás apenas do estado de Minas Gerais. A região oeste ocupa a segunda posição dentre as mesorregiões do Estado, com a região Sudoeste ocupando a primeira posição (ALVES, 2020).

No ano de 2021, o item leite e derivados teve um aumento de 3,17% do índice de preços ao consumidor no acumulado dos meses do 1º semestre (janeiro a junho). A produção de queijos também teve um percentual expressivo, com um aumento de 6,39%, apresentando alta acima do Índice Geral da Inflação, que foi de 3,77% para o mesmo período (IBGE, 2021).

## 2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO

Os queijos são obtidos através da massa coagulada do leite, que é parcialmente dessorada, podendo ou não ser adicionadas especiarias, condimentos ou outras substâncias (GOMES et al., 2020). Na sua produção utiliza-se um método de transformação do leite em um produto de menor volume e fácil conservação, cuja conversão da matéria-prima não passa dos 20% (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001). Sendo assim, cerca de 80 a 90% do volume de leite utilizado nessa produção é representada pelo soro, produto que contém diversos nutrientes do leite (ALVES et al., 2014).

Os queijos podem ser classificados de diversas formas: pelo tipo de leite usado, de acordo com o grau de umidade, pela intensidade do sabor, pelo teor de gordura, pela consistência, entre outros (AMARANTE, 2015). Os queijos do tipo muçarela e Minas frescal são os mais amplamente produzidos e consumidos no Brasil (OLIVEIRA et al., 2017).

Assim como a produção de leite, a produção de queijo também vem aumentando significativamente ao longo dos anos. Segundo dados da EMBRAPA (2021), em 2020 a produção de queijos no Brasil absorveu mais de 8 bilhões de litros de leite, quase 3% a mais do que no ano anterior. Em relação ao cenário mundial, o Brasil é o quinto maior produtor de queijos do mundo, sendo o maior produtor os EUA, com 5,3 milhões de toneladas produzidas (EMBRAPA, 2021).

## 2.3 SORO DE QUEIJO

Entende-se por soro de queijo a porção aquosa obtida a partir da coagulação do leite durante o processo de fabricação do queijo ou da caseína (ALVES et al., 2014; BRASIL, 2005). A importância do soro se deve ao elevado volume gerado, mas também devido à sua rica composição nutricional (ALVES et al., 2014). Dentre os componentes presentes no soro, a lactose e as proteínas são os que mais se destacam, devido ao alto valor nutricional e aos aminoácidos presentes (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Há uma variação na composição do soro dependendo das características do leite utilizado e do tipo de queijo que é fabricado, porém estima-se que ele apresente cerca de 50% dos sólidos, 70% da lactose, 20% da proteína, e até 90% dos minerais presentes no leite (IRKIN, 2019).

A cada ano a produção de queijos no Brasil tem aumentado tornando-se necessária a busca por novas alternativas para a utilização do soro gerado (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). Segundo Misselwitz e colaboradores (2019), atualmente a produção de queijo representa a segunda maior indústria de fermentação a nível mundial, atrás apenas da produção de etanol.

A produção do queijo é uma das principais fontes de geração de efluentes com elevada carga orgânica na indústria de laticínios e o soro resultante é um dos principais responsáveis por isso devido à quantidade de lactose, proteínas e gorduras presentes (PRAZERES; CARVALHO; RIBAS, 2012). Segundo Poppi et al. (2010), um laticínio que produza em média 10.000 litros de soro por dia (quantidade produzida por um laticínio de médio porte) provoca a carga poluente equivalente a uma população de 5.000 habitantes.

A planta para industrialização do soro ainda tem um alto grau de complexidade e demanda um elevado investimento financeiro. Porém, no Brasil, grande parte do soro gerado vem de laticínios de pequeno e médio porte, tornando inviável o investimento para o beneficiamento desse subproduto (ALVES et al., 2014). Nesse sentido, os processos biotecnológicos que utilizem os resíduos e produtos agroindustriais têm sido consideradas alternativas promissoras. Um exemplo é a produção de enzimas utilizando substratos de baixo custo, que, além dos benefícios econômicos, também apresentam benefícios ambientais (CARDOSO et al., 2017).



e vitamina D (SANTOS; ROCHA; SANTANA, 2019). O teor de lactose presente no leite humano e bovino é superior ao de gorduras e proteínas e por isso ela tem um papel importante na nutrição, uma vez que é uma importante fonte de energia para o organismo e que, quando consumida, os níveis de glicemia são menores se comparados aos níveis proporcionados pelo consumo de glicose (SEKI; SAITO, 2012; PEREIRA et al., 2012).

Os carboidratos são absorvidos pelo intestino apenas na forma de monossacarídeos, ou seja, estruturas mais complexas (como os dissacarídeos) precisam ser previamente hidrolisados para serem absorvidos (WANES; HUSEIN; NAIM, 2019). A enzima responsável por realizar a hidrólise da lactose é a lactase. Porém, alguns indivíduos possuem uma deficiência dessa enzima resultando em má absorção deste carboidrato, e essas pessoas apresentam sintomas de intolerância à lactose (WANES; HUSEIN; NAIM, 2019).

#### 2.4.1 Intolerância à lactose

A lactose é o principal carboidrato consumido por crianças em fase de aleitamento materno e passou a ser consumido também por indivíduos em fase adulta. Com isso, surgiu-se a necessidade de transformar esse carboidrato em moléculas menores e digeríveis, papel da enzima lactase (SÉGUREL; BON, 2017).

A atividade da enzima lactase é máxima no momento do nascimento do indivíduo, porém ao longo da infância sua atividade é diminuída, provocando uma má absorção da lactose pelo organismo, o que leva à fermentação da mesma a ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ), metano ( $CH_4$ ) e gás hidrogênio ( $H_2$ ) (MATTAR; MAZO, 2010; MISSELWITZ et al., 2019). A não persistência da atividade da enzima lactase não é uma doença – tanto a persistência quanto a não persistência dela são fenótipos comuns em seres humanos (MISSELWITZ et al., 2019). Apesar disso, ela causa sintomas que podem interferir na qualidade de vida, como dor e espasmos abdominais, flatulência, borborigmos, sensação de inchaço no abdome, diarreia e, em alguns casos, até vômito (MATTAR; MAZO, 2010; FERREIRA-LAZARTE; MORENO; VILLAMIEL, 2018).

Em apenas cerca de um terço da população mundial a expressão da lactase persiste ao longo da vida. A porcentagem de indivíduos “lactase persistente” varia muito entre as populações, porém é mais frequente em indivíduos descendentes do

norte europeu, e da África (SÉGUREL; BON, 2017). Aproximadamente 70% da população mundial de diversas faixas etárias não apresenta a persistência da enzima ao longo da vida e em países asiáticos essa taxa pode chegar a 100% (FERREIRA-LAZARTE; MORENO; VILLAMIEL, 2018; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

Essa distribuição pode estar ligada ao habitual consumo de leite de populações pastoris ou agropastoris, resultado da domesticação de animais leiteiros em épocas pré-modernas. Porém outros fatores também podem influenciar, visto que nem sempre o consumo de leite está diretamente relacionado à persistência da enzima (SÉGUREL; BON, 2017).

As opções de tratamento para intolerantes à lactose incluem uma dieta pobre em lactose, utilização da enzima lactase de forma oral, consumo de prebióticos que produzam lactase bacteriana ou que adaptem a microbiota do cólon (MISSELWITZ et al., 2019). Sendo assim, é de extrema importância a busca de métodos que otimizem a produção dessa enzima para que os indivíduos intolerantes possam aproveitar os benefícios da lactose.

#### 2.4.2 Hidrólise da lactose

A fim de minimizar os problemas causados pela intolerância à lactose, indústrias alimentícias têm criado diferentes estratégias para obter produtos sem este açúcar. Além disso, nas indústrias que produzem queijo a lactose é considerado um resíduo que pode causar problemas ambientais, porém, se esta for hidrolisada, o soro do queijo pode ser utilizado na produção de diversos outros produtos (VASILEVA et al., 2016).

Para que ocorra a quebra da molécula de lactose, duas metodologias diferentes podem ser utilizadas: hidrólise ácida ou enzimática.

No método ácido (também chamado de método químico) o ajuste do pH pode ser feito diretamente através do ácido utilizado no tratamento e a temperatura pode chegar até a 150 °C por um curto período de tempo. Em alguns casos, esse método pode apresentar um alto grau de conversão, porém tem algumas desvantagens: só pode ser usado em reações que não tenham proteína, o produto final precisa ser neutralizado, o produto hidrolisado é marrom e necessita de um processo de descoloração antes de ser utilizado (o que eleva os custos de produção), além da formação de subprodutos indesejáveis e utilização de agentes químicos muito

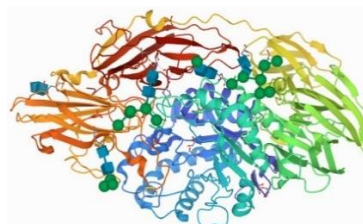
agressivos, como ácido sulfúrico, ácido nítrico ou ácido fosfórico (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

A utilização da enzima  $\beta$ -galactosidase tem se mostrado uma maneira eficiente de hidrolisar a lactose. A hidrólise enzimática da lactose é um dos processos biotecnológicos mais importantes na indústria alimentícia, devido aos benefícios que pode trazer: permite que pessoas intolerantes consumam produtos lácteos; formação de galacto-oligossacarídeos durante o processo de hidrólise que favorece o crescimento da microflora intestinal; melhora das características sensoriais dos alimentos com a lactose hidrolisada, como maior solubilidade (pois não ocorre a cristalização da lactose), maior poder adoçante, formação de monossacarídeos que são mais facilmente fermentáveis e maior biodegradabilidade do soro (JURADO et al., 2002). Desde a década de 1970, quando a primeira  $\beta$ -galactosidase isolada se tornou comercialmente utilizável, processos de hidrólise enzimática vêm sendo utilizados em produtos lácteos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

## 2.5 ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE

A enzima  $\beta$ -galactosidase também conhecida como lactase (E. C. 3.2.1.108), pertence ao grupo de enzimas hidrolíticas e catalisa a reação de hidrólise da lactose em glicose e galactose (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018). É a enzima comercial mais amplamente utilizada comercialmente e a base dos processos biotecnológicos mais desenvolvidos atualmente para aproveitar a lactose (KAUR et al., 2009). É composta por quatro cadeias iguais de polipeptídeos, cada uma constituída por 1023 aminoácidos combinados para formar um domínio estrutural bem definido (SAQIB et al., 2017). A fonte para produção da lactase pode ser de origem animal, microbiana (bactérias, fungos ou leveduras) ou vegetal (CUNHA et al., 2008; SAQIB et al., 2017). A FIGURA 3 mostra a estrutura de uma lactase isolada do fungo *Penicillium sp.*

FIGURA 3 - ESTRUTURA NATIVA DA ENZIMA LACTASE ISOLADA DE *Penicillium sp*



FONTE: ROJAS et al., 2004.

Essa enzima tem duas aplicações principais: remover a lactose de produtos lácteos e a produção de produtos galactosilados; sua produção mundial é estimada em cerca de 5,75 toneladas métricas por ano (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018). Outras aplicações da lactase são tratamento de efluentes de laticínios que apresentem lactose, aumentar o prazo de validade de produtos que contém lactose, produção de lactitol (fármaco utilizado como laxante), e produção de adoçantes contendo glicose e galactose (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

Devido à propriedade que a  $\beta$ -galactosidase tem de tanto hidrolisar a lactose quanto transgalactosilar a galactose (ou seja, a enzima transfere a unidade de galactose para um aceptor que contenha um grupo OH), ela vem sendo utilizada também para a produção de GOS, o que favorece o crescimento da microflora bacteriana intestinal (JURADO et al., 2002; HEIDTMANN et al., 2012). Além das diversas vantagens apresentadas pela lactase no organismo humano, estudos genéticos sugerem que indivíduos que apresentam a persistência dessa enzima possuem maior densidade mineral óssea e maior altura (MISSELWITZ et al., 2019).

Algumas propriedades dessa enzima, como pH e temperatura ótimos dependem da fonte ao qual são obtidas e do modo de preparo para ser comercializada (CAMPOS et al., 2009).

A “dosagem” das enzimas é feita através da atividade. A atividade enzimática das enzimas produzidas é altamente dependente do meio, principalmente do pH e da temperatura. Em geral, as enzimas possuem um valor ótimo de pH e de temperatura a qual apresentam atividade máxima e, conforme vão se afastando desses valores, a atividade vai diminuindo (TORRES, 2001). O crescimento do microrganismo em meio de cultura é o primeiro passo para a produção da enzima. Porém, para alcançar maiores taxas de hidrólise da lactose, a enzima deve ser extraída das células.

A etapa de separação e purificação de uma enzima é extremamente importante para obtenção da atividade desejável. Métodos mecânicos geralmente não são específicos, porém apresentam alta eficiência de extração (CAREVIĆ et al., 2015). Métodos químicos também podem ser utilizados nessa etapa, porém não são recomendados para o caso da lactase, visto que essa enzima é, muitas vezes, empregada em produtos alimentícios.

Diversas metodologias têm sido estudadas a fim de extrair enzimas intracelulares. Alguns métodos são de difícil aplicação em escala industrial e são mais indicados para uso em laboratório, como a sonicação e a prensa francesa; outros

podem ser usados em larga escala, como o moinho de bolas e a homogeneização em alta pressão (BURY; JELEN; KALÁB, 2001).

A utilização de pérolas de vidro e de areia de quartzo tem se mostrado uma técnica muito viável, pois tem alcançados bons resultados e apresentam baixo custo quando comparados com outras metodologias. Além disso, é possível estudar a eficiência de diferentes tamanhos de partículas e diferentes formas de agitação na extração enzimática (CAREVIĆ et al., 2015).

## 2.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LACTASE

Enzimas microbianas são usadas em diversas aplicações na indústria alimentícia além da produção de medicamentos, síntese de moléculas orgânicas, processos de biotransformação, entre outros (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

A escolha da melhor fonte a ser utilizada depende, além da disponibilidade, das condições de reação exigidas pelo processo – enquanto lactases bacterianas costumam ter maior atividade em pH na faixa de 2,5 a 5,4, lactases fúngicas trabalham melhor em pH entre 6,0 e 7,0 (SAQIB et al., 2017). A levedura *Kluyveromyces lactis* é uma das principais fontes comerciais de lactase. Seu pH ótimo varia entre 6,0 e 7,0 e a enzima produzida é intracelular (SAQIB et al., 2017).

A  $\beta$ -galactosidase extraída de fontes bacterianas tem apresentado diversas vantagens, como alta atividade, facilidade de fermentação e estabilidade (SAQIB et al., 2017).

As bactérias que produzem lactase podem ser encontradas, por exemplo, no soro de queijo, devido à quantidade de lactose presente. De acordo com Fitzsimons, Mulvihill e Morris (2007), o soro de queijo contém aproximadamente 5% de lactose, mesma quantidade presente no leite.

Espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são conhecidos probióticos e, portanto, têm sido altamente estudados como possíveis fontes para produção de  $\beta$ -galactosidase (SAQIB et al., 2017). Em 1983, Kim e Gilliland descobriram que a adição da bactéria *Lactobacillus acidophilus* ao leite melhorou consideravelmente a digestão da lactose em humanos pois esse microrganismo poderia fornecer uma fonte de lactase no trato intestinal.

Estudos sugerem que a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida a partir de bactérias ácido lácticas (como os *Lactobacillus*) é considerada neutra e adequada para

a hidrólise da lactose do leite assim como para a produção de galactooligosacarídeos (CAREVIĆ et al., 2015). As bactérias ácido lácticas representam um grupo diverso, com inúmeras aplicações industriais e, apesar de as cepas mais exploradas serem de espécies de *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, algumas lactases de *Lactobacillus* têm sido caracterizadas (CAREVIĆ et al., 2015).

Embora muitos microrganismos possam ser utilizados para a produção da enzima, apenas alguns são reconhecidos como seguros: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, and *Kluyveromyces lactis* (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

## 2.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A medida da atividade enzimática é possível mesmo com outras proteínas no meio devido à alta especificidade das mesmas. Então mesmo que haja outras enzimas no meio, é possível encontrar a atividade da enzima de interesse. Para isso, é medida a velocidade da reação que é expressa em (U), que é a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto em condições ótimas (TORRES, 2001).

Quando se opta por processos de hidrólise enzimática, uma série de fatores devem ser levados em consideração, como o pH do meio, temperatura máxima que a enzima escolhida permanece tendo atividade, tempo de contato admissível, concentração enzimática, entre outros (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

O pH afeta a atividade enzimática devido às modificações que promove nos grupos iônicos, principalmente de aminoácidos localizados no sítio ativo da enzima. Esse efeito do pH sobre a atividade enzimática pode ser notado na velocidade da reação e na estabilidade da enzima (FILHO; VITOLLO, 2018). Ao elevar a temperatura de uma reação, sua velocidade aumenta, devido ao aumento da energia cinética das moléculas. Porém, essa velocidade passa a decrescer em temperaturas muito elevadas, já que pode levar à desnaturação proteica. A partir de certa temperatura (que varia dependendo da enzima), a desnaturação passa a se sobressair sobre a ativação resultando em uma diminuição da velocidade de reação (FILHO; VITOLLO, 2018).

A atividade da enzima deve ser preservada, tanto durante o tempo em que ela fica armazenada, quanto durante sua utilização. Diferentes métodos podem ser utilizados para quantificar a atividade de uma enzima. Alguns exemplos são o método

das velocidades iniciais, método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose e ONPG. Dentre eles, o método mais utilizado é o ONPG, porém os reagentes utilizados para essa metodologia são relativamente caros.

Outra metodologia que pode ser utilizada para avaliar o comportamento da enzima lactase é o método titulométrico de Lane-Eynon, método recomendado pela Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006) para quantificação de lactose presente em amostras, que se baseia na redução de um volume conhecido de reagente de Fehling em que o ponto final da titulação é indicado pelo azul de metileno reduzido por um excesso de açúcar redutor. Ao final da titulação, o líquido passa de azul para incolor, mas é possível notar a presença de um precipitado vermelho tijolo devido ao fato de que os sais cúpricos, em solução tartárica alcalina, transformam-se em sais cuprosos vermelhos que precipitam (DEMIATE et al., 2002).

É um método de fácil aplicação e que, por quantificar a lactose, poderia ser utilizado para avaliar a atuação da lactase na hidrólise da lactose. Através da diferença de lactose presente no meio antes e depois da ação da enzima, é possível calcular quantidade em g de lactose consumidas por unidade de tempo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Química Geral e de Cinética e Biorreatores da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina.

#### 3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo utilizado nos experimentos foi obtido de um laticínio localizado no município de Palotina, região oeste do Paraná. A indústria recebe diariamente cerca de 65 mil litros de leite para a produção de variados tipos de queijos. As amostras foram coletadas em frascos plásticos e, até o momento do uso, ficaram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

#### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO

A TABELA 1 apresenta as metodologias utilizadas para a caracterização do soro de queijo.

TABELA 1 - METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO

Parâmetros	Metodologia	Referência
pH	Potenciometria	APHA (2005)
Proteínas (%)	Espectrofotometria	Bradford (1976)
Umidade (%)	Gravimetria	Instituto Adolfo Lutz (2005)
Cinzas (%)	Gravimetria	Instituto Adolfo Lutz (2005)
Lactose (%)	Titulometria	BRASIL (2006)
Lipídios (%)	Gravimetria	Bligh; Dyer (1959)

FONTE: O autor (2021).

#### 3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A seleção do microrganismo foi realizada utilizando-se a técnica de diluição em série de amostras do soro de queijo em água destilada. A inoculação foi feita em placas de Petri contendo o meio de cultura MRS (Man Rogosa & Sharpe, Acumedia – 7406), seletivo para *Lactobacillus*. Alíquotas de 100 µL das diluições com concentrações 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram inoculadas, em triplicata, utilizando-se o método de espalhamento em placas de Petri. As placas foram mantidas a 37 °C por 6 dias

para o crescimento do microrganismo e aquelas que apresentaram colônias bem definidas foram selecionadas para a realização do isolamento. Em seguida, as culturas com crescimento evidenciado foram plaqueadas por estrias e incubadas, novamente, sob as mesmas condições. As culturas que ainda não estavam puras foram plaqueadas novamente em estrias para tentar o isolamento novamente; este procedimento foi repetido até que fossem obtidas placas com cultura pura.

### 3.5 TESTE DE PRODUÇÃO DE LACTASE

Foi realizado um teste qualitativo de produção da enzima lactase antes de seguir para as etapas seguintes. Uma alçada do microrganismo crescendo na placa com o meio MRS foi transferida para uma placa de Petri contendo Ágar CLED. O método é recomendado pela ANVISA (2004) para o isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras de urina, onde organismos que fermentam lactose baixam o pH e mudam a cor do meio de verde para amarelo, podendo assim verificar se o microrganismo é lactose negativa ou positiva.

### 3.6 PROCESSO FERMENTATIVO

#### 3.6.1 Preparo do inóculo

O microrganismo selecionado neste estudo foi repicado em placas de Petri com meio MRS e incubado em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h para ativação. Passado este tempo, 2 alçadas das colônias foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL com o meio MRS de propagação de inóculo. Os frascos eram colocados em agitador-incubador shaker da marca CIENLAB, modelo CE-725/R a 180 rpm e 37 °C por 24 h. Após esse período, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620 nm e, estando a leitura na faixa de  $1,0 \pm 0,1$ , prosseguia-se para os ensaios de cultivo inoculando 10% (v/v) do volume desse inóculo em 50 mL do respectivo meio.

### 3.6.2 Condições de cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase

50 mL do soro foi esterilizado a 121 °C por 15 min e em seguida colocado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, para ser utilizado como fonte de substrato na fermentação dos *Lactobacillus*.

Foram analisadas diferentes faixas de temperatura e diferentes concentrações de lactose adicionadas ao meio para obter-se a otimização da produção da enzima desejada. Para isso, foram testadas as temperaturas de 30, 37 e 43 °C, pois estão próximas à temperatura de crescimento ótimo desse microrganismo, conforme encontrado na literatura (BURY; JELEN; KALÁB, 2001; TODOROV; DICKS, 2005; DAGBALI; GOKSUNGUR, 2008; MOZUMDER et al., 2012). Em relação à concentração de lactose adicionada ao meio, também foram testados três diferentes níveis, conforme encontrado em estudos anteriores: 0, 35 e 70 g L<sup>-1</sup> (DAGBALI; GOKSUNGUR, 2008; MANERA et al., 2011; MOZUMDER et al., 2012). Os frascos ficaram sob agitação a 180 rpm e amostras eram retiradas após 24, 48 e 72 h, para os ensaios de rompimento celular.

### 3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um planejamento experimental do tipo 2<sup>2</sup> com repetição no ponto central, como mostra a TABELA 2:

TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup> COMPLETO

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura (°C)	Lactose (g L <sup>-1</sup> )
1	30 (-1)	0 (-1)
2	43 (+1)	0 (-1)
3	30 (-1)	70 (+1)
4	43 (+1)	70 (+1)
5	37 (0)	35 (0)
6	37 (0)	35 (0)
7	37 (0)	35 (0)
8	37 (0)	35 (0)

FONTE: O autor (2021).

De acordo com Teófilo e Ferreira (2005), através de planejamentos fatoriais com ponto central é possível obter uma boa estimativa dos erros de um experimento além de ser possível avaliar a significância dos efeitos. Além disso, segundo os autores, outras vantagens desse tipo de planejamento são que “o risco de perder a relação não linear entre os intervalos é minimizado e é possível estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste” (TEÓFILO; FERREIRA, 2005, p. 341).

### 3.8 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

Com o objetivo de extrair a enzima foram centrifugados 15 mL do caldo fermentado a 6500 rpm por 10 min. Em seguida, o pellet foi lavado com tampão fosfato 1M (pH 6,8) e centrifugado novamente. O novo pellet foi então ressuscitado em 5 mL de tampão fosfato.

Para os ensaios de rompimento celular utilizando pérolas de vidro foi utilizada a metodologia proposta por Sangwan e colaboradores (2014) com modificações. Para isso, 10 g de pérolas de vidro foram adicionadas ao frasco com a suspensão celular. A amostra foi agitada em agitador tipo vórtex por 10 ciclos, sendo que cada ciclo corresponde a 1 min de agitação e 30 s em banho de gelo para evitar a desnaturação da enzima. A solução foi centrifugada a 6500 rpm por 10 min e o sobrenadante foi armazenado.

### 3.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após o rompimento celular, a suspensão obtida foi utilizada para a realização dos testes de atividade enzimática pelo método ONPG.

A metodologia de quantificação de atividade enzimática através do método *Orto*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) foi descrita por Lederberg (1950). Quando hidrolisado, o ONPG (que possui estrutura semelhante à da lactose), forma galactose e ONP (composto de coloração amarela que, ao contrário do ONPG, absorve a luz em 420 nm); portanto, alterações no valor da absorbância da amostra, comparada com o padrão, indicam a variação na atividade enzimática.

Primeiramente foi preparada uma solução padrão de *o*-nitrofenol para obter a curva de calibração, seguindo metodologia proposta pelo Food Chemicals Codex (1981). Foram transferidos 139 mg de *o*-nitrofenol para um frasco volumétrico de 1000

mL, onde foi dissolvido em 10 mL de álcool 95%; o volume foi diluído com água e misturado. Porções de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 mL dessa solução foram pipetadas e transferidas para frascos volumétricos de 100 mL, e foram diluídas até o volume com solução de bicarbonato de sódio a 1%. Assim, as diluições continham, respectivamente, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,12 e 0,14  $\mu\text{mol}$  de *o*-nitrofenol por mL. Foi determinada a absorvância de cada diluição a 420 nm em uma célula de 1 cm em espectrofotômetro, usando água como branco. Foi plotado um gráfico de absorvância *versus*  $\mu\text{mol}$  de *o*-nitrofenol, e obteve-se uma linha reta, gerando uma equação que será utilizada para obter a concentração de *o*-nitrofenol presente nas amostras.

A fim de encontrar o coeficiente de extinção dessa diluição, foi feita a divisão da absorvância de cada diluição por  $\mu\text{mol}$  de *o*-nitrofenol, e calculada a média dos valores obtidos.

Para o preparo do substrato, foi preparada uma solução de ONPG 3 mM preparados em tampão fosfato (pH 7,0). Em seguida, foi colocado em um microtubo 780  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 110  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. As amostras foram deixadas em banho metabólico do tipo Dubnoff a 30 °C para equilibrar a temperatura. Então adicionou-se 110  $\mu\text{L}$  da solução de ONPG. Após 1 minuto a reação foi interrompida adicionando 220  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 1 M. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/Visível Nanodrop2000 (ThermoScientific) com  $\lambda = 405$  nm. Para o branco, foi feito o mesmo procedimento colocando-se água destilada no lugar da amostra.

A atividade enzimática foi calculada seguindo a lei de Lambert-Beer, conforme apresentado na equação 1:

$$A = \epsilon_{ONPG} \times L \times C_{ONPG} \quad (1)$$

onde  $A$  é a absorvância da amostra lida no espectrofotômetro,  $\epsilon_{ONPG}$  é o coeficiente de extinção molar do ONPG ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ),  $L$  é o caminho ótico (cm) e  $C_{ONPG}$  é a concentração de ONPG ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ).

Como houve uma diluição do extrato enzimático em relação ao volume final, deve-se usar um fator de diluição  $V_a/V_f$  onde  $V_f$  é o volume final do teste e  $V_a$  é o volume inicial da amostra. Sendo assim, pode-se encontrar a concentração de ONPG através da equação 2:

$$C_{ONPG} = \frac{A \times V_f}{\epsilon_{ONPG} \times L \times V_a} \quad (2)$$

A atividade volumétrica pode então ser calculada através da equação 3:

$$A_v = \frac{C_{ONPG}}{t} \quad (3)$$

Para isso,  $t$  (tempo da reação, em min) é igual a 1 min,  $V_f = 1,22$  mL,  $V_a = 0,11$  mL,  $\epsilon_{ONPG} = 3,1 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$  e  $L = 1$  cm. Uma unidade de atividade enzimática ( $U_{ONPG}$ ) foi definida como a quantidade de  $\mu\text{mol}$ s de ONPG que reagem em 1 min nas condições de ensaio.

### 3.10 HIDRÓLISE DA LACTOSE

Também foi realizada a hidrólise da lactose, a fim de analisar o comportamento da enzima em um meio com a adição desse açúcar. A quantificação de glicídios redutores foi realizada pelo método Lane-Eynon, recomendado pela Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006), e todas as soluções utilizadas foram preparadas seguindo essa mesma instrução.

Primeiro foi realizada a padronização das soluções de Fehling A e B utilizando 0,5 g de glicose previamente seca em estufa a 70 °C durante 1 h.

Foram preparados tubos de ensaio contendo 9 mL de uma solução sintética de lactose a 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ), preparada em tampão fosfato de potássio (pH 7). A esses tubos foi adicionado 1 mL da suspensão enzimática obtida após o rompimento celular e então foram colocados em banho termostático com temperatura ajustada a 37 °C por 15 min.

Após esse tempo, as amostras foram colocadas em balão volumétrico de 250 mL ao qual foram adicionados 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL de solução acetato de zinco a 30%; o volume foi completado com água destilada. A solução foi deixada em repouso por alguns minutos para sedimentar e em seguida filtrada em papel filtro. O filtrado foi recebido em erlenmeyer de 250 mL e transferido para bureta de 25 mL.

Em erlenmeyer de 125 mL eram adicionados 5 mL de cada uma das soluções de Fehling A e B e 40 mL de água destilada. Esta solução era aquecida em placa

aquecedora até ebulição e então começava a titulação, gotejando a amostra sem agitação até que o líquido ficasse levemente azulado. Então, sem parar a titulação, era adicionada uma gota de azul de metileno a 1%. A titulação acaba quando há a descoloração do indicador – o líquido fica transparente com um precipitado vermelho-tijolo.

Por meio da quantidade de solução utilizada na titulação, foi calculada a quantidade de glicídios redutores presentes em cada amostra, conforme mostra a equação 4, onde TF é o título de Fehling (obtido pela padronização das soluções de Fehling com a glicose), V é o volume gasto na titulação em mililitros e m é a massa da amostra em gramas:

$$\% \text{ de glicídios redutores em lactose} = \frac{100 \times 250 \times \left(\frac{TF}{2}\right)}{V \times m} * 1,39 \quad (4)$$

Uma unidade de taxa de lactose consumida na reação de hidrólise com a lactase (HL) foi definida como a quantidade de lactose que a enzima é capaz de consumir por minuto de reação, através da equação 5:

$$HL_{\text{média}} = \frac{QLi - QLf}{t} \quad (5)$$

onde QLi é a quantidade inicial de lactose presente no meio, QLf a quantidade final de lactose presente no meio e t é o tempo de reação.

## 4 RESULTADOS / ANÁLISE DOS DADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO

A TABELA 3 apresenta os valores obtidos na caracterização do soro de queijo em estudo, bem como valores encontrados na literatura para esse efluente.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO

Parâmetros	Efluente em estudo	Teixeira; Fonseca (2008)	Nery et al. (2008)	Bald et al. (2014)
pH	6,30	6,19	-	5,32
Proteína solúvel (%)	1,91	0,84	2,24	0,86
Umidade (%)	94,16	93,67	93,39	94,35
Cinzas (%)	0,47	0,47	0,47	0,52
Lactose (%)	3,14	4,42	3,44	4,84
Lipídios (%)	0,14	0,77	0,46	0,27

FONTE: O autor (2021).

A composição desse tipo de efluente pode variar em função dos processos empregados na produção do queijo, das características do leite utilizado, e do tipo de queijo fabricado (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Os parâmetros pH, proteína solúvel, umidade e cinzas encontram-se dentro do intervalo apresentado na literatura para o soro proveniente da produção de queijos. Quanto às diferenças observadas para os outros parâmetros quando comparados os dados obtidos neste estudo e os dados encontrados na literatura, estas podem ser devido a diversos fatores, como o processamento, o tipo de queijo utilizado, ao armazenamento, entre outros.

Em relação ao teor de lactose ter sido menor aos outros estudos comparados, isso pode ter ocorrido pelo fato de as análises não terem sido feitas imediatamente após a coleta, e o soro ter sido armazenado. Durante o tempo de armazenamento, partículas de lactose podem cristalizar, dependendo das condições (FITZPATRICK et al., 2007). Além disso, na fabricação de alguns tipos de queijo a degradação da lactose ocorre nas fases iniciais e de maneira mais rápida, o que explica as diferenças nos teores de lactose obtidos (PERRY, 2004).

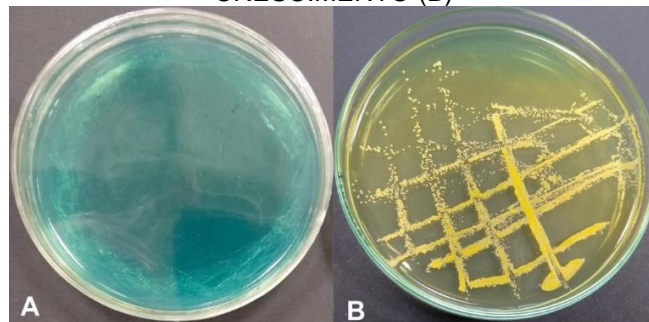
O soro utilizado neste estudo é proveniente da produção de diversos tipos de queijo (muçarela, parmesão, provolone, prato, coalho). Os queijos tipo parmesão e prato são considerados “gordurosos” por ter alto teor de lipídeos (PERRY, 2004) e isso pode explicar o teor menor de lipídeos no efluente utilizado neste estudo. Nery e

colaboradores (2008), por exemplo, utilizaram o soro proveniente da produção de queijo tipo muçarela, considerado normalizado em teor de gordura e, portanto, fica mais gordura no soro.

#### 4.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO

A fim de prosseguir com os experimentos, foi realizado um teste de produção de lactase utilizando o ágar CLED. A bactéria selecionada para realização dos experimentos foi a que, após 48 h de crescimento, mudou a coloração do meio de azul para amarelo, como mostra a FIGURA 4.

FIGURA 4 - PLACA COM ÁGAR CLED NO MOMENTO DA INOCULAÇÃO (A) E APÓS 48 H DE CRESCIMENTO (B)



FONTE: O autor (2021).

Na composição do meio é utilizado um indicador de pH, o azul de bromotimol, para diferenciar os bacilos capazes ou não de utilizar a lactose. Os microrganismos capazes de fermentar esse açúcar reduzem o pH do meio, levando à mudança de coloração de azul para amarelo.

#### 4.3 PROCESSO FERMENTATIVO

As amostras obtidas a partir do planejamento experimental retiradas nos tempos de fermentação 24, 48 e 72 h foram submetidas aos ensaios de rompimento celular por meio de pérolas de vidro para extração enzimática. Após, para cada amostra quantificou-se a atividade enzimática pelo método ONPG, e a taxa de lactose consumida pelo método de Layne-Eynon.

#### 4.3.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática média (AE média), para o método ONPG foi obtida a partir da média aritmética das triplicatas realizadas para medida de atividade enzimática em cada ensaio. Foram analisados os efeitos de diferentes temperaturas (T) e concentrações de lactose (L) utilizadas.

A TABELA 4 mostra a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e o resultado de atividade enzimática média obtido.

TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup> COMPLETO PARA O MÉTODO ONPG

Ensaio	Variáveis		AE média (U mL <sup>-1</sup> )		
	Temperatura (°C)	Lactose (g L <sup>-1</sup> )	24 h	48 h	72 h
1	30 (-1)	0 (-1)	1,631 ± 0,10	0,671 ± 0,02	0,726 ± 0,17
2	30 (+1)	70 (-1)	0,593 ± 0,06	0,860 ± 0,09	0,519 ± 0,20
3	43 (-1)	0 (+1)	1,965 ± 0,79	1,182 ± 0,07	1,519 ± 0,08
4	43 (+1)	70 (+1)	1,486 ± 0,05	1,858 ± 0,24	0,762 ± 0,04
5	37 (0)	35 (0)	0,673 ± 0,02	0,366 ± 0,05	0,161 ± 0,01
6	37 (0)	35 (0)	0,946 ± 0,20	0,450 ± 0,02	0,246 ± 0,01
7	37 (0)	35 (0)	1,156 ± 0,02	0,372 ± 0,03	0,382 ± 0,02
8	37 (0)	35 (0)	1,088 ± 0,08	0,487 ± 0,01	0,347 ± 0,01

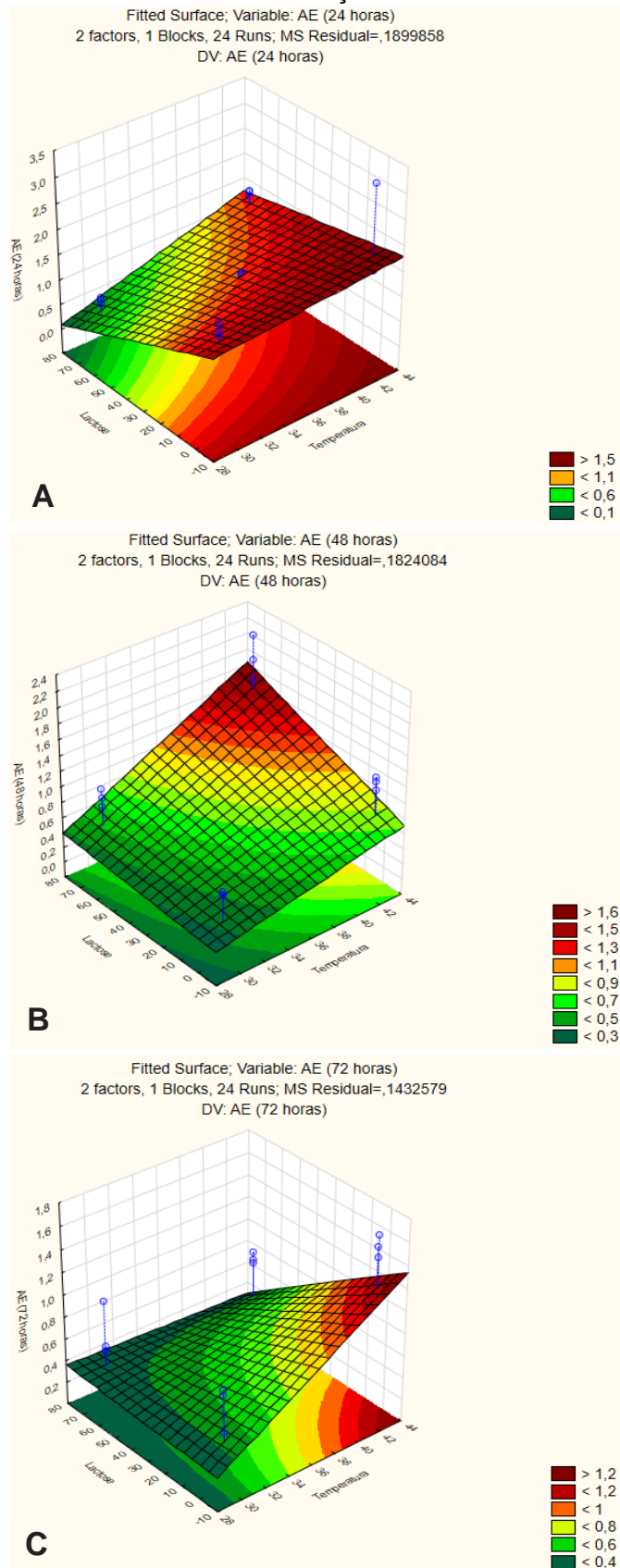
FONTE: O autor (2021).

A análise da tabela mostra que o melhor resultado foi obtido no ensaio 3, que corresponde à temperatura de 43 °C sem a adição da lactose, após 24 h de reação, o qual apresentou AE média de aproximadamente 1,97 U mL<sup>-1</sup>.

Na FIGURA 5 é apresentada a superfície de resposta, em cada tempo considerado.

Observa-se que a superfície de resposta para cada tempo de reação apresentou características distintas, mostrando que neste tratamento o tempo interferiu na atividade.

FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE REPOSTA DA AE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 (A), 48 (B) e 72 (C) HORAS DE REAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 24 horas estão apresentadas na TABELA 5, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em *itálico* mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 5 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>1,181028</i>	<i>0,089103</i>
T	<i>0,032604</i>	<i>0,288494</i>	<i>0,251280</i>
L	<i>0,006820</i>	<i>-0,379536</i>	<i>0,251652</i>
T x L	<i>0,279625</i>	<i>0,139829</i>	<i>0,251652</i>

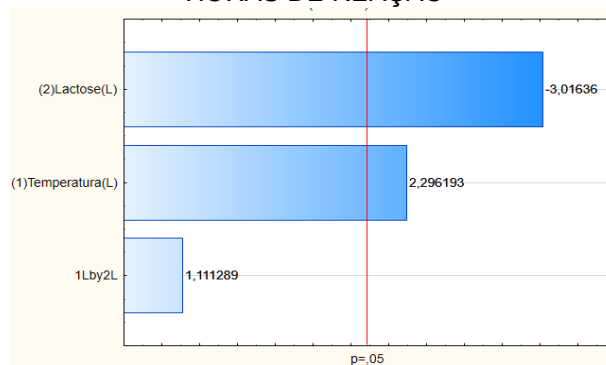
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,43829$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, verifica-se que apenas a interação entre as variáveis não foi significativa. A temperatura e o teor de lactose possuem influência na atividade enzimática da lactase no intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 6, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 6 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO



Fonte: O autor (2021).

Pelo gráfico, é possível observar que a variável que possui maior influência é a concentração de lactose, seguida da temperatura, pois encontram-se à direita da linha vermelha. A concentração de lactose tem influência negativa na atividade

enzimática, o que indica que quanto menor seu valor, mais tende a aumentar a atividade da enzima.

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 6. A partir da análise de variância do sistema, comparando-se  $F_{calc}$  com  $F_{tab}$ , é possível afirmar se o modelo proposto é válido e se os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais, caso  $F_{calc} > F_{tab}$ . Desta forma, o modelo proposto é válido sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{calc}$	$F_{tab}$
<b>Regressão</b>	2,964894	3	0,988298	5,201957	3,098391
<b>Erro</b>	3,799716	20	0,189986		
<b>Total</b>	6,764609	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para atividade enzimática através das variáveis estudadas, como mostra a equação 4:

$$AE = 0,725752 + 0,022872T - 0,033278L + 0,000615T \times L \quad (5)$$

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 48 horas estão apresentadas na TABELA 7, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 7 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coeficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>0,767292</i>	<i>0,087308</i>
T	<i>0,010371</i>	<i>0,348267</i>	<i>0,246218</i>
L	0,094884	0,216153	0,246582
T x L	0,334457	0,121940	0,246582

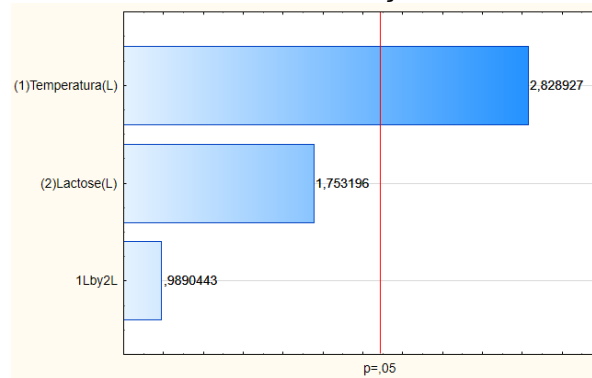
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,37607$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, verifica-se que, dentre as variáveis estudadas, apenas a temperatura mostrou-se significativa no intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 7, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 7 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

Pelo gráfico, é possível observar que a única variável que possui influência é a temperatura, pois encontra-se à direita da linha vermelha, com influência positiva na atividade enzimática, o que indica que quanto maior seu valor, mais tende a aumentar a atividade neste ensaio.

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 8. O modelo proposto é válido, uma vez que  $F_{calc} > F_{tab}$ , sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{calc}$	$F_{tab}$
Regressão	2,198884	3	0,732961	4,018244	3,098391
Erro	3,648168	20	0,182408		
Total	5,847052	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para atividade enzimática através das variáveis estudadas, como mostra a equação 5:

$$AE = -0,719771 + 0,034819T - 0,013388L + 0,000536T \times L \quad (6)$$

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 72 horas estão apresentadas na TABELA 9, juntamente com os

valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em *itálico* mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 9 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>0,593140</i>	<i>0,077374</i>
T	0,084510	0,198046	0,218201
L	0,075135	-0,205122	0,218524
T x L	0,127947	-0,173519	0,218524

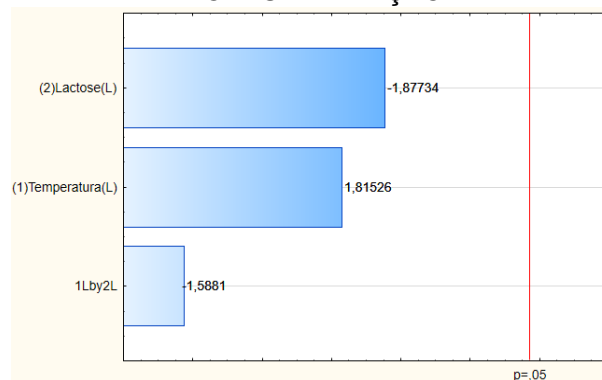
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,31838$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, verifica-se que nenhuma das variáveis estudadas foi significativa no intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de correlação obtido foi baixo ( $R^2 = 0,31838$ ) indicando que este pode não ser o modelo adequado para analisar o tratamento em questão.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 8, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 8 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 10. O modelo proposto é válido, uma vez que  $F_{calc} > F_{tab}$ , sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

TABELA 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA O MÉTODO ONPG APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	1,338266	3	0,446089	3,113886	3,098391
Erro	2,865158	20	0,143258		
Total	4,203425	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para atividade enzimática através das variáveis estudadas, como mostra a equação 6:

$$AE = -1,28822 + 0,05716T + 0,02198L - 0,00076TxL \quad (7)$$

Através dos dados analisados nota-se que, em relação à concentração de lactose, esta teve maior influência após 24 horas de reação e após esse tempo ela não se mostrou significativa no intervalo de confiança de 95%. Isso pode ocorrer pois a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS) é altamente influenciada pela concentração inicial de lactose, devido à maior disponibilidade de receptores de galactosil, e diminuição da disponibilidade de água (SANGWAN et al., 2014). Ainda assim, esta variável apresentou influência negativa na atividade enzimática, ou seja, menores concentrações de lactose levaram a maiores níveis de atividade enzimática nos ensaios.

Analisando os gráficos de superfície de resposta, observa-se que as temperaturas estudadas podem não ser as ideais para a melhor atividade da enzima lactase. O gráfico mostra que as temperaturas que apresentariam melhores resultados seriam um pouco acima dos 43 °C, maior temperatura utilizada neste estudo.

A variável temperatura se mostrou significativa em relação à atividade enzimática nos ensaios após 24 h e após 48 h de reação. Dentre as temperaturas analisadas, observando-se os gráficos de superfície de resposta e pela análise dos efeitos, em todos os casos os ensaios à 43 °C apresentaram a maior atividade, mostrando que temperaturas mais altas levam à maior atividade da enzima lactase.

Em todos os tempos analisados, a validação do modelo foi possível, sendo descrito posteriormente um modelo matemático para cada um.

### 4.3.2 Hidrólise da lactose

Pelo método de Lane-Eynon foram obtidos os valores de taxa de lactose consumida na reação de hidrólise com a lactase (HL), a partir da média aritmética das triplicatas de cada ensaio. Foram analisados o comportamento da enzima em relação ao consumo de lactose, analisando-o em diferentes temperaturas (T) e concentrações de lactose (L) adicionada ao meio.

A TABELA 11 mostra a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e o resultado de atividade enzimática média obtido.

TABELA 11 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO 2<sup>2</sup> COMPLETO PARA O MÉTODO DE LANE-EYNON

Ensaio	Variáveis		HL média (g <sub>lactose</sub> min <sup>-1</sup> )		
	Temperatura (°C)	Lactose (g L <sup>-1</sup> )	24 h	48 h	72 h
1	30 (-1)	0 (-1)	0,052 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,046 ± 0,006
2	30 (+1)	70 (-1)	0,063 ± 0,003	0,061 ± 0,001	0,065 ± 0,005
3	43 (-1)	0 (+1)	0,065 ± 0,001	0,066 ± 0,004	0,070 ± 0,005
4	43 (+1)	70 (+1)	0,073 ± 0,000	0,060 ± 0,000	0,064 ± 0,000
5	37 (0)	35 (0)	0,049 ± 0,004	0,048 ± 0,003	0,057 ± 0,001
6	37 (0)	35 (0)	0,054 ± 0,004	0,051 ± 0,003	0,049 ± 0,002
7	37 (0)	35 (0)	0,062 ± 0,002	0,058 ± 0,004	0,057 ± 0,002
8	37 (0)	35 (0)	0,058 ± 0,002	0,067 ± 0,000	0,067 ± 0,001

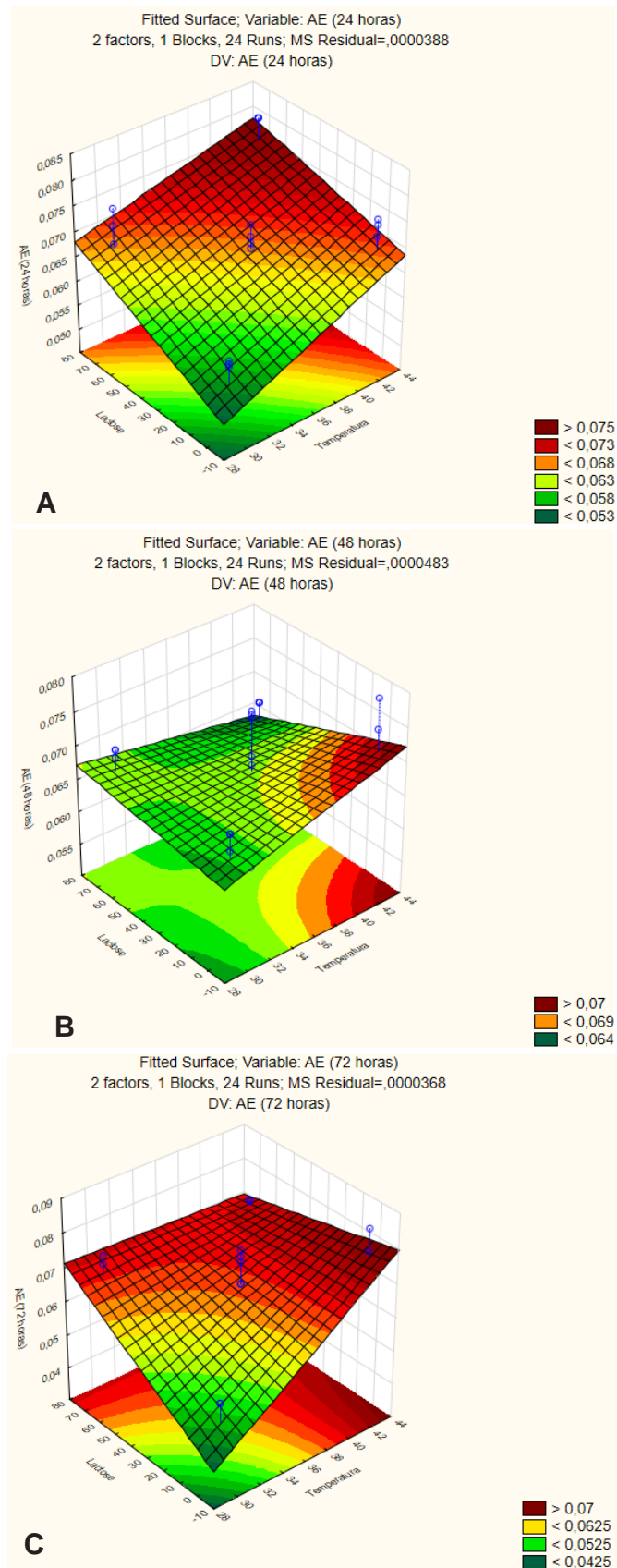
FONTE: O autor (2021).

A análise da tabela mostra que o melhor resultado foi obtido no ensaio 4, que corresponde à temperatura de 43 °C com a adição de 70 g L<sup>-1</sup> de lactose, após 24 h de reação, o qual apresentou HL média de aproximadamente 0,073 g min<sup>-1</sup>.

Na FIGURA 9 é apresentada a superfície de resposta para o tratamento de agitação com pérolas de vidro, em cada tempo considerado.

Observa-se que a superfície de resposta para cada tempo de reação apresentou características distintas, mostrando que neste tratamento o tempo interferiu na atividade.

FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE REPOSTA DA AE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 (A), 48 (B) e 72 (C) HORAS DE REAÇÃO



Fonte: O autor (2021).

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 24 horas estão apresentadas na TABELA 12, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em *itálico* mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>0,067020</i>	<i>0,0012743</i>
T	<i>0,007622</i>	<i>0,005330</i>	<i>0,003593</i>
L	<i>0,015653</i>	<i>0,004752</i>	<i>0,003598</i>
T x L	0,589845	-0,000986	0,003598

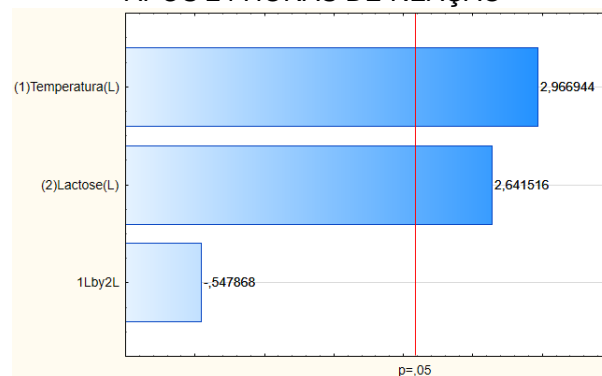
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,44568$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, verifica-se que apenas a interação entre as variáveis não foi significativa. A temperatura e o teor de lactose possuem influência na taxa de lactose consumida na reação de hidrólise no intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 10, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 10 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO



Fonte: O autor (2021).

Pelo gráfico, é possível observar que a variável que possui maior influência é a temperatura, seguida da concentração de lactose, pois encontram-se à direita da

linha vermelha. Ambas têm influência positiva na taxa de lactose consumida na reação de hidrólise, o que indica que quanto maior seu valor, mais tende a aumentar a o consumo da lactose pela enzima.

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 13. A partir da análise de variância do sistema, comparando-se  $F_{\text{calc}}$  com  $F_{\text{tab}}$ , é possível afirmar se o modelo proposto é válido e se os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais, caso  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ . Desta forma, o modelo proposto é válido sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

TABELA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{tab}}$
Regressão	0,000625	3	0,000208	5,360173	3,098391
Erro	0,000777	20	3,88E-5		
Total	0,001401	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para atividade enzimática através das variáveis estudadas, como mostra a equação 4:

$$HL = 0,026804 + 0,000972T + 0,000294L - 0,000004T \times L \quad (8)$$

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 48 horas estão apresentadas na TABELA 14, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 14 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>0,066700</i>	<i>0,001420</i>
T	0,670666	0,000864	0,004006
L	0,513102	-0,001336	0,004012
T x L	0,343891	-0,001945	0,004012

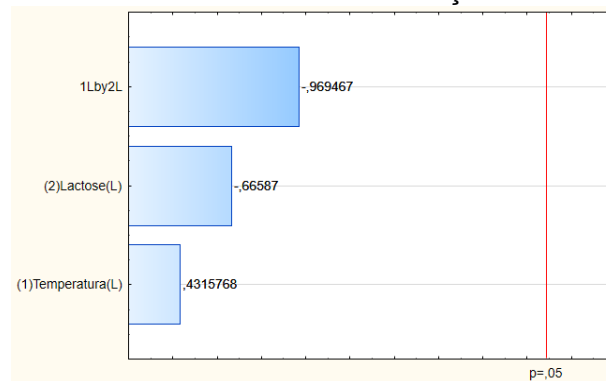
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,7277$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, verifica-se que, dentre as variáveis estudadas, nenhuma mostrou-se significativa no intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 11, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 11 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 15. O modelo proposto não é válido, uma vez que  $F_{calc} < F_{tab}$ , indicando que analisar os dados deste experimento de maneira linear pode não ser o mais adequado.

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 48 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{calc}$	$F_{tab}$
Regressão	0,000076	3	2,53E-5	0,523169	3,098391
Erro	0,000966	20	4,83E-5		
Total	0,001041	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para a taxa de lactose consumida na reação de hidrólise através das variáveis estudadas, como mostra a equação 5:

$$HL = 0,052263 + 0,000432T + 0,000274L - 0,000009T \times L \quad (9)$$

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o tempo de reação de 72 horas estão apresentadas na TABELA 16, juntamente com os

valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo  $R^2$  com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Os valores destacados em *itálico* mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 16 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE NO MÉTODO LANE-EYNON APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO

Variável	p-valor	Coefficiente	Erro
Intercepto	<i>0,000000</i>	<i>0,593140</i>	<i>0,001241</i>
T	<i>0,000362</i>	<i>0,198046</i>	<i>0,003499</i>
L	0,070509	-0,205122	0,003504
T x L	<i>0,001585</i>	<i>-0,173519</i>	<i>0,003504</i>

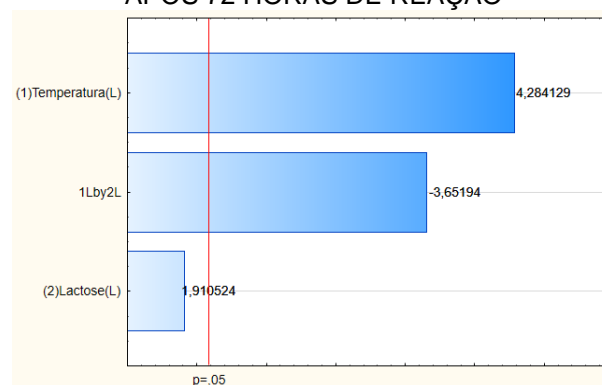
FONTE: O autor (2021).

$R^2 = 0,6386$ .

Observando-se as estimativas dos efeitos para este planejamento, a temperatura e a interação entre as variáveis se mostraram significativas no intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância dessas variáveis pode ser observado através do Gráfico de Pareto indicado na FIGURA 12, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO MÉTODO LANE EYNON APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

A análise de variância através do teste F é apresentada na TABELA 17. O modelo proposto é válido, uma vez que  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ , sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A TAXA DE LACTOSE CONSUMIDA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA O MÉTODO LANE-EYNON APÓS 72 HORAS DE REAÇÃO

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	0,001302	3	0,000434	11,78017	3,098391
Erro	0,000737	20	3,68E-5		
Total	0,002038	23			

FONTE: O autor (2021).

Para os dados obtidos propõem-se um modelo para A taxa de lactose consumida na reação de hidrólise através das variáveis estudadas, como mostra a equação 6:

$$HL = -0,015466 + 0,002137T + 0,001122L - 0,00028T \times L \quad (10)$$

Analisando os gráficos obtidos para os ensaios utilizando o método Lane-Eynon, nota-se que a temperatura interferiu de maneira positiva na atividade enzimática, já que maiores valores desse parâmetro levaram a maiores valores de atividade.

Em relação à concentração de lactose adicionada ao meio, esta não apresentou um comportamento uniforme, se mostrando significativa apenas nos ensaios após 24 horas de reação. Isso pode ser um indicativo de que a reação tenha atingido a velocidade máxima, a partir da qual mesmo aumentando a concentração do substrato, a velocidade da reação não aumenta, obedecendo a cinética de Michaelis-Menten.

Um estudo realizado por Martarello et al. (2019) mostrou que a enzima lactase mantinha sua atividade por até 15 horas de incubação. Isso pode explicar os valores mais heterogêneos após 48 e 72 horas de reação, uma vez que a enzima pode ter perdido a estabilidade, apresentando comportamento diferente em cada caso.

Maity et al. (2013) estudaram o comportamento de  $\beta$ -galactosidases intra e extracelulares em diferentes faixas de pH e temperatura. A enzima intracelular isolada pelos autores apresentou atividade máxima em temperatura um pouco acima dos 40 °C, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo, cuja maior atividade foi obtida a 43 °C, tanto nos ensaios realizados com a metodologia ONPG quanto com o método de Lane-Eynon.

Analisando a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática da lactase isolada de *Lactobacillus* isolado de iogurte, Mozumder et al. (2012) obtiveram atividade máxima de aproximadamente 0,8 U mL<sup>-1</sup> a 70 °C. Comparando os gráficos

de superfícies de resposta gerados neste estudo, em geral, estes mostraram que temperatura altas corresponderam a maiores valores de atividade. Sendo assim, poderiam ser avaliadas temperaturas superiores a 43 °C em busca de melhores resultados.

Carevic et al. (2015) avaliaram a influência da adição de lactose ao meio e do tipo de extração enzimática na atividade da lactase. Nos ensaios realizados, os autores observaram que a maior atividade foi obtida em meios com cerca de 3% de lactose, e que em concentrações maiores a atividade decaía. Nos gráficos obtidos a partir da metodologia ONPG neste estudo também observa-se esse comportamento, em que a atividade decai com o aumento da concentração da lactose, mostrando que esta interfere negativamente na atividade da enzima.

Em relação ao comportamento da enzima analisado pelo método de Lane-Eynon, nota-se que ela apresentou um comportamento similar nos tempos de 24 e 72 horas, tendo sua atividade aumentada com o aumento da temperatura e da concentração de lactose.

A temperatura também interferiu de maneira positiva nos ensaios após 48 horas de reação, porém a concentração de lactose apresentou comportamento desuniforme nesse tempo. Como nenhuma variável mostrou-se significativa nesse tempo, nota-se que o modelo linear pode não ser o ideal para analisar a atividade nessas condições.

Sendo assim, percebe-se que temperaturas próximas aos 43 °C levam a bons resultados de atividade da enzima lactase, enquanto não é necessário a adição de lactose ao meio de cultivo do microrganismo utilizado.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi isolado um microrganismo presente no soro de queijo usando o meio específico MRS. Diferentes níveis de temperatura e concentração de lactose foram testadas e dois métodos de quantificação de atividade enzimática foram avaliados.

A extração enzimática empregando pérolas de vidro é um método de baixo custo e fácil realização e que se mostrou eficiente sendo, portanto, um método que pode ser utilizado para a extração da enzima lactase.

A atividade máxima alcançada foi de  $1,97 \text{ U mL}^{-1}$ , obtida com o rompimento celular através de pérolas de vidro agitadas em vórtex, a  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  e sem adição de lactose, após 24 horas de reação.

Analisando atividade enzimática pelo método ONPG e o comportamento da enzima no método Lane-Eynon, fica claro a influência positiva que a temperatura exerce sobre a atividade, uma vez que os melhores resultados foram alcançados nas maiores temperaturas analisadas.

Diante disso, a utilização de lactase produzida por bactéria obtida do soro de queijo se mostra uma alternativa promissora pois, além de ser uma opção que proporciona redução de custos na sua obtenção, alcança valores de atividade significativas quando utilizado o próprio soro como meio para seu crescimento.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**, Módulo IV. 2004.

ALVES, L. R. et al. Atividade leiteira no Paraná: uma análise espacial e econométrica. **Revista do desenvolvimento regional**, v. 25, n. 2, p. 2432-2453, dez. 2020.

ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai./jun. 2014.

AMARANTE, J. O. **Queijos do Brasil e do mundo: para iniciantes e apreciadores**. São Paulo: Mescla, 2015.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S.; von WRIGHT, A; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York, p. 1-66, 2006.

BALD, J. A. et al. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, ago. 1959.

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**, Athens, v. 72, p.248-254, jan. 1976.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2005.

BURY, D.; JELEN, P.; KALÁB, 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.

CAMPOS, T. C. A da S. et al. Utilização da  $\beta$ -galactosidase na Hidrólise da Lactose do Leite em Baixa Temperatura. **UNOPAR Científica, Ciências biológicas e da saúde**, v. 11, n. 4, p. 51-54, 2009.

CARDOSO, B. B. et al.  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67-74, set. 2017.

CAREVIĆ, M. et al. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production from lactic acid bacteria. **Hemijaska industrija**, v. 69, n. 3, p. 305-312, 2015.

CUNHA, M. E. T.; SUGUIMOTO, H. H.; OLIVEIRA, A. N.; COSTA, M. R. Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 83-88, out. 2008.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 1-12, out. 2008.

DEMIATE, I. M. et al. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **PUBLICATIO UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v.8, n.1, p. 65-78, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Anuário leite 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anuario-leite-2021-saude-unica-e-total> . Acesso em: 17 out. 2021.

FERREIRA-LAZARTE, A.; MORENO, F. J.; VILLAMIEL, M. Application of a commercial digestive supplement formulated with enzymes and probiotics in lactase non-persistence management. **Food & Function**, v. 9, n. 9, p. 4642-4650, set. 2018.

FILHO, J. A. R.; VITOLLO, M. Fatores que afetam a atividade enzimática. In:\_\_\_\_\_. **Guia Para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 55-96.

FITZPATRICK, J. J. et al. Effect of composition and storage conditions on the flowability of dairy powders. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 383-392, 2007.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.62-69, jun. 2007.

FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4156-4163, mai. 2009.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G. JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, jul. 2008.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, p. 43-46, set./out. 2001.

GOMES, R. A. R. et al. O setor de produtos lácteos. In: ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. **Brasil Dairy Trends 2020 – tendências do mercado de produtos lácteos**. Campinas: ITAL, 2017. p. 11-45.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, Braga, v. 28, p. 375-384, fev. 2010.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104-109, fev. 2012.

HEIDTMANN, R. B. et al. Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Rio Grande, v. 15, n. 1, p. 41-49, jan./mar. 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: IMESP, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Estatística da produção agropecuária abr.-jun. 2021. 2021. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2021\\_2tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2021_2tri.pdf). Acesso em: 17 out. 2021.

IRKIN, R. Natural fermented beverages. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Natural beverages**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. p. 399-425.

JURADO, E. et al. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300-309, ago. 2002.

KAUR, G. et al. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 63-67, jan. 2009.

KIM, H. S.; GILLILAND, S. E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 5, p. 959-966, mai. 1983.

LEDERBERG, J. The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 60, p. 381-392, jun. 1950.

LEITE, J. L. B. Caminhos para a produção de leite em pequena escala. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 1-10, ago. 2020.

LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais.

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

MAITY, M. et al. Studies on Isolation and Characterization of Lactase Produced from Soil Bacteria. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 2, n. 8, p. 92-94, 2013.

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

MARTARELLO, R. D. A. et al. Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 81, p. 1-13, 2019.

MARTINS, R. S. et al. A logística como direcionador para a formação de cadeia de valor: um estudo aplicado na indústria de beneficiamento do soro de queijo. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 60-74, mar. 2013.

MISSELWITZ, B. et al. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, v. 68, p. 2080-2091, out. 2019.

MORAES, B. M. M.; FILHO, R. B. Mercado Brasileiro de Lácteos: análise do impacto de políticas de estímulo à produção. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 55, n. 4, p. 783-800, dez. 2017.

MOZUMDER, N. H. M. R., et al. Study on isolation and partial purification of lactase ( $\beta$ -galactosidase) enzyme from *Lactobacillus* bacteria isolated from yogurt. **Journal of scientific research**, v. 4, n. 1, p. 239-249, 2012.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, nov. 2008.

OLIVEIRA, A. M. et al. Condições higiênico-sanitárias da produção de queijos tipo mussarela e minas frescal comercializados no norte do paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 40-47, jan./mar. 2017.

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

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINOT, M. A. de O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 389, p. 57-65, nov/dez. 2012.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. de A.; MENEZES, M. E. da S. Carboidratos. In: **A Química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais**. Maceió: EDUFAL, p. 7-14, 2005.

POPPI, F. A. et al. Soro de Leite e Suas Proteínas: Composição e Atividade Funcional. **UNOPAR Científica, Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 2, p. 31-37, 2010.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, Beja, v. 110, p. 48-68, nov. 2012.

ROJAS, A. L. Crystal Structures of  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium sp.* and its Complex with Galactose. **Journal Of Molecular Biology**, v. 343, n. 5, p. 1281-1292, 2004.

SANGWAN, V. et al. Production of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4206-4215, jul. 2014.

SANTOS, G. J.; ROCHA, R.; SANTANA, G. O. Lactose intolerance: what is a correct management? **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 65, n. 2, p. 270-275, fev. 2019.

SAQIB, S. et al. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 79, p. 1-7, maio 2017.

SÉGUREL, L.; BON, C. On the evolution of lactase persistence in humans. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 18, p. 297-319, ago. 2017.

SEKI, N.; SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 110-115, fev. 2012.

SILVA, R. de O. P. e; BUENO, C. R. F.; SÁ, P. B. Z. R. Aspectos relativos à produção de soro de leite no Brasil, 2007-2016. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 5-17, abr./jun. 2017.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecologia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 338-350, dez. 2005.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 165-173, fev. 2005.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 151-176, 2001.

VASILEVA, N. et al. Hydrolysis of whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase in abioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339-346, jan. 2016.

WANES, D.; HUSEIN, D. M.; NAIM, H. Y. Congenital lactase deficiency: mutations, functional and biochemical implications, and future perspectives. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1-9, fev. 2019.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V.; SHARMA, R. K.  $\beta$ -Galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1-15, out. 2018.

YAMAUCHI, S. et al. Terahertz Time-Domain Spectroscopy to Identify and Evaluate Anomer in Lactose. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 756-762, 2013.