

Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082

Ana Paula Manera¹, Joana da Costa Ores², Vanessa Amaral Ribeiro², Maria Isabel Rodrigues¹, Susana Juliano Kalil² e Francisco Maugeri Filho^{1*}

¹Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil. ²Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: maugeri@fea.unicamp.br

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição do meio de cultura para a produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica de delineamento experimental. A produção da enzima foi realizada em meio composto por soro de queijo, água de maceração de milho (AMM) e hidrolisado de levedura Prodex-lac[®] e sais. Foi realizado um planejamento experimental fracionário (2^{5-1}) para determinar as variáveis significativas na produção da enzima. Foram testadas diferentes concentrações de lactose presente no soro de queijo (10 a 70 g L⁻¹), AMM (10 a 100 g L⁻¹), Prodex-lac (4 a 20 g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0 a 10 g L⁻¹) e o pH (5 a 7). As variáveis concentração de lactose, AMM e o pH apresentaram efeito estatisticamente significativo na atividade enzimática dentro das faixas estudadas, sendo estas variáveis empregadas num delineamento composto central rotacional para otimizar a produção da enzima. As faixas testadas foram: concentração de lactose de 40 a 100 g L⁻¹, AMM de 10 a 120 g L⁻¹ e pH de 3,5 a 6,5. As condições que resultaram em maior atividade enzimática (1400 U g⁻¹) foram 70 g L⁻¹ de lactose, 65 g L⁻¹ de AMM, 4 g L⁻¹ de Prodex-lac e pH 5, obtendo uma produtividade de 61 U L⁻¹ h⁻¹.

Palavras-chave: delineamento experimental, soro de queijo, água de maceração de milho, Prodex-lac.

ABSTRACT. Use of agroindustrial residues in biotechnological process by beta-galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. The objective of this work was to evaluate the composition of the culture medium for the production of the enzyme β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 using an experimental design. Enzyme production was carried out in a medium consisting of cheese whey, corn steep liquor (CSL) and Prodex-lac[®] yeast hydrolyzate. A factorial fractional design (2^{5-1}) was performed to determine the significant variables in the production of the enzyme. Different concentrations of lactose present in whey (10-70 g L⁻¹), CSL (10-100 g L⁻¹), Prodex-lac (4-20 g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0-10 g L⁻¹) and pH (5-7) were tested. Lactose concentration, CSL and pH were the variables that showed a statistically significant effect on enzyme activity within the ranges studied, and these variables were used in a central composite rotatable design to optimize production of the enzyme. The ranges used were: lactose concentration 40-100 g L⁻¹, CSL 10-120 g L⁻¹, and pH 3.5-6.5. The conditions that resulted in higher enzyme activity (1400 U g⁻¹) were 70 g L⁻¹ lactose, 65 g L⁻¹ CSL, 4 g L⁻¹ Prodex-lac and pH 5, yielding 61 U L⁻¹ h⁻¹.

Keywords: experimental design, cheese whey, corn steep liquor, Prodex-lac.

Introdução

O estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos. Diversos coprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e da agroindústria têm sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo valor comercial (SILVA et al., 2009; ERNANDES et al., 2010).

Entre esses produtos biotecnológicos destaca-se a produção de enzimas, a qual é frequentemente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que aproximadamente 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos, portanto sua otimização é de grande importância para a redução de custos (JOO; CHANG, 2005).

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) encontra-se entre as enzimas de grande interesse industrial empregada na hidrólise da lactose de leites e soro de queijo, obtendo, assim, alimentos com baixos teores de lactose, cujo resultado é a melhora da solubilidade e da digestibilidade de leites e derivados lácteos, tornando-os ideais a consumidores intolerantes a este açúcar (HUSAIN, 2010). Recentemente, têm sido empregada na produção de galactooligosacarídeos (GOS) (MANERA et al., 2010; PARK; OH, 2010), açúcares funcionais que trazem diversos efeitos benéficos à saúde de seus consumidores, tais como redução de metabólitos tóxicos, prevenção do câncer de cólon, aumento da tolerância à lactose e da absorção de cálcio com conseqüente redução dos riscos de osteoporose (MARTINS; BURKERT, 2009; OTIENO, 2010).

Um dos principais coprodutos agroindustriais empregados na produção da enzima β -galactosidase como fonte de carbono é o soro de queijo (SANTIAGO et al., 2004; PANESAR, 2008; OBEROI et al., 2008), porém de acordo com Vasiljevic e Jelen (2001), o crescimento do micro-organismo e a produção da enzima em meio, contendo somente soro de queijo, é praticamente desprezível, sendo necessária a sua suplementação com fontes de nitrogênio, sais minerais e vitaminas. Como alternativa para suplementação do soro, e visando o reaproveitamento de outros coprodutos, pode-se empregar a água de maceração de milho, como fonte de nitrogênio e sais minerais em substituição à peptona e o Prodex-lac, um produto comercial com composição similar do extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e vitaminas.

Considerando que o Brasil gera quantidades expressivas de soro de queijo e água de maceração de milho, desenvolveu-se o presente trabalho para avaliar fontes alternativas de carboidrato, nitrogênio e vitaminas para produção da enzima β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando a técnica de delineamento experimental.

Material e métodos

Substratos agroindustriais

Os substratos agroindustriais utilizados foram: soro de queijo em pó cedido pela Cosulati–Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, composto por 45% de lactose, 12% de proteínas e 8% de sais minerais e vitaminas; e a água de maceração de milho (AMM), cedida pela Corn Products–Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, composta por 53% de matéria seca, 43% de proteínas bruta, 15,5% de sais minerais. O hidrolisado de levedura Prodex-lac® em pó foi

adquirido da Indústria Prodesa–Mogi Mirim, Estado de São Paulo, com 44% de proteínas e 0,32% de cloreto de sódio em sua composição.

Micro-organismo e condições de cultivo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello–Pesquisa e Tecnologia–Campinas, Estado de São Paulo, previamente selecionada por Manera et al. (2008), foi empregada para produção da enzima β -galactosidase. O micro-organismo foi mantido em tubos com tampa de rosca contendo caldo YM com glicerol 10% (v v⁻¹) e congelados em freezer a -18°C.

A enzima β -galactosidase foi produzida por fermentação submersa, em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura a 30°C, 180 rpm (LUKONDEH et al. 2005). As fermentações iniciaram com 10% (v v⁻¹) de inóculo (NOR et al., 2001). As concentrações de lactose presente no soro de queijo, água de maceração de milho (AMM), Prodex-lac, (NH₄)₂SO₄ e o pH inicial do meio variaram de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1). As concentrações de KH₂PO₄ e de MgSO₄·7H₂O foram fixadas em 5 e 0,4 g L⁻¹, respectivamente, de acordo com Manera et al. (2008).

Antes de ser empregado nas fermentações, o soro de queijo, após dissolução em água destilada para atingir a concentração desejada de lactose, passou por um tratamento termoácido para desproteínização, o qual consistiu em ajustar o pH para 4,6 com ácido acético e posterior aquecimento (90°C por 15 min.), e, em seguida, as proteínas precipitadas foram retiradas por filtração a vácuo (MATHEUS; RIVAS, 2003) e a solução de soro de queijo esterilizada por filtração com membrana de 0,2 μ m (RAJOKA et al. 2003). A água de maceração de milho, após ser diluída na concentração desejada, foi centrifugada para retirada do material insolúvel, e esterilizada por filtração com membrana de 0,2 μ m. O Prodex-lac e os demais reagentes foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

Delineamento experimental

Os efeitos das variáveis na concentração de lactose presente no soro de queijo, água de maceração de milho, Prodex-lac, (NH₄)₂SO₄, e o pH na produção da β -galactosidase foram avaliados usando um delineamento experimental fracionário 2⁵⁻¹ com a adição de três ensaios no ponto central. As faixas estudadas foram selecionadas de acordo com a literatura e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis codificados e concentrações das variáveis estudadas nos delineamentos experimentais, em que X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ são, respectivamente, lactose (g L⁻¹), AMM (g L⁻¹), Prodex-lac (g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (g L⁻¹) e pH.

Níveis	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
Delineamento fracionário					
-1	10	10	4	0	5
0	40	55	12	5	6
+1	70	100	20	10	7
DCCR					
-1,68	40	10	-	-	3,5
-1	52,1	32,3	-	-	4,1
0	70	65	-	-	5
+1	87,9	97,7	-	-	5,9
+1,68	100	120	-	-	6,5

Baseados nos resultados obtidos no delineamento fracionário, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) de acordo com Rodrigues e Iemma, (2009). Foram realizados 17 ensaios (8 fatoriais, 6 axiais e 3 no ponto central) As variáveis independentes avaliadas foram concentração de lactose, concentração de AMM e o pH. Os níveis das variáveis estão apresentados na Tabela 1. A análise dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 5.0.

Extração da enzima

A enzima β -galactosidase é uma enzima intracelular. Para ruptura da parede celular adicionou-se 1,1 g de pérolas de vidro ($R < 0,4$ mm) para cada mL de célula em suspensão. A suspensão foi submetida a um tratamento com ondas ultrassônicas, por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi separado por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min. a 4°C e utilizado para determinação da atividade enzimática (MANERA et al., 2008).

Um mililitro de célula em suspensão foi obtido por ressuspensão em tampão KH₂PO₄ 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM pH 6,6 de células equivalente a 2,62 mg de células secas (NUMANOGLU; SUNGUR, 2004).

Determinações analíticas

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato, segundo metodologia descrita por Inchaurredo et al. (1994). Em tubo de ensaio contendo 2 mL de ONPG 1,25 mM, preparado em tampão KH₂PO₄ 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1 mM pH 6,6, foram adicionados 50 μ L da solução enzimática. A solução foi mantida a 37°C por 5 min. em banho agitado, a reação foi paralisada adicionando 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M, em seguida determinou-se a absorbância a 420 nm, e calculou-se a atividade enzimática. Uma unidade de

atividade enzimática (U) é definida como 1 μ mol de *o*-nitrophenol produzido por minuto, sob as condições do ensaio. O coeficiente de extinção molar do *o*-nitrophenol determinado experimentalmente nestas condições foi $4,64 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$.

A concentração celular foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm e convertida para peso seco conforme curva-padrão. As células do caldo foram coletadas por centrifugação a $6.000 \times g$, 10 min., lavadas duas vezes com água destilada e ressuspensas com água para leitura da absorbância. Para a curva-padrão as células foram secas a 90°C até peso constante (LONGHI et al., 2004).

Resultados e discussão

As condições experimentais testadas no delineamento experimental fracionário 2⁵⁻¹ estão apresentadas na Tabela 2, bem como as respostas para a atividade enzimática máxima de cada ensaio e o tempo de fermentação em que ocorreu a máxima atividade. As atividades enzimáticas máximas obtidas neste delineamento variaram de 790,0 U g⁻¹ até 1733,7 U g⁻¹, e o tempo de fermentação necessário para atingir estes valores de atividade variaram de 24 a 72h.

Tabela 2. Matriz do delineamento experimental fracionário 2⁵⁻¹, em que X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ são, respectivamente, lactose (g L⁻¹), AMM (g L⁻¹), Prodex-lac (g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (g L⁻¹) e pH; Y é a atividade enzimática máxima (U g⁻¹) e t é o tempo (h).

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y	t
1	-1	-1	-1	-1	1	898,3	48
2	1	-1	-1	-1	-1	1317,1	48
3	-1	1	-1	-1	-1	1280,2	48
4	1	1	-1	-1	1	1733,7	48
5	-1	-1	1	-1	-1	939,5	48
6	1	-1	1	-1	1	1430,0	48
7	-1	1	1	-1	1	1249,8	72
8	1	1	1	-1	-1	1528,2	48
9	-1	-1	-1	1	-1	1334,5	48
10	1	-1	-1	1	1	939,5	48
11	-1	1	-1	1	1	792,0	24
12	1	1	-1	1	-1	1718,5	48
13	-1	-1	1	1	1	913,5	24
14	1	-1	1	1	-1	1291,0	24
15	-1	1	1	1	-1	1459,4	48
16	1	1	1	1	1	1423,4	48
17	0	0	0	0	0	1323,6	48
18	0	0	0	0	0	1210,7	48
19	0	0	0	0	0	1484,1	48

As maiores atividades, 1733,7 e 1718,5 U g⁻¹, foram obtidas nos ensaios 4 e 12, respectivamente, em 48h de fermentação. As condições destes ensaios foram 70 g L⁻¹ de lactose, 100 g L⁻¹ de AMM, 4 g L⁻¹ de Prodex-lac, para ambos os ensaios, a concentração de sulfato de amônio foi 0 e 10 g L⁻¹, para os ensaios 4 e 12, respectivamente e o pH inicial da fermentação foi 7,0 para o ensaio 4 e 5,0 para o ensaio 12.

O efeito de cada variável na atividade enzimática pode ser observado na Figura 1. As variáveis concentração de lactose e de água de maceração de milho e o pH apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90% de confiança; a concentração de lactose e de AMM apresentaram um efeito positivo, ou seja, ao passar do nível -1 (menor concentração) para o nível +1 (maior concentração), houve incremento na atividade enzimática, já o pH apresentou efeito negativo, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1, houve diminuição da atividade. As concentrações de Prodex-lac e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentaram efeito estatisticamente significativo dentro das faixas estudadas.

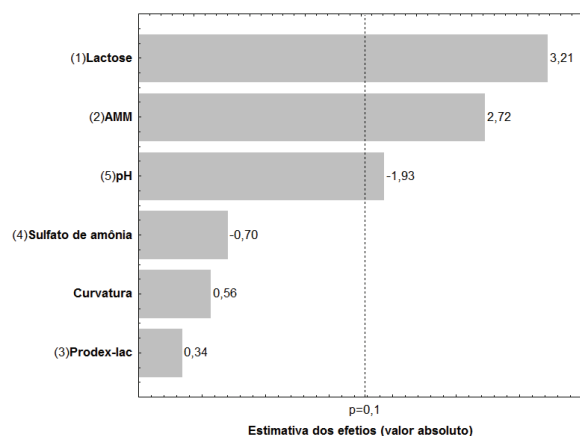


Figura 1. Estimativa dos efeitos para as concentrações de lactose presente no soro de queijo, água de maceração de milho, Prodex-lac, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o pH para o delineamento experimental fracionário (2^{5-1}) .

Em função dos resultados obtidos neste delineamento, as concentrações de lactose e de água de maceração de milho e o pH foram selecionadas para serem estudadas em um DCCR, em que se aumentou as concentrações de lactose e de AMM e diminuiu-se os valores de pH. As concentrações de Prodex-lac e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram mantidas no nível -1, ou seja, 4 g L^{-1} de hidrolisado de levedura e o sulfato de amônio foi retirado do meio já que tinha sido estudado de 0 a 10 g L^{-1} .

O sulfato de amônio foi empregado como fonte inorgânica de nitrogênio, porém pelos resultados obtidos, a água de maceração de milho e o Prodex-lac forneceram a quantidade de nitrogênio necessária para o crescimento do micro-organismo e produção da enzima, não sendo necessária sua adição no meio de cultivo. O mesmo comportamento foi observado nos trabalhos de Rao e Dutta (1977) e Sonawat et al. (1981) em que a produção da β -galactosidase foi pouco influenciada quando o soro de queijo foi suplementado com fontes inorgânicas de nitrogênio, ao passo que

quando o soro foi suplementado com fontes orgânicas de nitrogênio a atividade enzimática aumentou consideravelmente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que os ensaios 1 a 4 em que o pH estava no nível -1 (pH = 4,1) foram os ensaios que necessitaram de maior tempo de fermentação para atingir a máxima atividade enzimática, isto provavelmente ocorreu pois o micro-organismo necessitou de um tempo maior para se adaptar ao meio ácido, tendo como consequência uma maior fase lag (fase de adaptação ao meio). No ensaio 13 em que o pH estava no nível -1,68 (pH = 3,5), observa-se a menor produção da enzima, 33 U g^{-1} em 96h de fermentação, indicando que neste pH o micro-organismo não conseguiu se adaptar, logo, a produção da enzima foi muito baixa.

Tabela 3. Matriz do DCCR, em que X_1 , X_2 , X_5 são, respectivamente, lactose (g L^{-1}), AMM (g L^{-1}) e pH; Y é a atividade enzimática máxima (U g^{-1}) e t é o tempo (h).

	X_1	X_2	X_5	Y	t
1	-1	-1	-1	844,1	48
2	1	-1	-1	707,4	144
3	-1	1	-1	989,5	72
4	1	1	-1	835,4	168
5	-1	-1	1	679,2	24
6	1	-1	1	982,9	24
7	-1	1	1	874,4	48
8	1	1	1	1403,9	24
9	-1,68	0	0	1071,9	72
10	1,68	0	0	1208,6	24
11	0	-1,68	0	1108,8	48
12	0	1,68	0	1015,5	24
13	0	0	-1,68	33	96
14	0	0	1,68	904,8	48
15	0	0	0	1550,0	24
16	0	0	0	1358,3	24
17	0	0	0	1498,5	24

A literatura apresenta alguns estudos sobre a influência da variação do pH na obtenção de β -galactosidases produzidas por leveduras em meio à base de soro de queijo. Bales e Castillo (1979) obtiveram máxima produção enzimática empregando *Candida pseudotropicalis* quando o pH inicial do meio foi ajustado para 3,5. Matheus e Rivas (2003) determinaram como ótimo o pH de 4,68 para a produção da enzima de *Kluyveromyces lactis*, e Panesar (2008), ao fermentar *K. marxianus*, obteve maiores atividades enzimáticas em pH 5,0.

Sabe-se que leveduras crescem melhor em pH ácido, porém ficou evidente que para a levedura empregada neste trabalho, pH menores de 4,1 prejudicam o crescimento celular e a obtenção da enzima. De acordo com Panesar (2008), o pH de um sistema afeta pelo menos dois aspectos das células microbianas, o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes na célula.

As condições que resultaram nas maiores atividades enzimáticas foram as condições dos pontos centrais, ou seja, 70 g L⁻¹ de lactose, 65 g L⁻¹ de água de maceração de milho e pH 5. Por meio da análise estatística dos resultados, obteve-se a equação do modelo codificado (Equação 1) que foi validada pela análise de variância (Tabela 4) em que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,84 e o F calculado foi 4,88 vezes maior que o valor tabelado.

$$\begin{aligned} \text{Atividade}(\text{U g}^{-1}) = & 1464,6 - 102,9(\text{lactose})^2 - \\ & - 130,5(\text{AMM})^2 + 148,7(\text{pH}) - \\ & - 340,7(\text{pH})^2 + + 140 (\text{lactose} \times \text{pH}) \end{aligned} \quad (1)$$

A partir da equação foi possível gerar as superfícies de resposta (Figura 2) para analisar as melhores condições de concentração de lactose, de AMM e pH para produção da β-galactosidase que conduzem a um maior valor de atividade enzimática.

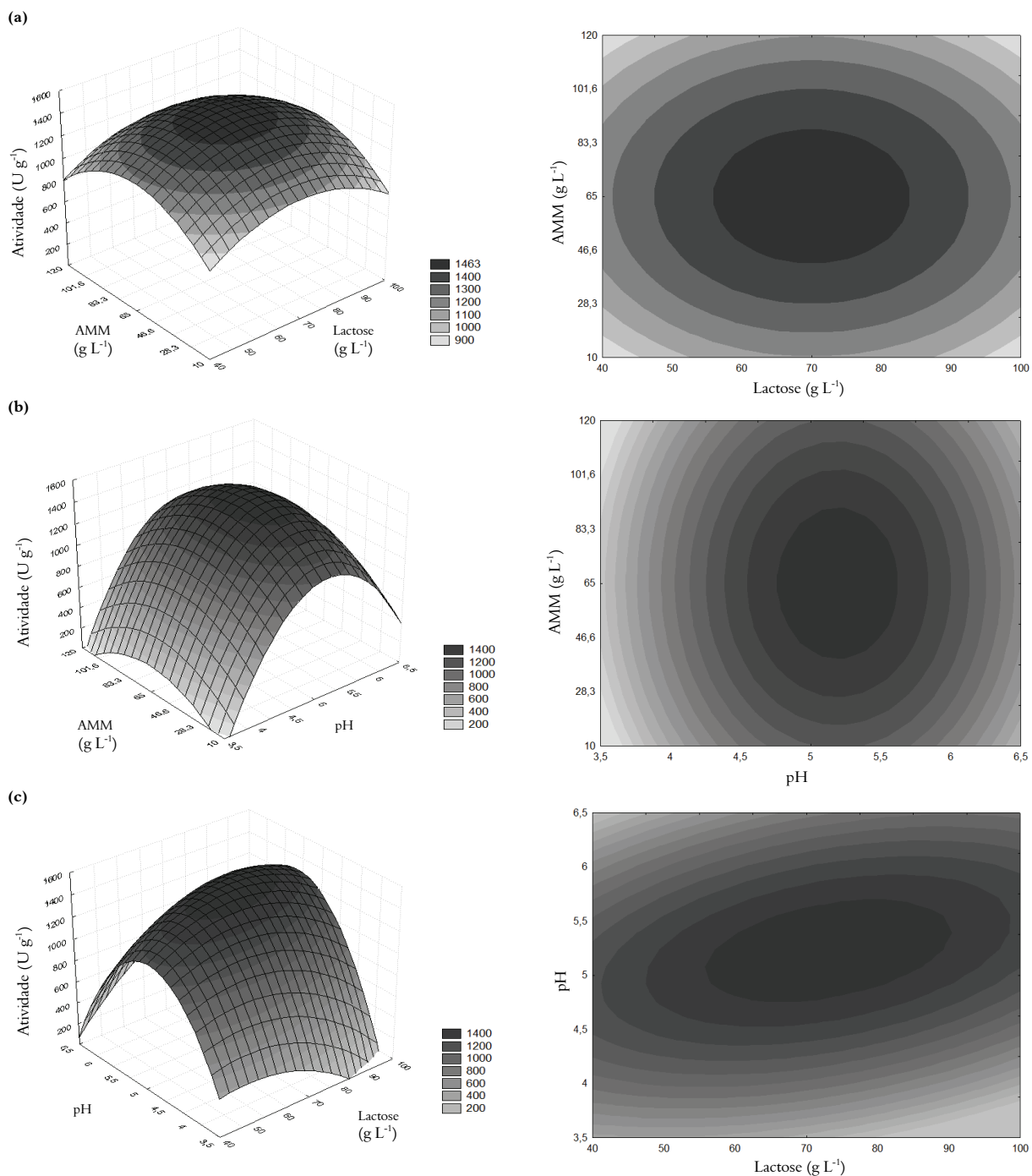


Figura 2. Superfícies de respostas para a atividade de β-galactosidase em função: (a) concentração AMM e de lactose; (b) concentração de pH e AMM; (c) pH e concentração de lactose.

Tabela 4. Análise de variância para o delineamento composto central rotacional.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	1776847,56	5	355369,5	11,98
Resíduo	326428	11	29675	
Total	2103275	16		

$R^2=84,5\%$; $F_{5;11;0,1}=2,45$.

Pode-se observar na Figura 2(a) que as concentrações de AMM entre 30 e 100 g L⁻¹ e lactose entre 50 e 90 g L⁻¹ conduzem a valores de atividade enzimática superiores a 1400 U g⁻¹. A Figura 2(b) indica que concentrações de AMM entre 30 e 100 g L⁻¹ e pH na faixa de 4,8 a 5,6 propiciam altos valores de atividade enzimática. Pela Figura 2(c) observa-se que as maiores atividades são obtidas ao empregar concentração de lactose entre 60 e 90 g L⁻¹ e pH entre 4,8 e 5,7.

Sonawat et al. (1981) observaram que o emprego de água de maceração de milho influenciou positivamente na produção da enzima β -galactosidase, o mesmo comportamento foi observado no trabalho de Rao e Dutta (1977), em que houve aumento de aproximadamente 28% na atividade enzimática usando soro suplementado com água de maceração de milho. Furlan et al. (2000) estudaram a produção da β -galactosidase empregando *Kluyveromyces marxianus*, a partir de um meio de cultura com melaço de cana-de-açúcar. A máxima produção da enzima foi obtida quando o meio foi suplementado com 100 g L⁻¹ de água de maceração de milho.

A partir dos resultados, para obtenção de uma atividade enzimática por volta de 1400 U g⁻¹, pode-se empregar as condições dos pontos centrais, ou seja, 70 g L⁻¹ de lactose, 65 g L⁻¹ de água de maceração de milho e pH 5, estes ensaios resultaram em uma produtividade média de 61 U g⁻¹ h⁻¹. O maior valor de atividade enzimática obtido no DCCR foi inferior ao máximo obtido no delineamento fracionário, em que se obteve nos ensaios 4 e 12 uma atividade por volta de 1700 U g⁻¹, porém a produtividade nesses ensaios foi aproximadamente 35 U g⁻¹ h⁻¹.

Manera et al. (2008) otimizou a produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 empregando um meio sintético composto por lactose, extrato de levedura e sais, a máxima atividade enzimática obtida foi 800 U g⁻¹. Comparando esse resultado com os obtidos neste trabalho pode-se verificar o aumento de 75% na produção da enzima β -galactosidase.

Conclusão

A produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, utilizando um meio de cultura composto por coprodutos industriais, é um processo

biotecnológico promissor. O emprego de soro de queijo, um subproduto dos laticínios, água de maceração de milho, um coproduto da indústria de extração do amido, e a substituição do extrato de levedura por Prodex-lac, como substrato para fermentação tem o intuito de reduzir custos e propiciar uma enzima com alta atividade enzimática. Com o emprego de metodologia de delineamento experimental e análise de superfície de resposta foi possível obter uma produção enzimática de aproximadamente 1400 U g⁻¹ em 24h de fermentação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, entidade do governo brasileiro voltada para a formação de recursos humanos, pelo apoio financeiro.

Referências

- BALES, S. A.; CASTILLO, F. J. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1201-1205, 1979.
- ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.
- FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. F.; JONAS, R. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 7, p. 589-593, 2000.
- HUSAIN, Q. β -galactosidase and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.
- INCHAURRONGO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 47-54, 1994.
- JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
- LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2004.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 284-288, 2005.

- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 66-72, 2008.
- MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 6, article 4, 2010.
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosaccharídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.
- MATHEUS, A. L. R.; RIVAS, N. Producción y caracterización parcial de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, p. 194-201, 2003.
- NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 11, p. 845-849, 2001.
- NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 705-711, 2004.
- OBEROI, H. S.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1499-1504, 2008.
- OTIENO, D. O. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidase. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 471-482, 2010.
- PANESAR, P. Production of β -D-galactosidase from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2008.
- PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, 2010.
- RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 315-320, 2003.
- RAO, M. V. R.; DUTTA, S. M. Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 185-188, 1977.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2009.
- SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.
- SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.
- SONAWAT, H. M.; AGRAWAL, A.; DUTTA, S. M. Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Folia Microbiologica**, v. 26, n. 5, p. 370-376, 1981.
- VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 2, n. 2, p. 75-85, 2001.

Received on April 8, 2010.

Accepted on September 1, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited