

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS LAGOA DO SINO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA – CCN

RAFAELA DE JESUS SILVA COELHO

**APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DO SORO DE QUEIJO PORUNGO
PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE**

BURI – SP

2020

RAFAELA DE JESUS SILVA COELHO

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DO SORO DE QUEIJO PORUNGO
PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento Acadêmico
Lagoa do Sino da Universidade Federal de
São Carlos, para obtenção do título de
bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Gabardo

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus Silva Coelho, Rafaela de

Aproveitamento biotecnológico do soro de queijo
porungo para obtenção da enzima β -galactosidase /
Rafaela de Jesus Silva Coelho -- 2020.
59f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Lagoa do Sino, Buri
Orientador (a): Sabrina Gabardo
Banca Examinadora: Kivia Mislaine Albano, Naaman
Francisco Nogueira Silva
Bibliografia

1. Bioprocessos. 2. β -galactosidase. 3. Soro de queijo. I.
Jesus Silva Coelho, Rafaela de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

FOLHA DE APROVAÇÃO

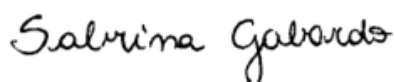
RAFAELA DE JESUS SILVA COELHO

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DO SORO DE QUEIJO PORUNGO
PARA OBTENÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia de Alimentos na Universidade
Federal de São Carlos. Buri, 8 de outubro
de 2020.

Aprovado em: 08/10/2020.

Orientadora:



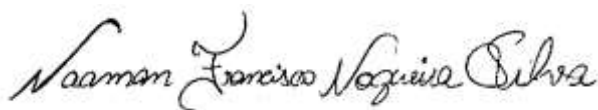
Profa. Dra. Sabrina Gabardo
Universidade Federal de São Carlos

Examinadora:



Profa. Dra. Kivia Mislaine Albano
Universidade Federal de São Carlos

Examinador:



Prof. Dr. Naaman Francisco Nogueira Silva
Universidade Federal de São Carlos

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho resume-se em dedicação, satisfação e gratidão. Não me faltam motivos para agradecer a cada um que dedicou seu tempo para contribuir com o meu sucesso e crescimento pessoal. Não existem palavras para expressar minha eterna gratidão e felicidade.

Agradeço a minha orientadora Sabrina Gabardo que conduziu o trabalho com paciência e dedicação, estando sempre disponível a compartilhar todo o seu valioso conhecimento e não deixar faltar incentivos na realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Alexandre e Marlene por serem essenciais na minha vida e por nunca terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade.

As minhas irmãs Gabriella e Joana pela amizade, pelo companheirismo e por todo apoio nos momentos delicados da minha vida.

A todos meus amigos que sempre estiveram torcendo por mim.

Ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de São Carlos, ao corpo docente *e todas as pessoas com quem convivi nesse espaço ao longo desses anos*, a quem fico lisonjeado por ter feito parte.

Por fim meus agradecimentos a todos que fizeram parte da minha formação de forma direta ou indireta e que me auxiliaram ao longo desta caminhada.

“Corajosos são aqueles que mesmo tremendo de medo lutam por um bem maior”

Naruto Uzumaki

RESUMO

O soro de queijo é considerado o principal subproduto da indústria de laticínios, sendo caracterizado como um substrato alternativo rico em nutrientes e com grande aplicabilidade em bioprocessos. Este apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e quando associado ao inadequado descarte pode acarretar em diversos problemas ambientais. Uma das alternativas de destino para esse subproduto é a utilização em processos biotecnológicos, como por exemplo para a produção de β -galactosidase. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo aproveitar o soro de queijo porungo para produção de β -galactosidase (lactase), que é amplamente utilizada pela indústria de alimentos para fabricação produtos livres de lactose. Na primeira etapa deste trabalho, diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* (CCT 4086 e CBS 6556) e diferentes meios de cultivo (soro de queijo porungo (S); soro de queijo porungo suplementado com extrato de levedura (SE) e soro de queijo porungo suplementado com extrato de levedura e peptona bacteriológica (SEP)) foram testados em agitador rotacional a 200 rpm e temperatura de 30 °C. Os melhores resultados da atividade enzimática foram obtidos pela linhagem *K. marxianus* CCT 4086 em SE (16,73 U mL⁻¹). Diante disso, esta linhagem foi escolhida para a segunda etapa, na qual foi avaliada a influência das variáveis de processo temperatura (30°C e 37°C) e pH (5,0, 6,0 e 7,0), em um planejamento experimental fatorial 2 × 3. A atividade enzimática atingiu valores máximos no período de 20 h para todos os experimentos, variando de 11,41 U mL⁻¹ a 15,93 U mL⁻¹ para temperatura de 30°C e 10,62 U mL⁻¹ a 13,93 U mL⁻¹ para temperatura de 37°C. A melhor condição de processo foi alcançada em pH 7,0 e temperatura de 30 °C.

Palavras-chave: Soro de queijo. β -galactosidase. *K. marxianus*, Bioprocessos.

ABSTRACT

Cheese whey are the main by-product of the dairy industry, characterized as an alternative substrate rich in nutrients and applicable in bioprocess. It has a high biochemical oxygen demand (BOD) and when associated with inadequate disposal can lead to several environmental problems. One alternative use of this by-product is in biotechnological processes, such as for the production of β -galactosidase. This study aimed to use porungo cheese whey for β -galactosidase (lactase) production, an enzyme widely applied in the food industry to manufacture lactose-free products. In the first stage of this work, different lines of *Kluyveromyces marxianus* (CCT 4086 and CBS 6556) and different culture media (porungo cheese whey (S); porungo cheese whey supplemented with yeast extract (SE) and porungo cheese whey supplemented with yeast extract and bacteriological peptone (SEP)) were tested on a rotational shaker at 200 rpm and a temperature of 30 °C. The best results of enzymatic activity were followed by the strain *K. marxianus* CCT 4086 in SE (16.73 U mL⁻¹). Therefore, this line was chosen for the second stage, and the influence of the process variables temperature (30°C and 37°C) and pH (5, 6 and 7) was evaluated, in a 2 × 3 factorial experimental design. Enzymatic activity reached a maximum value in 20 h of cultivation for all experiments, ranging from 11.41 U mL⁻¹ to 15.93 U mL⁻¹ for temperature of 30 °C and 10.62 U mL⁻¹ to 13.93 U mL⁻¹ for temperature of 37 °C. The best process condition was achieved at pH 7.0 and temperature of 30 °C.

Keywords: Cheese whey. β -galactosidase. *K. Marxianus*. Bioprocesses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de produção do queijo porungo.....	27
Figure 1 - Kinetic of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 in (a) porungo cheese whey, (b) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and (c) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and bactopectone at 200 rpm and 30 °C. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-).....	45
Figure 2 - Kinetic of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 in (a) porungo cheese whey, (b) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and (c) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and bactopectone at 200 rpm and 30 °C. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-).....	46
Figure 3 - Kinetic of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm and 30 °C in (a) pH 5.0, (b) pH 6.0 and (c) pH 7.0. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-)	47
Figure 4 - Kinetic of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm and 37 °C in (a) pH 5.0, (b) pH 6.0 and (c) pH 7.0. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-)	48
Figure 5 - Effect of temperature (a) and pH (b) on the β -galactosidase activity from <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 produced in the better conditions.....	49
Anexo A – Comprovante do aceite de publicação.....	60

LISTA DE TABELAS

Table I - Centesimal composition of porungo cheese whey	50
Table II - Enzymatic activity for different pH (5.0, 6.0 and 7.0) and temperatures (30 °C and 37 °C) in 20 h of cultivation of <i>K. marxianus</i> CCT 4086 cultured in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm in shaker.....	50
Table III - Kinetics parameters of <i>K. marxianus</i> CCT 4086 cultured in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm in shaker under different pH (5.0, 6.0 and 7.0) and temperature (30 °C and 37 °C).....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Soro de queijo.....	16
3.1.1 Aproveitamento biotecnológico.....	17
3.1.2 Produção biotecnológica de β -galactosidase por soro de queijo.....	20
3.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	21
3.3 Enzima β -galactosidase.....	23
3.4 Aplicação da enzima β -galactosidase na indústria.....	25
3.5 Queijo porungo.....	26
4 ARTIGO 1	28
4.1 Introduction.....	29
4.2 Materials and methods.....	31
4.2.1 Microorganisms.....	31
4.2.2 Porungo cheese whey characterization.....	31
4.2.3 β -Galactosidase production in batch system.....	32
4.2.4 Analytical determinations.....	33
4.2.4.1 Mechanical cell disruption.....	33
4.2.4.2 Biomass and lactose concentration.....	33
4.2.4.3 β -galactosidase activity.....	34
4.2.4.4 Enzymatic assay of the produced β -galactosidase.....	34
4.3 Results and discussion.....	34
4.3.1 Composition of porungo cheese whey.....	34
4.3.2 β -galactosidase production by diferente strains and media.....	35
4.3.3 β -galactosidase production on diferente pH and temperature.....	37
4.3.4 Optimal conditions for enzyme activity.....	38

4.4 CONCLUSION	39
REFERENCES.....	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O uso de resíduos agroindustriais para produzir biomoléculas comerciais está sendo extensivamente estudado, a fim de desenvolver novas técnicas de fermentação, reduzindo custos e impactos ambientais. O soro de queijo consiste no principal subproduto da indústria de laticínios em decorrência da elevada carga orgânica e grande volume gerado. Este subproduto pode levar a sérios problemas ambientais quando descartado inadequadamente em cursos hídricos ou no solo (KOSSEVA et al., 2009; PRAZERES, CARVALHO & RIVAS, 2012).

Embora a utilização desse substrato alternativo e de baixo custo em processos industriais ainda não seja uma realidade mundial, os processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente desenvolvidos, pois diante da sua composição rica em nutrientes, este subproduto apresenta grande potencial de aproveitamento em uma diversidade de processos biotecnológicos para a obtenção de compostos de interesse, como a enzima β -galactosidase (RECH & AYUB, 2007; GUPTA & NAIR, 2010).

A enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase (EC 3.2.1.23), é classificada como uma hidrolase, sendo capaz de catalisar o processo de hidrólise da lactose presente no leite e seus derivados, gerando a glicose e a galactose, que são dois produtos de menor cadeia (GROSOVA et al., 2008, FAI & PASTORE, 2015). Existem diversas pesquisas sendo realizadas para a produção da β -galactosidase através do aproveitamento de subprodutos industriais devido ao mercado crescente e a redução dos custos de produção associada à sua utilização. Além disso, oferece simultaneamente um destino adequado para o soro de queijo, minimizando a problemática de geração de resíduos das indústrias de laticínios (RECH et al., 1999).

Estima-se que aproximadamente 75% da população mundial manifestem sinais e sintomas de intolerância a lactose. Diante desta problemática, grande parte dos indivíduos reduzem ou excluem leite e derivados da alimentação diária, o que é considerado uma prática equivocada, pois compromete diretamente na absorção de proteínas, riboflavinas e cálcio. Tendo em vista a seriedade dos problemas atrelados com a ingestão do açúcar do leite, é de fundamental importância nutricional a redução do teor de lactose nos produtos (MORIWAKI & MATIOLI, 2000). Sendo assim, a β -galactosidase é amplamente utilizada na indústria de alimentos para a obtenção de

produtos com baixo teor de lactose, sendo encontrada em vegetais, animais e microrganismos. A produção microbiana é produzida com maiores rendimentos e controles, sendo as leveduras e fungos os microrganismos preferenciais para aplicações comerciais (SANTIAGO et al., 2004; GROSOVA et al., 2008; TOMAL et al., 2010; FAI & PASTORE, 2015). A hidrólise enzimática da lactose para obtenção de produtos livre de lactose consiste em um dos mais importantes processos biotecnológicos empregados na indústria de alimentos, que oferece benefícios em áreas como a saúde e tecnologia de alimentos (MLICHOVA & ROSENBERG, 2006, GROSOVA et al., 2008).

O interesse pela produção comercial da enzima de β -galactosidase tem se desenvolvido significativamente nos últimos anos, tendo atrelado a si o objetivo de atender o mercado de intolerantes à lactose. Exemplo deste pode ser observado nos Estados Unidos, que é considerado o maior país consumidor de produtos sem lactose, ressaltando que há estimativas de 1,9 bilhões de dólares de movimentação no mercado. Entre as diversas aplicações da enzima, pode-se citar a hidrólise da lactose para obtenção de produtos com baixo teor de lactose, a produção de prebióticos e a melhora na qualidade tecnológica e sensorial dos produtos lácteos (MORIWAKI & MATIOLI, 2000).

Outrossim, considerando que aproximadamente metade do leite produzido no Brasil são destinados para a produção de queijos faz-se necessária a implementação de tecnologias que venham agregar valor através da utilização dos rejeitos da indústria de laticínios em novos processos. Nesse contexto, o soro de queijo é visto não apenas como um subproduto, mas como um substrato rico em nutrientes com potencial de aplicação em áreas tecnológicas promissoras, tais como a de bioprocessos (GUIMARÃES, TEIXEIRA & DOMINGUES, 2010; FISCHER & KLEINSCHMIDT, 2015; DAS, RAYCHAUDHURI & GHOSH, 2016).

O queijo porungo apresenta características similares ao queijo mussarela, sendo produzido por 27 famílias localizadas nas cidades de Campina do Monte Alegre, Buri e Angatuba, da região sudoeste do estado do São Paulo (PEZZO, 2017). O aproveitamento do soro de queijo obtido a partir do queijo porungo consiste em uma fonte de nutrientes ainda não explorada, sendo interessante cientificamente a sua investigação.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como **objetivo geral** avaliar a potencialidade de produção da enzima β -galactosidase a partir de soro de queijo porungo, obtido no sudoeste paulista.

Mais detalhadamente, os **objetivos específicos** são:

- Analisar a composição centesimal do soro de queijo porungo;
- Avaliar a capacidade de bioconversão da lactose em biomassa e a concomitante produção da enzima em meio soro de queijo porungo;
 - Avaliar a influência de diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* e a suplementação de meio de cultivo soro de queijo por diferentes fontes de nutrientes na produção da enzima β -galactosidase;
 - Estudar as variáveis de processo (pH e temperatura) visando estabelecer as condições ótimas de produção da enzima a partir da melhor linhagem e meio de cultivo pré-definidos na etapa anterior;
 - Avaliar a cinética de produção de biomassa, consumo de substrato e atividade enzimática para obtenção dos parâmetros fermentativos.

Neste trabalho, primeiramente, encontra-se o embasamento teórico relevante ao desenvolvimento deste projeto (introdução, objetivos e revisão bibliográfica). Os títulos restantes estão na forma de artigo científico, o qual foi aceito para publicação na revista *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* no dia 06 de agosto de 2020 (ANEXO A). Neles estão descritas as metodologias utilizadas na condução dos experimentos, bem como os resultados finais e suas respectivas discussões. Por fim, são discutidas as considerações finais deste trabalho e as principais conclusões.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soro de queijo

O soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios, é obtido durante o processo de produção de queijos após a etapa de precipitação e remoção da caseína do leite por coagulação ácida ou enzimática. Possuindo a coloração amarelo-esverdeada, o soro de queijo representa 85 % a 95 % do volume de leite utilizado na fabricação de queijos e retém mais da metade dos componentes existentes no leite, contendo majoritariamente nutrientes como a lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas (6-8 g L⁻¹) e sais minerais (5-7 g L⁻¹) (SISO, 1996; GUIMARÃES, TEIXEIRA & DOMINGUES, 2010; PRAZERES, CARVALHO & RIVAS, 2012; DAS, RAYCHAUDHURI & GHOSH, 2016).

Com a fabricação de queijos em larga escala, o soro tornou-se um subproduto preocupante devido a elevada carga orgânica e expressivo volume em relação aos outros efluentes gerados nas fábricas de laticínios. O principal problema associado à produção de queijos é a quantidade de soro gerado. De modo geral, para a fabricação de 1 kg de queijo são necessários 10 kg de leite. Sendo assim, o inadequado descarte e o expressivo volume, podem levar a sérios problemas ambientais, tais como a destruição da flora e da fauna aquática (ANTUNES, 2003; KOSSEVA et al., 2009; PRAZERES, CARVALHO & RIVAS, 2012).

A abordagem deste subproduto como um resíduo agroindustrial vem sendo convenientemente abandonada, uma vez que grande parte do soro de queijo produzido é utilizado em formulações farmacêuticas e alimentícias (lácteos, de panificação, chocolate e biscoitos), e o restante do volume excedente pode ser aproveitado em outros processos produtivos, como por exemplo, para a obtenção de biomoléculas de alto valor agregado, e permitindo o concomitante tratamento deste resíduo, o que contribui significativamente para a redução do desperdício dessa fonte rica em nutrientes (KOSSEVA et al., 2009; GABARDO et al., 2014).

A produção mundial de soro de queijo é estimada em aproximadamente 180 a 190 milhões de toneladas anuais, sendo o Brasil um dos países que contribui com parcela significativa para essa geração (GUIMARÃES, TEIXEIRA & DOMINGUES, 2010; FISCHER & KLEINSCHMIDT, 2015; SMITHERS, 2015; DAS, RAYCHAUDHURI & GHOSH, 2016). Ademais, considerando que aproximadamente 46% do leite

produzido no Brasil são destinados para a produção de queijos, e que o Estado de São Paulo se encontra na quarta posição na produção leiteira (IBGE, 2019), faz-se necessária a implementação de tecnologias que venham agregar valor. Sendo assim, o soro de queijo não é visto como apenas um resíduo, mas como um substrato que contém nutrientes abundantes para a aplicação em áreas tecnológicas, tais como a de bioprocessos.

Como objeto de estudo, o presente trabalho utilizou o soro de queijo porungo para obtenção de um metabólito de alto valor agregado. O porungo é um queijo artesanalmente fabricado por agricultores na região sudoeste do estado de São Paulo, possuindo características semelhantes ao queijo mussarela, contudo fabricado com leite cru. Em seu processo de produção, o soro fermentado é adicionado ao leite para iniciar uma nova fabricação de queijo. O queijo porungo contém uma grande população de bactérias lácticas responsáveis por seus aspectos e características de sabor (PEZZO, 2017). Até o momento, não há relatos sobre o uso do soro de queijo porungo, portanto, sua biotransformação pode ser cientificamente interessante.

3.1.1 Aproveitamento biotecnológico

Diversos estudos têm demonstrado que o soro de queijo possui grande potencial para a produção de divergentes metabólitos de interesse industrial, tais como a produção de ácidos orgânicos (PANESAR et al., 2007; RAMCHANDRAN et al., 2012; MAGALHÃES, 2019), enzimas (RECH & AYUB, 2007; GUPTA & NAIR, 2010; ZHOU et al., 2013), etanol (SANSONETTI et al., 2009; CHRISTENSEN et al., 2011; GABARDO et al., 2014; 2016), polissacarídeos (GABARDO et al., 2010; SOBENES & RANULFO, 2015; SILVA, 2017), e outros bioprodutos.

A produção de etanol através da utilização do soro de queijo vem sendo cada vez mais estudada por inúmeros grupos de pesquisa, tratando-se de uma promissora alternativa tecnológica, devido principalmente as vantagens nutricionais e ambientais. Esse subproduto é considerado uma importante fonte de crescimento de microrganismos (*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotropicalis*) com especialidades únicas em metabolizar a lactose e bioconverter diretamente em etanol, podendo ser utilizado, por exemplo, nas formas *in natura*, em pó reconstituído e concentrado (GABARDO, 2015; COLOGNESI et al., 2017). Ainda, vale ressaltar que variáveis como temperatura, agitação, pH, concentração inicial de

inóculo e do substrato influenciam diretamente no processo fermentativo, na qualidade e quantidade para produção de etanol.

No estudo de Christensen et al. (2011) foram obtidos altos rendimentos de etanol ($0,50 \text{ g g}^{-1}$) ao testar a bioconversão do soro de queijo *in natura* a partir da levedura *Klyuveromyces marxianus* DSMZ 7239 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, em um processo batelada, demonstrando o potencial do soro de queijo como fonte de carbono. Gabardo, Rech & Ayub (2012) avaliaram a produção de etanol por diferentes linhagens de *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086 e CCT 2653) e em diferentes temperaturas (30°C - $40 \text{ }^\circ\text{C}$) em biorreator de leite fluidizado operado em regime batelada utilizando soro de queijo em pó reconstituído. Os autores verificaram a eficiência de bioconversão da lactose em etanol para as três linhagens testadas (79,1% - 83,3%) e que a melhor temperatura foi a de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Ainda, foi observado no mesmo estudo um aumento na produtividade volumétrica de aproximadamente 4 vezes ao utilizar operação contínua. Em estudo posterior, Gabardo et al. (2014) observaram que a suplementação de soro de queijo por outras fontes de nutrientes afetava negativamente as taxas metabólicas para as três linhagens de *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086 e CCT 2653), indicando ser o soro de queijo uma fonte única de carbono e de baixo custo para a produção de etanol. Ao testar permeado de soro de queijo concentrado, produto obtido do processamento do soro de queijo, em biorreator de leite fluidizado operado em regime batelada repetida Gabardo et al. (2016) observaram alta concentração de etanol (67 g L^{-1}) a partir da linhagem *K. marxianus* CCT 4086, o que reforça a potencialidade do soro de queijo como fonte rica em nutrientes para a obtenção biotecnológica de produtos como o etanol.

Em relação aos ácidos orgânicos, estes são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos como aditivos para controlar a alcalinidade de muitos produtos ou como conservantes. O ácido mais comumente utilizado para fins industriais é o ácido cítrico, o qual é fabricado pela fermentação aeróbica da sacarose ou dextrose através do fungo *Aspergillus niger*. No estudo de Magalhães et al. (2019) foi utilizado *Aspergillus niger* AN 400 para produção de ácido cítrico a partir de soro de queijo. A pesquisa foi dividida em três etapas, conforme adição de açúcar extra (50, 100 e 150 g L^{-1}): Etapa I, com glicose; Etapa II, com sacarose; e etapa III, apenas com o soro de queijo sem adição de açúcar extra. Os reatores em batelada permaneceram sob agitação de 150 rpm e a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, no período de 10 dias. A maior concentração de ácido cítrico ($2,38 \text{ mg L}^{-1}$) foi observada com a adição de glicose (100 g L^{-1}). Entretanto, em

termos de produtividade, os melhores resultados foram registrados nos reatores com 50 g L⁻¹ (458 mg L⁻¹ dia⁻¹) e 100 g L⁻¹ (745 mg L⁻¹ dia⁻¹) de sacarose, seguido pelo reator que continha apenas soro de queijo (313 mg L⁻¹ dia⁻¹), demonstrando o potencial deste para a obtenção desse ácido de grande interesse comercial.

A indústria de alimentos é uma das consumidoras primordiais de polissacarídeos, onde estes são aplicados principalmente como espessantes ou agentes de suspensão e geleificantes. Entretanto, também possuem efeitos secundários, que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, inibição de sinérese, encapsulação e formação de filmes. Entre as possíveis aplicações biotecnológicas para o aproveitamento do soro de queijo, encontra-se a produção de goma xantana, um polissacarídeo atóxico de grande aplicação em indústrias de alimentos, cosmética e química. A goma xantana é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, sob condições aeróbias a aproximadamente 28 °C, com pH próximo da neutralidade e o meio de cultura consiste de basicamente glicose e sacarose como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e traços de outros minerais (LIMA et al., 2001). Nos estudos de Sobenes & Ranulfo (2015) foram testados a produção de goma xantana utilizando três diferentes meios de cultivo à base de soro de queijo (soro de queijo desproteinado não suplementado; soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônia) a partir da linhagem *Xanthomonas campestris* ATCC 1395. O maior rendimento e melhor qualidade da goma foi observado para o meio soro de queijo desproteinado sem suplementação, sugerindo o soro como um meio de cultivo apropriado para a produção do polissacarídeo. Silva (2017) testou a produção de goma xantana a partir de quatro linhagens de *Xanthomonas campestris* (1182, 1866, 1230 e 2414) em soro de queijo esterilizado e soro de queijo desproteinado, ambos não suplementados. A maior produção da goma xantana foi obtida para a linhagem *X. campestris* 1230 no soro de queijo esterilizado. Já no soro de queijo desproteinado não houve diferença significativa na produção da goma entre as linhagens. Ademais, a produção de goma xantana em soro de queijo *in natura* por duas linhagens de *X. campestris* (1320 e DSM 1706) foi testada por Gabardo et al. (2010) e comparada com meio convencional de produção. Os resultados mostraram que a produção do polissacarídeo por soro de queijo é tão apropriada quanto em meio convencional a base de glicose, evidenciando

o grande potencial de aproveitamento deste subproduto para a geração de produtos de alto valor agregado.

Em face do exposto, nota-se que o soro de queijo serve como fonte alternativa de carbono possuindo ampla aplicação para a produção de metabólitos de interesse industrial e propagação de biomassa em processos biotecnológicos.

3.1.2 Produção biotecnológica de β -galactosidase por soro de queijo

Para a produção de enzimas comerciais se faz necessário a utilização de um conjunto de processos, onde a etapa fermentativa é tomada como referência, pois é nela em que ocorre a geração do produto alvo. No processo fermentativo, os meios de cultivo devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, minerais e fatores de crescimento, ressaltando que a otimização do meio de cultivo é um processo progressivo de aprimoramento. Ademais, a produção de enzimas geralmente ocorre em fermentadores operando na forma descontínua (batelada) e o controle das condições de processo como pH e temperatura também são de extrema relevância (LIMA et al., 2001). A tecnologia de produção da enzima de β -galactosidase utilizando meios de cultura mais baratos, tais como o soro de queijo, consiste em um dos processos biotecnológicos mais estudados e aplicados com êxito (SANTIAGO et al., 2004; LEMES, ÁLVARES & KALIL, 2012).

Com base na importância desta enzima na indústria alimentícia, a produção de β -galactosidase foi estudada por Santiago et al. (2004), que ao adicionar extrato de levedura em permeado de soro de queijo em um processo conduzido a batelada (30 °C, 150 rpm e pH 5,5), observaram melhorias na cinética de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, bem como na síntese da enzima. Resultado semelhante foi observado por Rech et al. (1999) que utilizou duas linhagens de *K. marxianus* (CBS 712 e CBS 6556) e soro de queijo como fonte de carbono em sistema batelada (30 °C, 200 rpm e pH 5,5), verificando o maior crescimento celular para a linhagem CBS 712 e maior atividade enzimática na condição de suplementação de soro de queijo com extrato de levedura. Outrossim, nessa mesma perspectiva, Manera et al. (2011) testaram a influência de fontes de nutrientes e condições de processo, obtendo maior atividade enzimática de β -galactosidase através da linhagem *K. marxianus* CCT 7082 quando o soro de queijo foi suplementado com água de maceração de milho (substituiu a peptona servindo como fonte de nitrogênio e sais

minerais) e hidrolisado de levedura Prodex-lac[®] (produto comercial com composição similar do extrato de levedura) em processo conduzido em batelada (30 °C, 180 rpm e pH 5,0). Resultados contraditórios aos trabalhos anteriormente reportados por Gupte & Nair (2010), em que a suplementação de soro de queijo por diferentes fontes de nitrogênio não influenciou na atividade enzimática da β -galactosidase produzida por *K. marxianus* NCIM 3551 em processo conduzido em batelada (25 °C, 100 rpm e pH 5,0).

Outrossim, outras metodologias têm sido empregues na tentativa de aprimorar a produção da enzima β -galactosidase, abrangendo a análise de diferentes variáveis de processo e a utilização de cultivo em batelada alimentada (RECH & AYUB, 2007; YOU et al., 2017), cultura contínua (ORNELAS et al., 2008) e engenharia genética (OLIVEIRA, GUIMARÃES & DOMINGUES, 2011; ZHOU et al., 2013). A combinação de três diferentes velocidades de agitação e aeração (500 rpm e 2 vvm, 600 rpm e 4 vvm, 700 rpm e 6 vvm) foi testada por Rech (2004) para avaliar a influência na produção da enzima por *K. marxianus* CBS 6556 a 37 °C. No estudo foi verificado que a maior produção da enzima ocorreu para a condição intermediária. A influência das variáveis agitação e aeração também foi testada por Perini, Souza & Schneider (2014) a partir de *K. marxianus* CBS 6556 a 31 °C, em que os autores verificaram que a maior atividade enzimática foi obtida para a condição de maior agitação e aeração (400 rpm e 2,7 vvm). Embora ambos os trabalhos tenham utilizado a mesma linhagem, *K. marxianus* CBS 6556, diferiram quanto a temperatura e utilização das fontes de nutrientes, o que pode ter contribuído para as diferenças observadas na resposta em relação às variáveis analisadas. Ao testar sistema de operação batelada alimentada, Rech & Ayub (2007) observaram um aumento na atividade enzimática específica, e consequentemente na produtividade específica, em que para a melhor estratégia de alimentação (alimentação linear ascendente por 35 h), esta foi superior a 50 % em relação ao processo em batelada.

3.2 *Kluyveromyces marxianus*

A espécie *Kluyveromyces marxianus*, inicialmente denominada como *Saccharomyces marxianus*, foi retratada pela primeira vez em 1888 por E. C. Hansen, que originalmente isolou este fermento de uvas. Dentro dessa espécie, existe outras linhagens que estão sendo isoladas a partir de diferentes ambientes naturais, o que

tem resultado em ampla diversidade metabólica entre as linhagens e conseqüentemente, levando a diversas aplicações biotecnológicas (WALKER, 1998; O'SHEA & WALSH, 2000; FONSECA et al., 2008; GUIMARÃES, TEIXEIRA & DOMINGUES, 2010; LANE et al., 2011).

A levedura *K. marxianus* é um fungo eucarioto, com dimensões que variam de 2 µm a 13 µm, unicelular e sem motilidade. Apresenta forma elipsoidal e/ou cilíndrica e sua reprodução pode ocorrer de forma sexuada (ascoporos) ou assexuada (brotamento) (PINHEIRO, 2004; TAVARES, 2017). Além disso, apresenta capacidade de produzir energia pelo metabolismo respiro-fermentativo, sendo considerada uma levedura aeróbia facultativa e, geralmente classificada como "Crabtree negativa". Este fenômeno pode ser definido como a ocorrência de fermentação para a geração de energia a partir de altas concentrações de açúcar, mesmo sob condições aeróbias (WALKER, 1998; BELLAVAR et al., 2004; PINHEIRO, 2004; FONSECA et al., 2008; LANE et al., 2011).

Além disso, algumas linhagens desta levedura possuem a característica fisiológica de crescer sob temperaturas que variam de 40 °C a 52 °C. Esta capacidade possui suma importância em processos industriais, pois permite economia de energia, uma vez que em diversos processos os custos de resfriamento podem ser reduzidos, bem como os riscos de contaminação. Também possui alta taxa de crescimento específico, alta capacidade de conversão de substrato em biomassa, capacidade de metabolizar inulina, xilana e pectina, além de ser aceita como microrganismo seguro (GRAS - *Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, o que aumenta significativamente seu potencial de utilização no setor de biotecnologia e na área de engenharia de alimentos (FONSECA et al., 2008).

A utilização de *K. marxianus* para a produção de β-galactosidase tem sido interesse de estudos e propostas industriais (BELLAVAR et al., 2004; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; LANE et al., 2011; FONSECA et al., 2013; FALLEIROS, 2016). Esta enzima é produzida intracelularmente, e diante disso, métodos de rompimento celular, como mecânicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes, são algumas das estratégias utilizadas (MEDEIROS, 2008). A ruptura celular é uma etapa essencial no processo de obtenção da β-galactosidase, consistindo na primeira etapa de isolamento de materiais intracelulares. Embora os métodos mecânicos não sejam específicos, estes possuem alta eficiência e ampla aplicação em comparação com outros métodos. As características do processo de rompimento podem variar

dependendo da estabilidade mecânica do microrganismo, a qual depende da espécie, idade da cultura e do meio de cultivo (MEDEIROS et al., 2008). Pelo fato da β -galactosidase ter aplicação direta em alimentos, permanecendo no produto final, a ruptura das células de *Kluyveromyces* não deve ser realizada por métodos químicos, pois implicaria na necessidade de retirada de contaminantes, gerando maior custo de produção. Nos estudos realizados por Medeiros et al. (2008), a ruptura das células de levedura foi mais efetiva à medida que se aumentou a carga de pérolas de vidro, sendo $1,10 \text{ g mL}^{-1}$ a massa de pérolas considerada mais eficaz. Segundo Dagbagli & Goksungur (2008), o processo de extração mais eficiente também foi observado através do método de agitação em vórtex utilizando pérolas de vidro. Nos estudos realizados por Freitas (2013) a ruptura das células de levedura foi mais efetiva utilizando $1,10 \text{ g mL}^{-1}$ de carga de pérolas de vidro e agitador do tipo vórtex por um período de 30 minutos, uma vez que se obteve uma atividade de $4730,38 \text{ U g}^{-1}$. Segundo Lemes; Álvares & Kalil (2012), o processo de extração mais eficiente também foi observado através do método de agitação em vórtex utilizando pérolas de vidro. Em contrapartida, Bansal et. al (2008) retrata que a homogeneização com esferas de vidro é um método mecânico que possui tendência não efetiva na ruptura de todas as células.

3.3 Enzima β -galactosidase

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23), popularmente conhecida como lactase, é classificada como uma hidrolase, responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$), originando como produtos uma mistura equimolar dos monossacarídeos glicose e galactose (GROSOVA, ROSENBERG & REBROS, 2008; FAI & PASTORE, 2015).

Baixas concentrações de β -galactosidase na parede da mucosa do intestino delgado faz com que a lactose não seja digerida de forma correta. Sendo assim, esse dissacarídeo passa para o intestino grosso, onde ocorre a fermentação pela microbiota do cólon. Esse processo leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta, além de gases como H_2 , CO_2 e metano, os quais podem causar sintomas que incluem dor abdominal, cólica, diarreia e náusea. Desse modo, essa enzima possui grande importância industrial, pois ao realizar a hidrólise da lactose de produtos lácteos, obtêm-se alimentos com baixos teores de lactose, resultando na melhora da

solubilidade e digestibilidade de leites e derivados lácteos, tornando-os ideais a consumidores intolerantes (MANERA et al., 2011; GODOY, 2016).

A β -galactosidase é largamente encontrada na natureza, distribuída entre animais (intestino e cérebro), vegetais (amêndoas, pêssego, damasco e maçã) e microrganismos (fungos filamentosos, bactérias e leveduras), sendo que suas características variam de acordo com sua origem. As condições ótimas de temperatura e pH para sua aplicação também diferem de acordo com sua respectiva fonte (SANTIAGO et al., 2004; GROSOVA, ROSENBERG & REBROS; MEDEIROS, 2008; TOMAL et al., 2010; FAI & PASTORE, 2015).

Comparado com fontes de animais e plantas, a produção microbiana gera maiores rendimentos, além de ser tecnologicamente importante, sendo as leveduras e fungos as fontes preferenciais para aplicações comerciais (SANTIAGO et al., 2004; GROSOVA et al., 2008). As principais enzimas de interesse comercial são isoladas principalmente das leveduras *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus* e dos fungos *Aspergillus niger* ou *A. oryzae* (GROSOVA, ROSENBERG & REBROS, 2008; PEREIRA et al., 2012; FAI & PASTORE, 2015). Não obstante, segundo a legislação brasileira (Resolução RDC nº 205/2006) a enzima β -galactosidase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana proveniente de espécies reconhecidas como seguras (*Generally Recognized As Safe*, GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (BRASIL, 2006). Fazem parte desse grupo todas as leveduras e fungos acima mencionados.

As β -galactosidases produzidas por fungos filamentosos como *A. niger* e *A. oryzae* possuem pH ótimo na faixa ácida que varia de 2,5 a 4,5, enquanto β -galactosidases produzidas por leveduras como *K. lactis* e *K. marxianus* e por bactérias como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus thermophilus* apresentam um pH ótimo próximo à neutralidade, variando de 6,0 a 7,0 e 6,5 a 7,5, respectivamente (GEKAS & LOPEZLEIVA, 1985; CAVAILLE & COMBES, 1995; MORIWAKI & MATIOLI, 2000). Com relação à temperatura ótima, β -galactosidases provenientes de fungos filamentosos atuam em temperaturas maiores (50 °C a 60 °C) do que àquelas obtidas por leveduras (35 °C a 40 °C). Além disso, as enzimas obtidas por diferentes microrganismos e inclusive por diferentes espécies de um mesmo gênero apresentam massa molecular variada.

3.4 Aplicação da enzima β -galactosidase na indústria

A importância industrial da β -galactosidase está correlacionada principalmente com sua aplicação na indústria de laticínios. As técnicas utilizadas para hidrolisar a lactose utilizando a enzima lactase consiste em um dos mais importantes processos biotecnológicos empregados na indústria de alimentos, permitindo a produção de produtos com teor de lactose reduzido, os quais são ideais para consumidores intolerantes à lactose, bem como melhorias no processamento, como por exemplo, a fabricação de leite com sabor adocicado (SANTIAGO et al., 2004; GROSOVA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012).

A maior parte da população mundial adulta (cerca de 75 %) sofre de alguma limitação no consumo de leites e derivados lácteos devido à má digestão da lactose, ocasionada por alguma deficiência de β -galactosidase, seja pela baixa expressão ou até mesmo pela ausência nas vilosidades do intestino delgado. Os sintomas de intolerância à lactose surgem quando a quantidade de lactose que chega no intestino é superior a capacidade intestinal de hidrolisá-la, resultando em modificações na flora intestinal que ocasiona desconfortos intestinais como a produção excessiva de gás e de ácido, dor abdominal, flatulência e diarreia (MORIWAKI & MATIOLI, 2000; MLICHOVA & ROSENBERG, 2006).

Com isso, nota-se que a atividade da enzima β -galactosidase é imprescindível para a digestão da lactose, pois essa enzima hidrolisa as ligações entre glicose e galactose; e os açúcares assim separados podem ser normalmente digeridos. Acrescido a isso, outro benefício advindo da hidrólise enzimática da lactose para a saúde, é a simultânea formação de galactooligossacarídeos (GOS), sendo utilizados como prebióticos em alimentos, uma vez que são não digeríveis, atuando como fibras alimentares. Estes estimulam preferencialmente o crescimento de microrganismos benéficos já presentes no cólon, tais como os *Lactobacilos* sp e *Bifidobacterium* sp, impulsionando o bom funcionamento do organismo (MORIWAKI & MATIOLI, 2000; MLICHOVA & ROSENBERG, 2006).

Além dos benefícios à saúde, a hidrólise da lactose tem sido extensivamente estudada aos interesses tecnológicos, apresentando diversas vantagens. O alto teor de lactose em produtos lácteos como sorvete, leite condensado e doce de leite pode levar a uma cristalização excessiva da lactose, resultando em produtos com uma textura arenosa. A utilização da enzima de β -galactosidase para processar tais

produtos pode reduzir as concentrações de lactose a valores aceitáveis, e assim melhorar a qualidade tecnológica e sensorial dos produtos lácteos (MLICHOVÁ & ROSENBERG, 2006; GROSOVA et al., 2008). A hidrólise da lactose também permite vantagens na condução de alguns processos, como por exemplo, na produção de iogurte em que o tempo de fermentação é reduzido em virtude dos monossacarídeos serem mais rapidamente assimilados pelas bactérias (MLICHOVÁ e ROSENBERG, 2006). Acrescido, a aplicação da β -galactosidase resulta em modificações das propriedades físicas e químicas dos produtos resultantes da hidrólise, como por exemplo, no aumento do poder adoçante e da solubilidade (ZADOW, 1993; KARDEL et al., 1995).

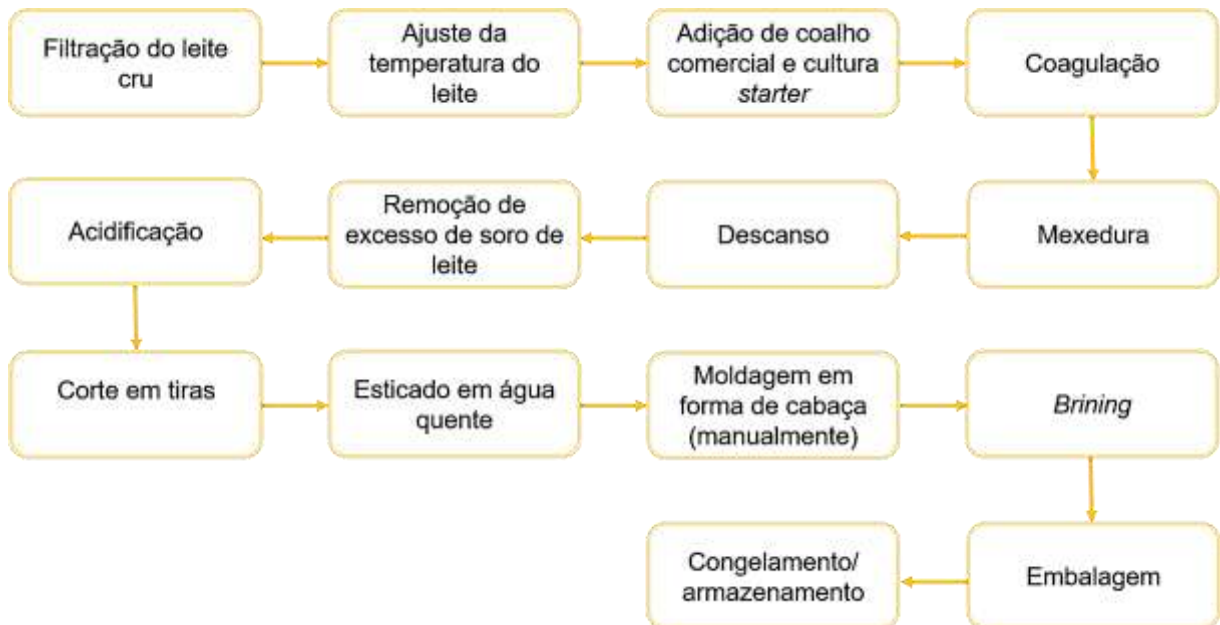
O mercado de produção da enzima β -galactosidase é dominado por consolidadas empresas dinamarquesas como a Novo Nordisk A/S, que comercializa a β -galactosidase sob o nome de Lactozym[®], a Chr. Hansen, que comercializa a enzima denominada NOLA[®] Fit e a Novozymes, que juntamente com a Granotec/Granolab comercializa o produto específico para iogurtes Granolact 6500 Y. Além dessas empresas, existe a holandesa Royal Gist-Brocades NV que comercializa a enzima sob o nome Maxilact[®].

3.5 Queijo porungo

O queijo porungo é produzido de forma artesanal por pequenos produtores localizados nas cidades de Campina do Monte Alegre, Angatuba e Buri, da região sudoeste do estado do São Paulo (PEZZO, 2017). O aproveitamento do soro de queijo obtido a partir do queijo porungo consiste em uma fonte de nutrientes ainda não explorada, sendo sua investigação cientificamente interessante.

Além disso, o queijo porungo possui características similares às da mussarela de massa filada, ou seja, o mesmo é moldado a partir de imersão em água quente, para obtenção do formato de cabaça. Ademais, outra característica importante é a utilização do soro-fermento, coletado da própria produção do queijo, armazenado de um dia para o outro e adicionado ao leite para conferir consistência e sabor ao Porungo. O soro-fermento consiste em um líquido fermentado que contém grande população de bactérias lácticas. O processo de produção do queijo Porungo está representado na figura abaixo.

Figura 1 – Fluxograma de produção do queijo porungo



Fonte: Adaptado de SILVA et. al. (2020)

Em suma, o leite fresco é posto em recipientes de alumínio ou plástico na mesma temperatura de ordenhada ($\approx 35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posto isso, uma cultura *starter* natural (soro-fermento) é adicionada ao leite acrescida do coalho líquido comercial. O leite com os ingredientes fica em repouso para que ocorra a coagulação. A coalhada formada é cortada em pedaços e, juntamente com o soro são agitados suavemente. Quando os pedaços da coalhada são considerados secos o suficiente, a agitação é cessada, assim, os pedaços descem e permanecem no fundo do recipiente juntamente com o soro para permitir a formação de uma única massa. Posteriormente, o excesso de soro é removido, e uma pequena parte é mantida em temperatura ambiente para ser utilizado na produção do dia seguinte. A coalhada é então cortada em tiras, esticada manualmente em água a $80 - 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e moldada em formatos de cabaça. Por fim, os queijos são salgados em salmoura em temperatura ambiente por três a dez horas, dependendo da massa do queijo (SILVA et. al., 2020).

As pesquisas e a atuação da Universidade em conjunto com os produtores de queijo porungo têm apoiado a comunidade no aprimoramento de produtos e processos, além de preservar a tradição do porungo.

4 ARTIGO 1

Este artigo foi aceito para publicação na revista *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* no dia 06 de agosto de 2020.

Porungo cheese whey: a new substrate to produce β -galactosidase

ABSTRACT

The bioconversion of porungo cheese whey to produce β -galactosidase in batch system was studied. The whey released after curd cutting and precipitation during porungo cheese production was collected in borosilicate flasks. Two strains of *Kluyveromyces marxianus*, CCT 4086 and CBS 6556, and whey supplementation with different nitrogen sources were evaluated. Different temperatures (30 °C and 37 °C) and pH values (5.0 to 7.0) were investigated to establish the best conditions for enzyme production. The highest enzymatic activity was obtained by *K. marxianus* CCT 4086 in porungo cheese whey supplemented with yeast extract (16.73 U mL⁻¹). *K. marxianus* CCT 4086 produced superior β -galactosidase activity when compared to CBS 6556 for all media tested (ranging from 11.69 to 14.40 U mL⁻¹). Highest β -galactosidase activity was reached under conditions of pH 7.0 and 30 °C using *K. marxianus* CCT 4086 in the better media composition. The lowest enzymatic activity was observed at 37 °C for all pH values tested (10.69 U mL⁻¹ to 13.94 U mL⁻¹) and a highest β -galactosidase activity was reached in pH 7.0 for both two temperatures (11.42 to 15.93 U mL⁻¹). Porungo cheese whey shows potential for industrial β -galactosidase production by microbial fermentation.

KEYWORDS: Whey. β -galactosidase. *Kluyveromyces marxianus*. Agroindustrial residues.

4.1 Introduction

Whey is the main by-product of the dairy industry, being a significant source of environmental pollution because of its high volumes of production and organic load. This by-product has a biological oxygen demand (BOD) ranging from 30 g L⁻¹ to 50 g L⁻¹, which associated with improper disposal, can lead to serious environmental problems (Kosseva et al. 2009, Prazeres et al. 2012). Although about half of the total worldwide production of whey is disposed in wastewater treatment plants or reused in farms, whey presents an interesting composition of lactose (45–50 g L⁻¹), protein (6–8 g L⁻¹), lipids (4–5 g L⁻¹), and mineral salts (5–7 g L⁻¹), thus showing great potential for use in bioprocess to obtain compounds of interest, such as the enzyme β -galactosidase (Rech & Ayub 2007, Gupte & Nair 2010, Choonia & Lele 2013, Gabardo et al. 2014). Since the annual worldwide production of whey is estimated at around 160 million tons, the implementation of the technologies that contribute to obtain high added-value products using it in new processes characterizes an important industrial gain (Guimarães et al. 2010, Gabardo et al. 2014).

Porungo is an artisanal cheese traditionally manufactured by farmers using raw milk in the southwestern region of São Paulo State, Brazil, and has similar characteristics of mozzarella cheese. On its production process, fermented-whey (endogenous culture) is added in the milk to start a new production of cheese. Porungo cheese contains a large population of lactic bacteria responsible for its aspect and flavor characteristics (Pezzo 2017). So far, there are no reports on the industrial use of porungo cheese whey, therefore, its biotransformation may be scientifically interesting.

The β -galactosidase enzyme, commercially known as lactase (EC 3.2.1.23), is classified as a hydrolase that catalyzes lactose hydrolysis, resulting in the equimolar mixture of glucose and galactose (Grossova et al. 2008, Fai & Pastore 2015). β -galactosidase is widely used in the food industry for low-lactose products, which offers benefits in health and food technology (Grossova et al. 2008, Husain 2010). This enzyme is found in vegetables (almonds, peaches and apples), animals (intestines and brains), and microorganisms (filamentous fungi, bacteria and yeasts) (Santiago et al. 2004, Grossova et al. 2008, Fai & Pastore 2015). However, microbial production is the industrial choice, since it allows for higher yields and controls, being yeasts and fungi the preferred microorganisms for commercial applications. In this context, the yeasts

of the genus *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. fragilis*, and *K. marxianus*), and the fungi *Aspergillus niger* and *A. oryzae* have been reported as the main sources of commercial enzymes (Santiago et al. 2004, Grosova et al. 2008, Pereira et al. 2012, Fai & Pastore 2015).

The production of β -galactosidase has been successfully studied by different research groups (Rech et al. 1999, Santiago et al. 2004, Manera et al. 2011) evaluating the influence of different lineages, media and process conditions. In this sense, several strategies were researched for the production of β -galactosidase, involving cultivation in fed batches (Rech & Ayub 2007, You et al. 2017), continuous culture (Ornelas et al. 2008) and genetic engineering (Oliveira et al 2011, Zhou et al. 2013). Regarding batch cultivations, different yeast strains and supplementation of cheese whey, using different nitrogen sources have been investigated. Improvements in the growth kinetics of *K. marxianus* ATCC 46537 in the enzymatic synthesis were observed by Santiago et al. (2004), when cheese whey permeate was supplemented with different yeast extract concentrations. In this study, performed at 30 °C, 150 rpm and pH 5.5, the enzymatic activity was not influenced by the concentration of yeast extract (6 g L⁻¹ or 12 g L⁻¹), however, the addition of this nitrogen source significantly increased the enzymatic activity when compared with media without supplementation. A similar result was obtained by Rech et al. (1999) when testing two different nitrogen source (yeast extract and urea) and two strains of *K. marxianus* (CBS 712 and CBS 6556) in cultivations using cheese whey at 30 °C, 200 rpm and pH 5.5. According to the authors, urea supplementation led to a limited growth of the strains due to the alkalization of the culture medium. The highest cell growth and enzymatic activity occurred when media was inoculated with *K. marxianus* CBS 712 and supplemented with yeast extract. Manera et al. (2011) tested the influence of different concentration of two nutrient sources, corn steep liquor and Prodex-lac® yeast hydrolysate, and pH values, ranging from 5.0 to 7.0. They observed that the highest enzymatic activity of β -galactosidase from *K. marxianus* CCT 7082 was obtained at 30 °C and 180 rpm with the increased concentration of corn steep liquor and decrease of pH. β -galactosidase is an intracellular enzyme and requires cell disruption for its release, a fundamental step in the downstream processes. Different methods can be used to extract intracellular enzymes, depending of the microorganism type, its location within the cell and the desired use of the compound of interest. Mechanical, physical, chemical, enzymatic methods and the combination of these can be applied. However, because

β -galactosidase has its main application in food, the disruption of *Kluyveromyces* cells should not be carried out by chemical methods, as it would require decontamination, increasing production costs. On the other hand, mechanical methods of cell disruption do not imply toxicity risks, as they do not include chemicals in the process (Medeiros et al. 2008). Among the mechanical methods, cell-breaking using glass beads as well as ultrasonic energy-break are considered highly efficient methods. Mechanical disruption using glass beads is considered simple, since it does not require a large operational apparatus, as it basically uses glass beads abrasion and shear, leading the cell wall rupture and release of the enzyme (Lemes et al. 2012).

From these considerations, we can devise the biotechnological potential of using porungo cheese whey as alternative carbon source to produce β -galactosidase enzyme, allowing the use of this agroindustrial by-product from the dairy farms to obtain added-value biomolecules to be used in the food industry, contributing to the regional development. Therefore, the aims of this research were to investigate the synthesis of β -galactosidase enzyme using porungo cheese whey as substrate to *K. marxianus* culture as biocatalyst. Different strains and media supplement, pH, and temperature were evaluated in order to establish the optimal conditions of enzyme production.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Microorganisms

Kluyveromyces marxianus CBS 6556 was obtained from Centraalbureau voor Schimmel-Cultures (Amsterdam, The Netherlands) and *K. marxianus* CCT 4086 was provided by Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil), both donated by Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), of the Food Science and Technology Institute (ICTA) of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The strains were maintained on agar slants at 4 °C, as reported elsewhere (Furlan et al. 1995).

4.2.2 Porungo cheese whey characterization

Porungo cheese whey was provided by farmers located in the southwestern region of São Paulo State, in the Lagoa do Sino Territory, Brazil. The whey was obtained through the production process of the artisanal porungo cheese. After raw milk coagulation by the addition of rennet and fermented whey (which contains the endogenous microbiota), the curd was cut to obtain the separation of the solid fraction (proteins and fats) and the liquid (whey). In this stage, a small volume of approximately 2 L of whey were collected in plastic bottle and kept under room temperature for fermentation (used in the next day production) and the rest was collected in sterilized borosilicate reagent flasks and transported in isothermal boxes to the laboratory. This material was stored frozen at -20 °C until use.

The protein content of porungo cheese whey was determined by Micro-Kjeldahl method, using 6.38 as correction factor (Instituto Adolfo Lutz 2004). Ashes were determined by Adolfo Lutz Institute 2004 methodology by incinerating 20 mL of porungo cheese whey, followed oven burning at 550 °C in a muffle. The lipid content was evaluated by the butyrometric method using sulfuric acid and isoamyl alcohol as reagents (Lanagro, 2014). Total dry extract content was determined according to Adolfo Lutz Institute 2004 in an oven at 105 °C until constant mass. Lactose was evaluated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller 1959), from a lactose calibration curve.

4.2.3 β -Galactosidase production in batch system

The enzyme production was studied in two steps. First, two strains of *K. marxianus* and three different media were tested in a rotary shaker to evaluate the conversion of porungo cheese whey into β -galactosidase. The media composition tested were porungo cheese whey without any supplementation (S); porungo cheese whey supplemented with 3 g L⁻¹ of yeast extract (SE); and porungo cheese whey supplemented with 3 g L⁻¹ of yeast extract and 5 g L⁻¹ of bactopectone (SEP). To avoid precipitation during autoclaving, whey proteins were hydrolyzed using a commercial protease (Alcalase 2.4 L, 2.4 UA-A g-1, Tovani Benzaquen Ingredients, São Paulo, Brazil) at pH 8.5, 55 °C for 3 h. Inocula were prepared by transferring isolated yeast colonies to a 250 mL conical flasks containing 50 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L⁻¹; bactopectone, 20 g L⁻¹; lactose, 20 g L⁻¹), pH 7.0, and incubated in an orbital shaker at 200 rpm for 15 h at 30 °C. Cell concentration was adjusted for optical

density at 600 nm (OD_{600nm}) of 1, which corresponded to 1.5 g L^{-1} for *K. marxianus* CBS 6556 and 1.4 g L^{-1} for *K. marxianus* CCT 4086. The fermentation experiments were carried out in conical flasks of 250 mL containing 45 mL of sterilized cultivation media and 5 mL of inoculum totalizing 50 mL of fermentation medium at 30°C and 200 rpm. Batch cultivations were carried out in duplicate. The samples were withdrawn periodically at each 5 h up to 25 h of cultivation.

In the second experimental step, the influence of the temperature (30 °C and 37 °C) and pH (5.0, 6.0, and 7.0) was evaluated. The fermentation was conducted using the best media obtained in the previous step, using porungo cheese whey supplemented with yeast extract and the *K. marxianus* CCT 4086 strain. This step was performed in 250 ml conical flask filled with 50 ml of the total fermentation volume, incubated under stirring of 200 rpm for a period of 25 h. The samples were withdrawn periodically at each 5 h. All experiments were performed in duplicate. Data were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) using Statistica 7.0 software (StatSoft, USA).

4.2.4 Analytical determinations

4.2.4.1 Mechanical cell disruption

Because β -galactosidase is an intracellular enzyme, a cell wall disruption step is required to release the enzyme from the cytosol of strains *K. marxianus* CCT 4086 and CBS 6556. Thus, cells collected at $3,000 \times g$ for 15 min at room temperature, with the supernatant separated for lactose determinations and the cell pellet resuspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) for subsequent enzymatic extraction. The cell wall was broken using 1.1 g of glass beads per ml of cell suspension (Medeiros et al. 2008) under vigorous agitation for 5 min using a vortex to allow cell wall abrasion and shear. The supernatant containing the enzyme was separated by the cell debris by centrifugation under the same conditions as described above and then used to determine enzyme activity. Tests were performed to determine which time, 5 or 10 min, lead to better cell disruption (data not shown). As time did not differ in the enzymatic activity, time of 5 min was chosen in this work.

4.2.4.2 Biomass and lactose concentration

Cell concentration was determined by optical density at 600 nm and correlated with dry cell weight (g L^{-1}). Lactose concentration was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller 1959) using lactose calibration curve as standard.

4.2.4.3 β -galactosidase activity

The determination of β -galactosidase enzymatic activity was performed using ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) as substrate, according to Klein et al. 2013. The reaction occurred by mixing and incubating 50 μL of enzyme and 0.5 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1.5 mM of magnesium chloride (MgCl_2) containing 10 mM of ONPG at 37 °C for 2 min. The reaction was stopped by adding 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 10.0). The o-nitrophenol (ONP) released was determined using spectrophotometer at 415 nm. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of ONP per minute under analysis conditions.

4.2.4.4 Enzymatic assay of the produced β -galactosidase

To investigate the optimum temperature and pH of the β -galactosidase, the enzyme activity under different conditions were measured. The optimum temperature of β -galactosidase was evaluated ranging from 20 °C to 60 °C in activity buffer at pH 7.0. Likewise, the optimum pH of β -galactosidase was evaluated ranging from 5.5 to 8.0 at 37°C. The reaction occurred using 50 μL of β -galactosidase extract and 0.5 mL of activity buffer containing 10 mM ONPG for 2 min.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Composition of porungo cheese whey

The centesimal composition of porungo cheese whey used in this work is presented in Table I. Cheese whey, in general, is described as containing water (94-95 %), lactose (4.5-5 %), proteins (0.8-1 %), lipids (0.4-0.5 %) and mineral salts (0.7-0.8 %) (Siso 1996, Christensen et al. 2011, Das et al. 2016). However, the composition

depends on several factors, such as the type of milk used in cheese production, the technological processes used and the type of animal species and their diet (Vasconcelos et al. 2018). The values obtained in this study are in agreement with those found by Carvalho 2007, in which the average lactose is around 5 % and the average protein amount is 0.95 %. Similar results were obtained by Boldrinia et al. 2011, who found percentages of approximately 4.7 % for lactose and 1.5 % for total proteins, and by Kosikowski 1979, who reported values of 4.9 % for lactose and 0.5 % for ashes. This composition, specially the lactose content, reinforces the idea that porungo cheese whey is rich in fermentable carbohydrate with high potential for β -galactosidase production.

4.3.2 β -galactosidase production by diferente strains and media

These experiments were carried out in order to determine the effect of media supplementation on the ability of the two strains of *K. marxianus*, to use the porungo cheese whey in the bioconversion to β -galactosidase. Once β -galactosidase enzyme remains intracellularly, cell disruption is an essential step in the process to obtain this enzyme (Medeiros et al. 2008, Dagbagli & Goksungur 2008). Although mechanical methods are not specific, they have high efficiency and wide application compared to other methods, such as enzymatic digestion of cell wall (Numanoglu & Sungur 2004, Medeiros et al. 2008). Although the chemical method has been described as more efficient in some studies (Becerra et al. 1998, Bansal et al. 2008) the chemical cell rupture would imply in the contaminant removal, with increased production costs (Medeiros et al. 2008). However, Numanoglu & Sungur 2004 compared physical and chemical procedures, reporting that the activities were not significantly different. Medeiros et al. 2008, investigated the effect of the amount of glass beads (0.44 to 1.1 g mL⁻¹ of cell suspension) and the time of cell rupture (10 min to 40 min), reporting best results for 1.1 g of beads per mL of cell suspension and that times over 10 min did not increased enzymatic activity. Dagbagli & Goksungur 2008, tested different chemical and mechanical methods for obtaining the intracellular β -galactosidase from *K. lactis*. The highest enzymatic activity (3,416.6 U g⁻¹) was obtained when the cells were permeabilized using isoamyl alcohol. Similar result was obtained by mechanical rupture of the cells using glass beads (3,038.9 U g⁻¹) and the lowest enzymatic activities were found when using Triton X-100 (1,888.8 U g⁻¹), liquid nitrogen (1,199.4

U g⁻¹), SDS (964.3 U g⁻¹), and sonication (152.6 U g⁻¹). Thus, the extraction process using glass beads under vortex agitation proved to be very efficient. Freitas 2013, studied two methods based on using 1.10 g of glass beads per mL: 1) rupture following 30 min vortex agitation with intervals of 2 min in ice-bath every 5 min and, 2) rupture by 40 min of ultrasound at 25 °C with an interval of 10 min preventing enzyme denaturing caused by water overheating. The first strategy showed a superior enzymatic activity (87.4 %) compared with second strategy. Based on these studies, in this work we used 1.1 g of glass beads per mL of cell suspension and tested two different times for cell rupture: 5 min and 10 min. Enzymatic activity did not differ for the two rupture cell times tested (data not shown). Thus, cells were disrupted for 5 min.

The enzymatic activity was influenced by both strain and culture media. The Tukey test showed statistical differences ($p < 0.05$) between media S and the media with supplementation, SE and SEP, but not between these last two. The highest enzymatic activity was obtained for *K. marxianus* CCT 4086 strain in porungo cheese whey supplemented with yeast extract (SE) and the lowest values were obtained in porungo cheese whey without supplementation (S) for the two strains tested (Figure 1 and 2). In all experiments (three media and two strains) the highest enzymatic activity was achieved in 20 h of cultivation. Kinetics of lactose consumption, enzymatic activity and biomass formation for *K. marxianus* CBS 6556 in different media are shown in Figure 1. Lactose was practically consumed following 25 h of cultivation for all tested media, ranging from 92.4 % to 93.3 %, being the lowest consumption for the porungo cheese whey without any supplementation (S). Moreover, the lowest biomass concentration was observed in the whey without supplementation (5.35 g L⁻¹). The same behavior was observed to enzymatic activity, reaching of 11.69 U mL⁻¹ for S media compared to a maximum of 14.45 U mL⁻¹ in porungo cheese whey supplemented with yeast extract (SE). Lactose was totally consumed for *K. marxianus* CCT 4086 in 20 h of cultivation for the all media tested (Figure 2), however a slower lactose metabolization kinetics was observed for S media when compared to the other two cultivation media (SE and SEP). Biomass concentration was similar for all media evaluated, reaching of 4.55 g L⁻¹, 4.36 g L⁻¹ and 4.24 g L⁻¹ in S, SE and SEP, respectively, after 20 h of cultivation. Moreover, the enzyme activity was highest in 20 h of cultivation for all media tested, ranging from 14.41 U mL⁻¹ to 16.73 U mL⁻¹ in S and SE media, respectively. An enzymatic activity of 14.54 U mL⁻¹ was obtained in SEP following 20 h of cultivation. The results are in agreement with Rech et al. 1999 and

Santiago et al. 2004, who observed the highest cell growth and β -galactosidase synthesis using cheese whey or cheese whey permeate supplemented with yeast extract using different strains of *K. marxianus*. Rech et al. 1999 reported that specific β -galactosidase activity did not differ between *K. marxianus* CBS 6556 and CBS 712 strains, although the last strain showed a higher biomass concentration. Braga et al. 2012 investigated the optimal enzyme condition, using cheese whey and rice effluent in cultures of *K. marxianus* CCT 7082, and the supplementation of the media with yeast extract led to a highest enzymatic activity of 10.45 U mL⁻¹, lower than that obtained in this work. Contradictorily, Gupte & Nair 2010 observed that enzymatic activity was not influenced by supplementation of the cheese whey with different nitrogen sources using *K. marxianus* NCIM 3551. Although in this work the enzymatic activity did not differ between SE and SEP ($p < 0.05$) for the two strains studied, subsequent tests were performed using SE because it would be a cheaper media. The strain *K. marxianus* CCT 4086 was chosen because it produced the highest enzymatic activity.

4.3.3 β -galactosidase production on diferente pH and temperature

Enzyme activity of *K. marxianus* CCT 4086 growing in SE was influenced by both pH and temperature ($p < 0.05$), reaching the highest amount of 15.93 U mL⁻¹ at pH 7.0 and 30 °C (Table II). Lactose was completely consumed following 25 h of cultivation for all tested pH (5.0, 6.0 and 7.0), with a slower lactose metabolization at pH 5.0 for both temperatures tested (Figure 3 and 4). The pH also influenced the biomass formation. While the lower pH (5.0) produced less biomass in both temperatures (4.49 g L⁻¹ and 5.27 g L⁻¹), the highest biomass concentration of 7.68 g L⁻¹ and 6.95 g L⁻¹ at 30 °C and 37 °C, respectively, was achieved at pH 7.0. The enzymatic activities of all cultures peaked at 20 h of fermentation. Again, highest values of enzymatic activity were influenced by pH, the lowest at pH 5.0 and the highest at pH 7.0. Regarding temperature, at 37 °C the lowest values were found, and the highest, at 30 °C (Table II). Similar results were observed by Furlan et. al. (2001), who reported maximum β -galactosidase enzymatic activity at 30 °C and minimum at 37 °C in cultures of *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 in sugar-cane molasses medium (100 g L⁻¹).

The maximum specific growth rate (μ_{max}), the yields of biomass formation ($Y_{X/S}$), specific product ($Y_{P/X}$), and yields of product per substrate ($Y_{P/S}$), calculated at 20 h of

cultivation are shown in Table III. The lowest temperature (30 °C) led to the highest values of all kinetics parameters for all pH tested. The kinetic parameters increased with increased of pH values, except for $Y_{P/X}$, which was decreasing with pH. Rech et al. 2009 found highest values of μ_{max} (0.49-0.61 h⁻¹) and $Y_{X/S}$ (0.29-0.71 g g⁻¹) for the two *K. marxianus* CBS 712 and CBS 6556, in experiments conducted in bioreactors. Although Machado et al. 2015 found the enzymatic activity of 41.7 U mL⁻¹ in cultures of *K. marxianus* CCT 7082 in cheese whey and glycerol, pH 5, the specific product concentration was 1.85 U g⁻¹ of dry cell, a value very smaller than that obtained in this work (2.55 U mg⁻¹). Alves et al. 2010 evaluated the kinetic parameters using synthetic lactose media and different aeration conditions in bioreactor and found the range of enzymatic activity ranging from 4.7 U mL⁻¹ to 14.6 U mL⁻¹, the $Y_{X/S}$ range of 0.07 g g⁻¹ to 0.35 g g⁻¹ and $Y_{P/X}$ range of 0.26 g g⁻¹ to 0.59 U g⁻¹. Our results indicate the potential of using porungo cheese whey in this bioprocess.

4.3.4 Optimal conditions for enzyme activity

The effect of the temperature and pH on the relative activity of the β -galactosidase produced by *K. marxianus* 4086 using porungo cheese whey as substrate is presented in Figure 5. The enzyme showed optimal activity at 37 °C and pH 6.5, in agreement with other studies using β -galactosidase from *Kluyveromyces* sp. (Siso 1996, Jurado et al. 2002, Mlichová & Rosenberg 2006, Klein et al. 2013). The enzymatic activity is dependent on the temperature (Figure 5a), in which an ascendant activity was observed up to reach the maximum activity at 37 °C. Above this temperature, the activity sharply declined due to enzyme denaturation. This occurs because the activation energy (E_a) values for enzyme deactivation is typically higher than the E_a values for activation effect, once protein denaturation involves unfolding of large segments of the polypeptide chain (global process), requiring greater free energy change than that required for stabilization of the transition state at the active site (localized process) (Damodaran et al. 2007). The pH effect on the relative activity of β -galactosidase was evaluated in the range of 5.5 to 8.0 (Fig. 5b). The enzymatic activity was upward until pH 6.5, when it reached the maximum value and from which activity started to decline. Ionizable groups in enzymes can undergo transitions dependent of the pH based on the pK_a values of the amino acid residues (Damodaran et al. 2007). The low enzymatic activity at pH 5.5 occurs because the isoelectric point (pI) of the β -

galactosidases is 5.42 (Zhou & Chen 2001). The enzyme showed optimal activity at pH 6.5 probably due to that the β -galactosidase has two active-site carboxyl groups in active site, one protonated (Glu⁴⁸²) and one ionized (Glu⁵⁵¹), being both able to coexist in the same time at neutral pH (Zhou & Chen 2001).

The results obtained in this work are similar to Jurado et al. 2002 that studied the effect of temperature and pH on the activity of β -galactosidase produced by *Kluyveromyces fragilis* and found the highest enzymatic activity at temperature 37 °C and pH 6.6. When investigating the influence of temperature (17-42 °C) and pH (5.0 to 9.0) on the activity of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the free form, Song et al. 2010 also found the optimum temperature of 37 °C and pH value of 7.0. Although in the study of Klein et al. 2013 the authors observed the maximum β -galactosidase activity at 45 °C using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Maxilact LX 5000) in free form, the optimum pH of 6.5 was in accordance with results in this work. Since the optimum pH of the β -galactosidase is near neutral, the enzyme is quite suitable for saccharifying milk and sweet whey, setting up a higher demand to be used in these products compared to β -galactosidases from fungi species (Siso 1996, Mlichová & Rosenberg 2006). The knowledge of the optimum enzymatic conditions consists as an important tool for its industrial application.

Porungo cheese whey proved to be an alternative and inexpensive carbon source for β -galactosidase production, even when non-supplemented. Moreover, the use of this by-product allows to associate both the reduction of environmental impacts caused by its inadequate disposal, with the production of a biomolecule that can be applied in the development of new products of the food industry. This study is a pioneer in the investigation of the biotechnological potential of the whey obtained from the porungo cheese, which may contribute to advances in scientific studies in the area of bioprocesses and food engineering.

4.4 CONCLUSION

Results showed the promising use of porungo cheese whey to produce β -galactosidase enzyme, using minimally media supplementation. The two yeast strains were able to produce biomass and the target enzyme. *K. marxianus* CCT 4086 was more efficient in the production of β -galactosidase using porungo cheese whey as substrate when supplemented with yeast extract at pH of 7.0 and temperature of 30

°C. Porungo cheese whey has not been used in bioprocess before and this is one of the first research on its potential use in biotechnology.

REFERENCES

ALVES FG, MAUGUERI FILHO F, BURKERT JFM & KALIL SJ. 2010. Maximization of β -galactosidase production: A simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 1528-1539.

BANSAL S, OBEROI HS & DHILLON GS. 2008. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian J Med Microbiol* 48: 337-341.

BECERRA M, CERDÁN E & GONZÁLEZ SMI. 1998. Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase purification. *Biol Proced* 1: 48-58.

BOLDRINIA FM, TOMALA AAB & CUNHA MET. 2011. Extração de Proteínas do Soro de Leite por Coacervação com Polissacarídeo e Sua Utilização em Formulação Cosmética. *UNOPAR Cient Exatas Technol* 10: 43-48.

BRAGA ARC, GOMES PA & KALIL, SJ. 2012. Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for β -galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food Bioprocess Technol* 5: 1653-1663.

CARVALHO BMA. 2007. Detecção de Soro de queijo em leite por espectrofotometria no infravermelho médio. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 125p.

CHOONIA HS & LELE SS. 2013. Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for β -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor. *Biochem Eng J* 77: 49-57.

CHRISTENSEN AD, KADAR Z, OLESKOWICZ-POPIEL P & THOMSEN MH. 2011. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 283-289.

DAGBAGLI S & GOKSUNGUR Y. 2008. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electron J Biotechnol*. 11: 11-12.

DAMODARAN S, PARKIN KL & FENNEMA OR. 2007. Fennema's Food Chemistry. Boca Raton: CRC Press, Fourth Edition, 1160 p.

DAS M, RAYCHAUDHURI A & GHOSH SK. 2016. Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environ Sci* 35: 833-846.

FAI AEC & PASTORE GM. 2015. Galactooligosaccharides: production, health benefits, application to foods and perspectives. *Sci Agropec* 6: 69-81.

FREITAS MFM. 2013. Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyceslactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana. Dissertation (Master in Chemical Engineering) - Technology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE.

FISCHER C & KLEINSCHMIDT T. 2015. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *Int Dairy J* 48: 15-22.

FURLAN SA, SCHNEIDER ALS, MERKLE R, CARVALHO-JONAS MF & JONAS R. 2001. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium. *Acta Biotechnol* 21: 57-64.

GABARDO S, RECH R, ROSA CA & AYUB MAZ. 2014. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy* 69: 89-96.

GROSOVA Z, ROSENBERG M & REBROS M. 2008. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A Review. *Czech J Food Sci* 26: 1-14.

GUIMARÃES PMR, TEIXEIRA JA & DOMINGUES L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28: 375-384.

GUPTE AM & NAIR JS. 2010. β -galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *J of Sci Ind Res* 69: 855-859.

HUSAIN Q. 2010. β -galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* 30: 41-62.

Instituto Adolfo Lutz., 2008. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p.

JURADO E, CAMACHO F, LUZÓN G & VICARIA JM. 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lacyose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enz Microb Technol* 31: 300-309.

KLEIN MP, FALLAVENA LP, SCHÖFFER JN, AYUB MAZ, RODRIGUES RC, NINOW JL & HERTZ PF. 2013. High stability of immobilized β -galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydr Polym* 95: 465-470.

KOSIKOWSKI FV. 1979. Whey utilization and whey products. *J Dairy Sci* 62: 1149-1160.

KOSSEVA MR, PANESAR PS, KAUR G & KENNEDY JF. 2009. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int J of Biol Macromol* 45: 437-447.

Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2014. Determinação de lipídios em leite e produtos lácteos pelo método butirométrico. Available from: <www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/met-poa-slav-0803-determinacao-de-lipidios-em-leite-e-produtos-lacteos-por-butirometria.pdf> (Accessed: 20 August, 2018).

LEMES AC, ÁLVARES GT & KALIL SJ. 2012. Extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. *BBR - Biochem and Biotechnol Reports*, 2:7–13.

MACHADO JR, BEHLING MB, BRAGA ARC & KALIL SJ. 2015. β -galactosidase production using glycerol and byproducts: Whey and residual glycerin. *Biocatal Biotransform* 33: 208-215.

MANERA AP, ORES JC, RIBEIRO VA, RODRIGUES MI, KALIL SJ & MAUGERI FILHO F. 2011. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Acta Scientiarum Technol* 33: 155-161.

MEDEIROS FO, ALVES FG, LISBOA CR, MARTINS DS, BURKERT CAV & KALIL SJ. 2008. Ultrasonic waves and glass pearls: a new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. *Quím Nova* 31: 336-339.

MILLER GL. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426 – 428.

MLICHOVÁ Z & ROSENBERG M. 2006. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res* 45: 47-54.

NUMANOGLU Y & SUNGUR S. 2004. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. *Process Biochem* 39: 703-709.

OLIVEIRA C, GUIMARÃES PMR & DOMINGUES L. 2011. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 29: 600-609.

ORNELAS AP, SILVEIRA WB, SAMPAIO FC & PASSOS FML. 2008. The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. *J of Appl Microbiol* 4:1008-1013.

PANESAR PS, KUMARI S & PANESAR, R. 2010. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enz Res* 2010:1-16.

PEREIRA MCS, BRUMANO LP, KAMIYAMA CM, PEREIRA JPF, RODARTE MP & PINTO MAO. 2012. Low-lactose dairy: a necessity for people with lactose maldigestion and a niche Market. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes* 67: 57-65.

PEZZO M. 2017. Porungo: Queijo tradicional da Região do Campus Lagoa do Sino está no centro de parceria entre pesquisadores e produtores locais. *Revista da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)* 2: 36-42.

PRAZERES AR, CARVALHO F & RIVAS J. 2012. Cheese whey management: A review. *J Environ Manag* 110: 48-68.

RECH R & AYUB MAZ. 2007. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochem* 42: 873-877.

RECH R, CASSINI CF, SECCHI AR & AYUB MAZ. 1999. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 91-96.

SANTIAGO PA, MARQUEZ LDS, CARDOSO VL & RIBEIRO EJ. 2004. Estudo da produção da β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kuyveromyces marxianus*. Ciênc Tecnol Alim 24: 567-572.

SISO MIG. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour Technol, 57: 1-11.

SONG YS, LEE JH, KANG SW & KIM SW. 2010. Performance of β -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. Food Chem 123: 1-5.

VASCONCELOS QDJS, BACHUR TPR & ARAGÃO GF. 2018. Whey protein: composição, usos e benefícios – uma revisão narrativa. Eur J of Phys Educ and Sport Sci 4: 173-183.

YOU S, CHANG H, YIN Q, QI W, WANG M, SU R & HE, Z. 2017. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. Bioresour Technol 245: 1271-1276.

ZHOU HX, XU JL, CHI Z, LIU GL & CHI ZM. 2013. β -galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. Biochem Eng J, 76: 17-24.

Figure 1 - Kinetic of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 in (a) porungo cheese whey, (b) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and (c) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and bactopectone at 200 rpm and 30 °C. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-)

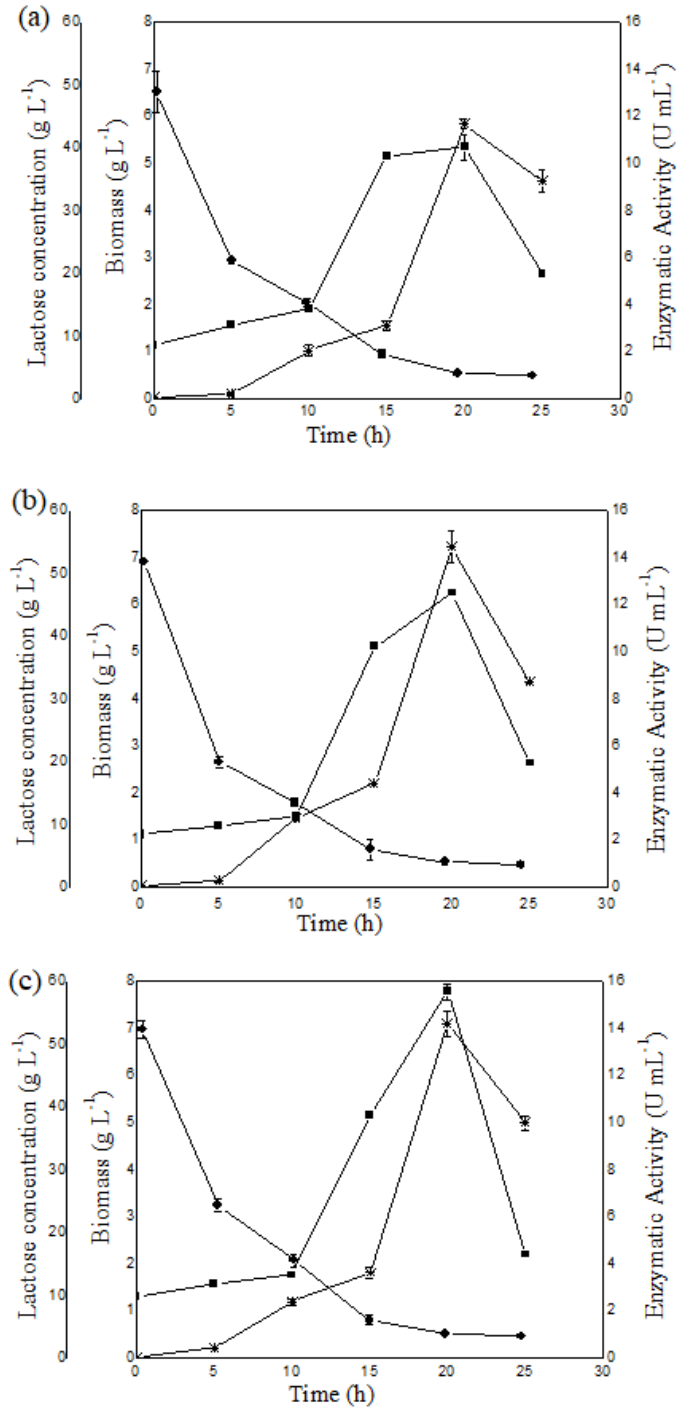
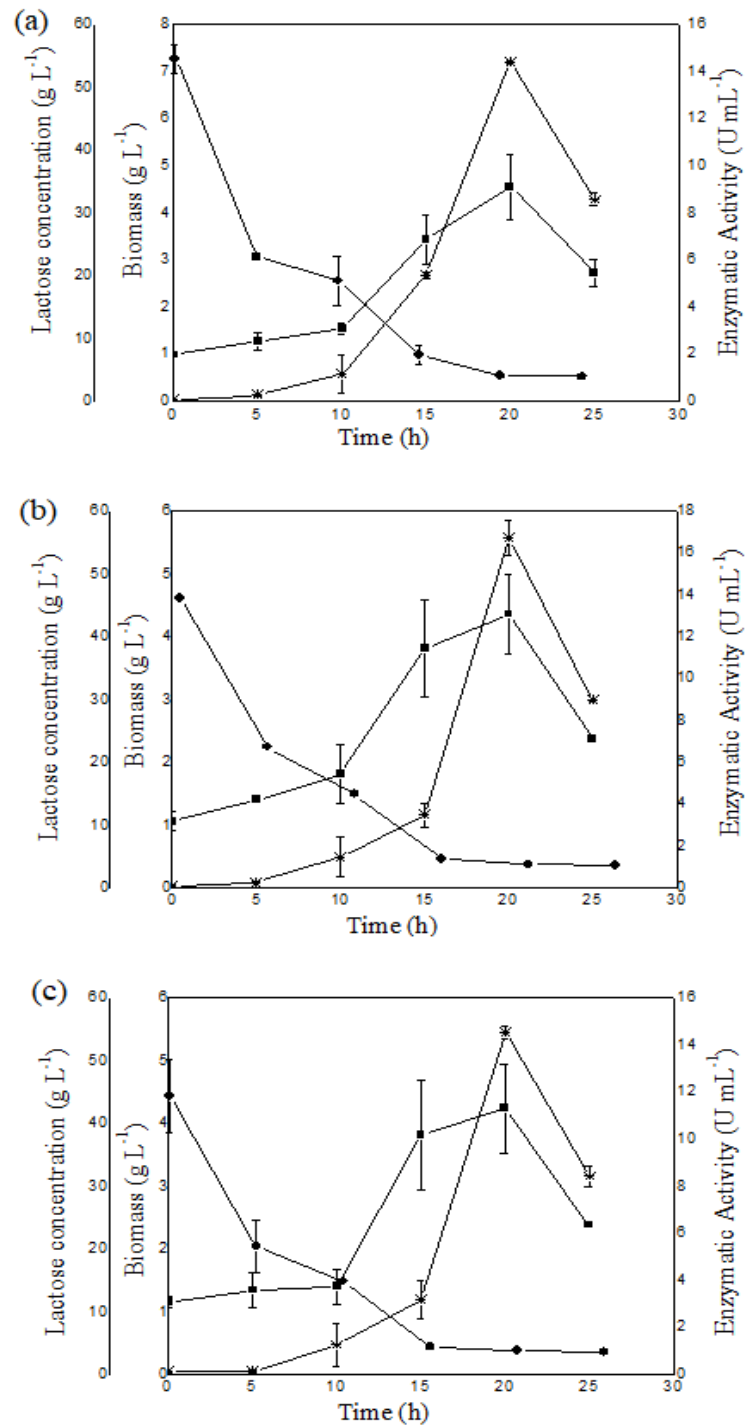


Figure 2 - Kinetic of *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 in (a) porungo cheese whey, (b) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and (c) porungo cheese whey supplemented with yeast extract and bactopectone at 200 rpm and 30 °C. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-).



Source: Authors, 2019

Figure 3 - Kinetic of *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm and 30 °C in (a) pH 5.0, (b) pH 6.0 and (c) pH 7.0. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-).

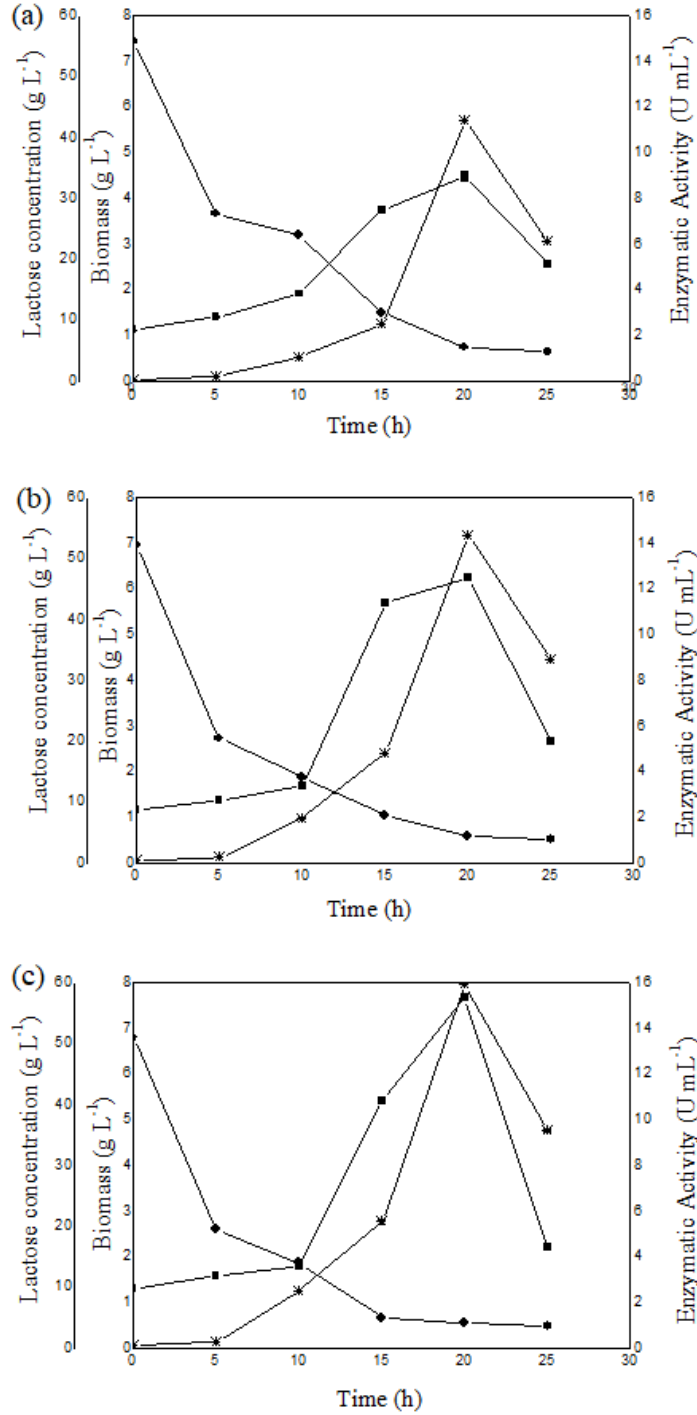


Figure 4 - Kinetic of *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm and 37 °C in (a) pH 5.0, (b) pH 6.0 and (c) pH 7.0. Lactose (-●-). Biomass (-■-). Enzymatic activity (-*-).

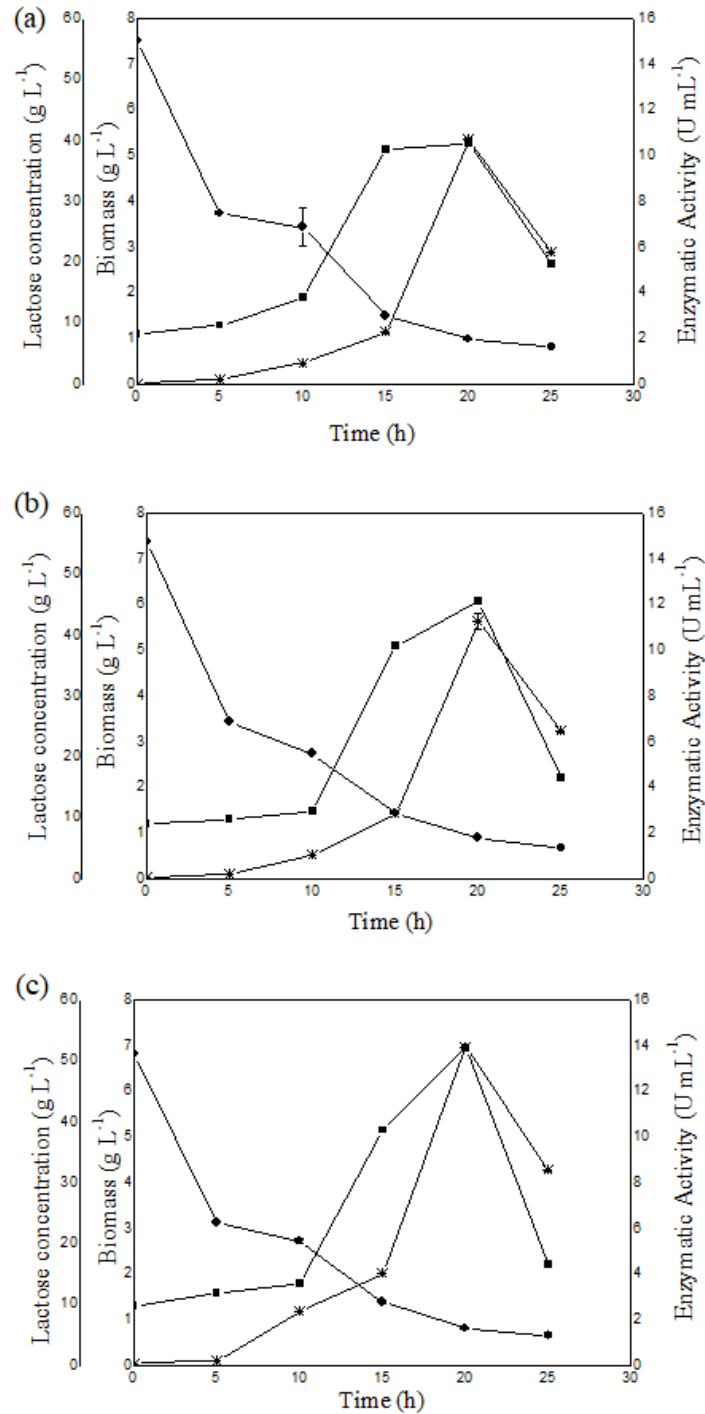


Figure 5 - Effect of temperature (a) and pH (b) on the β -galactosidase activity from *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 produced in the better conditions.

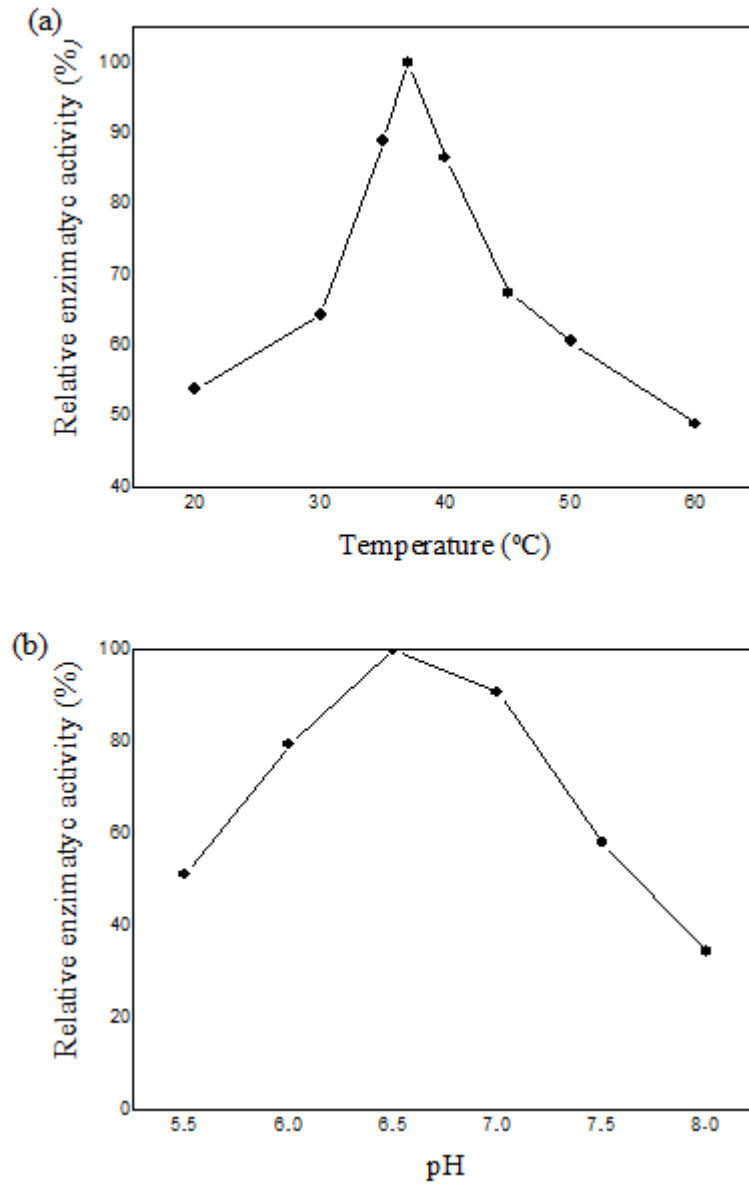


Table I - Centesimal composition of porungo cheese whey

Component	%
Moisture	93.25 ± 0.118
Dry extract	6.76 ± 0.118
Lipids	0.30 ± 0.00
Protein	1.09 ± 0.025
Lactose	4.30 ± 0.026
Ash	0.53 ± 0.005

Table II - Enzymatic activity for different pH (5.0, 6.0 and 7.0) and temperatures (30 °C and 37 °C) in 20 h of cultivation of *K. marxianus* CCT 4086 cultured in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm in shaker.

pH	Temperature (°C)	
	30	37
Enzymatic Activity (U mL⁻¹)		
5	11.42 ± 0.003 ^{Ba}	10.69 ± 0.103 ^{Aa}
6	14.35 ± 0.009 ^{Bb}	11.29 ± 0.344 ^{Ab}
7	15.93 ± 0.010 ^{Bc}	13.94 ± 0.011 ^{Ac}

Note: Tukey test ($p < 0.05$) on lines (uppercase letter) and in column (lowercase letter).

Table III - Kinetics parameters of *K. marxianus* CCT 4086 cultured in porungo cheese whey supplemented with yeast extract at 200 rpm in shaker under different pH (5.0, 6.0 and 7.0) and temperature (30 °C and 37 °C).

pH	Temperature (°C)							
	30				37			
	μ_{max} (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (U g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (U g ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (U g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (U g ⁻¹)
5	0.23	0.09	2.55	0.23	0.20	0.11	2.03	0.22
6	0.30	0.13	2.29	0.30	0.25	0.12	1.86	0.23
7	0.34	0.16	2.07	0.34	0.21	0.14	2.01	0.31

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado visando avaliar o processo da produção da enzima β -galactosidase a partir de um subproduto importante da agroindústria de laticínios, proporcionando assim o aproveitamento alternativo do mesmo e contribuindo para a menor geração de poluente. Para tanto, uma série de etapas foram desenvolvidas, abrangendo desde experimentos com diferentes linhagens de leveduras, testes com suplementação de meios de cultivo, ruptura celular e posteriormente, testes com diferentes variáveis de processo, onde avaliou-se as melhores condições de produção a partir de uma ferramenta estatística.

Em um primeiro momento, o presente trabalho buscou aprimorar a produção do metabólito através da utilização de diferentes linhagens de *K. marxianus* e meios de cultivos. Para tanto, a cinética de fermentação de *K. marxianus* CCT 4086 foi avaliada e comparada com *K. marxianus* CBS 6556. Os resultados mostraram que a linhagem de *K. marxianus* CCT 4086 foi superior para a atividade enzimática. Diante do potencial de produção que a linhagem *K. marxianus* CCT 4086 apresentou ao longo deste estudo, esta foi escolhida para as etapas posteriores de estudo em conjunto com a suplementação do meio com extrato de levedura, pois este melhorou a produção desta enzima. Apesar de não haver diferença significativa entre os meios SE e SEP sobre a variável dependente atividade enzimática, o meio SE foi escolhido por ser um meio menos oneroso. Assim, a produção da enzima foi avaliada por intermédio de variáveis de processos importantes, sendo estas o pH e a temperatura, onde os melhores resultados foram obtidos para pH próximos a neutralidade à uma temperatura de 30°C.

Em conclusão, o soro de queijo porungo demonstrou ser uma fonte de carbono alternativa e não onerosa para a obtenção da enzima β -galactosidase, até mesmo em meios não suplementados. A linhagem *K. marxianus* CCT 4086 mostrou-se a mais eficiente para a produção da enzima em soro de queijo porungo suplementado com extrato de levedura. Arelado a isso, o aproveitamento de um subproduto advindo da produção artesanal de queijos, permite associar a redução dos impactos ambientais ocasionados pelo inadequado descarte, com a obtenção de uma biomolécula que pode ser aplicada no desenvolvimento de novos produtos da indústria de alimentos. Este estudo é pioneiro na investigação do potencial biotecnológico do soro de queijo

porungo, podendo contribuir para avanços de estudos científicos da área de bioprocessos e engenharia de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
- BANSAL, S. *et al.* Production of B-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four diferente methods of enzyme extraction on B-galactosidase activity. **Indian Journal Microbiology**, v. 48, p. 337–341, 2008.
- BELLAVER L. H. *et al.* Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 691–8, 2004.
- BRASIL. Resolução RDC nº. 205 de 14 de novembro de 2006. **Aprova o "Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano**. Brasília, 2006.
- CAVILLE, D. & COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 22, p. 55–64, 1995.
- CHRISTENSEN, A. D. *et al.* Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 283–289, 2011.
- COLOGNESI, G. O. S. *et al.* Fermentation of deproteinized cheese whey by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 for ethanol production on pilot scale. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 2043-2049, 2017.
- DAGBAGLI, S. & GOKSUNGUR, Y. Optimization of b-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11–12, 2008.
- DAS, M.; RAYCHAUDHURI, A. & GHOSH, S. K. Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 833–846, 2016.
- FAI, A. E. C. & PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n.1, p. 69–81, 2015.
- FALLEIROS, L. N. S. S. **Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia – Minas Gerais, 2016.

FREITAS, M. F. M. Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.

FISCHER, C. & KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15–22, 2015.

FONSECA G. G. *et al.* The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 339–354, 2008.

GABARDO, S. **Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GABARDO, S. *et al.* Aproveitamento biotecnológico de soro de queijo para a produção de goma xantana. **Anais do 2º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente**, 8 p., 2010.

GABARDO, S. *et al.* Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89–96, 2014.

GABARDO, S. *et al.* Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 39, p. 141–150, 2016.

GABARDO, S.; RECH, R. & AYUB, M. A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1194–1201, 2012.

GEKAS, V. & LOPEZLEIVA, M. Hydrolysis of Lactose - A Literature-Review. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 2–12, 1985.

GODOY, A. S. **Estudos estruturais e funcionais das enzimas β -galactosidase de bactérias**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) – Física aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M. & REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised beta-galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.

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

GUPTE, A. M. & NAIR, J. S. β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69, p. 855–859, 2010.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2019. **Pesquisa trimestral do Leite: Quantidade de leite cru adquirido e industrializado no mês e no trimestre (Mil Litros), 4º trimestre 2019.**

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

LANE M. M. *et al.* Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, p. 507–519, 2011.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T. & KALIL S. J. Extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 7–13, 2012.

LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001. 593 p.

MAGALHÃES, N. *et al.* Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Eng. Sanit. Ambient.** Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 101–107, 2019.

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

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

MLICHOVA, Z. & ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, 47–54, 2006.

MORIWAKI, C. & MATIOLI, G. **Influência da β -Galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose.** Arq. Ciênc. Saúde Unipar, v. 4, n. 3, p. 283–290, 2000.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V. & SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82–85, 2001.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R. & DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 600–609, 2011.

ORNELAS, A. P. *et al.* The activity of beta-galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p.1008–1013, 2008.

O'SHEA D. G. & WALSH P. K. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 316–322, 2000.

PANESAR, P. S. *et al.* Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 2, p. 1–14, 2007.

PEREIRA, M. C. S. *et al.* Low-lactose dairy: a necessity for people with lactose maldigestion and a niche Market. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 57–65, 2012.

PERINI, B. L. B; SOUZA, H. C. M. & SCHNEIDER, A. L. S. Avaliação da agitação e da aeração na produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* cbs 6556 a partir de soro de queijo. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Área temática: Processos Biotecnológicos, 5 p., 2014.

PEZZO, M. **Porungo: Queijo tradicional da Região do Campus Lagoa do Sino está no centro de parceria entre pesquisadores e produtores locais**. Revista da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), v. 2, p. 36–42, 2017.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica) – Escola de Engenharia Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

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

RAMCHANDRAN, L. *et al.* Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process. **Journal of Membrane Science**, v. 403, p. 179-187, 2012.

RECH, R. & AYUB, M. A. Z. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 873–877, 2007.

RECH, R. **Estudo da produção de β -galactosidase por leveduras a partir de soro de queijo**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

RECH, R. *et al.* Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91–96, 1999.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212–25, 2006.

SANSONETTI, S. *et al.* Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p.1687–1692, 2009.

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

SILVA, L. C. C. **Utilização do soro de queijo em bioprocesso para a produção de goma xantana**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2017.

SILVA, N. F. N., AGUIAR, K. S., FILHO, N. J. P., FERREIRA I. E. P., TROIANI, C. A. L., TRIBST, A. A. L., CARVALHO, A. F. **Milk Quality, Production Process and Physicochemical Characteristics of Porungo, an Artisanal Cheese from the State of Sao Paulo, Brazil - Supplementary File S3**. *Journal of Dairy Research*, *in press*. 2020.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p.1–11, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 2–14, 2015.

SOBENES G. J. & ALEGRE, R. M. Produção de goma xantana por *X. Campestris* ATCC 13951 utilizando soro de queijo desproteinado. **Revista ION**, Bucaramanga, v. 28, n. 2, p. 69-77, 2015.

TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica.** 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2017.

TOMAL, A. A. B. *et al.* Technological Advances in the Collection, Purification and Identification of Galactooligosaccharide and Study of their Prebiotic Properties. **UNOPAR científica: Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 4, p. 41–49, 2010.

WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology. **John Wiley & Sons Ltd.**, West Sussex, England, 1998.

YOU, S. *et al.* Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271–1276, 2017.

ZHOU, H. X. *et al.* β -Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 17–24, 2013.

ANEXOS

Anexo A – Comprovante do aceite de publicação na revista *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*.

06/08/2020 E-mail de Universidade Federal de São Carlos - Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2...



Sabrina Gabardo <sabrinagabardo@ufscar.br>

Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2020-0483.R1

2 mensagens

Yraima Cordeiro <onbehalf@manuscriptcentral.com>
 Responder a: yraima@pharma.ufrj.br
 Para: sabrinagabardo@ufscar.br

6 de agosto de 2020 09:34

06-Aug-2020

Dear Dr. Gabardo:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Porungo cheese whey: a new substrate to produce β -galactosidase" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the Associate Editor who handled your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Dr. Yraima Cordeiro
 Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences
yraima@pharma.ufrj.br, yraimacordeiro@gmail.com

Associate Editor
 Comments to the Author:
 Dear Prof. Gabardo,

I am pleased to confirm that your paper AABC-2020-0483.R1 "Porungo cheese whey: a new substrate to produce β -galactosidase", has been accepted for publication in Annals of the Brazilian Academy of Sciences, having read your response to the Reviewer, I consider that you have dealt satisfactorily with the points raised

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

AABC