

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR *ERWINIA AROIDEAE*
Parade **CULTIVADA EM SORO DE QUEIJO****

*Este exemplar corresponde a relação
final da tese defendida por Simone
Hickmann Flôres e aprovada pela
Comissão Julga
Agora em 08.11.95*

SIMONE HICKMANN FLÔRES
Engenheira Química

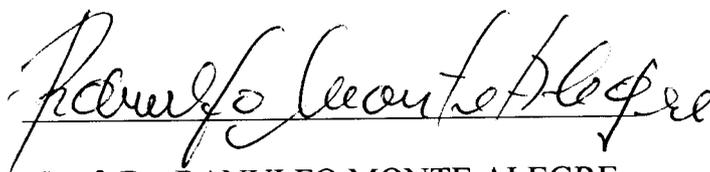
Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
Orientador



Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em Engenharia
de Alimentos

Campinas - SP
1995

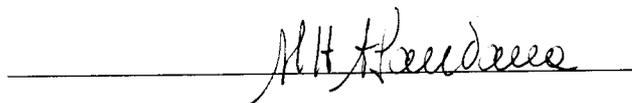
BANCA EXAMINADORA



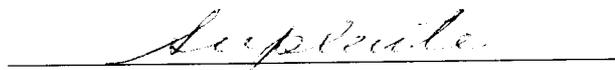
Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
(DEA - UNICAMP)



Prof. Dra. LÚCIA REGINA DURANT
(DCA - UNICAMP)



Prof. Dra. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA
(FEQ - UNICAMP)



Prof. Dr. SALVADOR MASSAUGUER ROIG
(DTA - UNICAMP)

28.11.95

*Dedico esta tese à
duas pessoas maravilhosas:
meus pais, Hugo e Suelly.*

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao professor Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação, apoio e total dedicação em todas as etapas deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos os técnicos dos laboratórios do DEA pela ajuda e empréstimo de materiais.

Aos colegas do laboratório de Processos Fermentativos pela ajuda, companheirismo e a solidariedade.

Aos meus pais pelo apoio e compreensão em todos os momentos de minha vida. Pela participação carinhosa em minhas alegrias e tristezas. Pelo que sou.

Com carinho, às amigas: Alcilene, Claudia, Eliana, Maria Ássima e Maria de Jesus pela ajuda, compreensão e inigualável amizade. Obrigada, meninas.

À todos os amigos e aos que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho. Muito obrigada a vocês, não importa quantos e quais nomes vocês tenham.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Aplicações da enzima	03
2.2. Microorganismos Produtores	05
2.3. Aspectos Gerais e Ocorrência	06
2.4. Produção e Características da Enzima.....	07
2.4.1. Lactases produzidas por Leveduras.....	11
2.4.2. Lactases produzidas por Fungos.....	17
2.4.3. Lactases produzidas por Bactérias.....	19
2.5. Estabilidade Térmica da Enzima.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27

3.1. Microorganismo.....	27
3.2. Meio de Manutenção	27
3.3. Meio de cultura.....	27
3.4 Preparo do inóculo.....	27
3.5. Fermentação	28
3.5.1. Fermentação em erlenmeyers.....	28
3.5.2. Fermentação em fermentador.....	28
3.5.2.1. Efeito da temperatura sobre o crescimento e produção de lactase	29
3.6. Métodos Analíticos.....	29
3.6.1. Separação de células	29
3.6.2. Determinação da concentração de lactose	29
3.6.3. Determinação da concentração de glicose	29
3.6.4. Determinação de pH	30
3.6.5. Determinação do peso seco celular	30
3.6.6. Determinação da atividade enzimática da lactase	30
3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	31

3.7.1. Determinação de K_m e V_{max}	31
3.7.2. Determinação de K_d e E_d	31
3.8. Efeito do pH na estabilidade da enzima	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Fermentação em erlenmeyers	32
4.1.1. Efeito da concentração de lactose na atividade da lactase.....	32
4.1.2. Efeito do pH na atividade da enzima.....	35
4.1.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima	35
4.1.4. Suplementação do meio com asparagina	39
4.2. Fermentação em fermentador	39
4.2.1. Efeito da temperatura na produção da enzima	40
4.2.1.1. Fermentação a 25°C	40
4.2.1.2. Fermentação a 27°C	44
4.2.1.3. Fermentação a 30°C	47
4.2.1.4. Fermentação a 32°C	50
4.2.1.5. Fermentação a 35°C	53

4.3. Efeito da glicose adicionada ao meio fermentativo.....	57
4.4. Determinação de Km e Vmax	60
4.5. Estabilidade térmica da enzima.....	62
4.6. Efeito do pH na estabilidade da enzima	64
5. CONCLUSÕES	65
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE A	73
APÊNDICE B.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1. Produção e atividade de lactase nas células de fungos.....	09
TABELA 2.2. Produção e atividade das células de leveduras.....	10
TABELA 2.3. Produção e atividade das células de bactérias ácido lácticas.....	10
TABELA 2.4. Meios de cultura para produção de lactase, pectinase e inulinase	15
TABELA 2.5. Atividade de lactase, pectinase com e sem indutor e atividade intra e extracelular de inulinase	16
TABELA 2.6. Constantes de Michaelis e velocidades máximas para os vários substratos.....	20
TABELA 3.1. Composição do meio de manutenção em ágar inclinado para <i>Erwinia aroidea</i>	27
TABELA 4.1. Atividade de lactase de <i>Erwinia aroideae</i> NRRL B-132 cultivada em soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura (5g/l) em função da concentração de lactose.....	33
TABELA 4.2. Atividade de lactase de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado suplementado com 5 g/l extrato de levedura em função da concentração de lactose.....	36
TABELA 4.3. Valores de atividade de lactase de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado suplementado com 5 g/l de extrato de levedura em função da temperatura de incubação	36
TABELA 4.4. Atividade da lactase de <i>Erwinia aroideae</i> com e sem asparagina usado como suplemento do meio de soro de queijo desproteinado, a 30°C e 200 rpm.....	39

TABELA 4.5. Valores máximos de atividade total e específica obtidas nas diferentes temperaturas de fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i>	56
TABELA 4.6. Constantes de Henri-Michaelis-Menter para a reação de hidrólise de ONPG por <i>Erwinia aroideae</i> cultivada em soro de queijo	60
TABELA 4.7. Valores de Kd em função da temperatura	62
TABELA A1. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado a 25°C	74
TABELA A2. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado a 27°C	75
TABELA A3. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado a 30°C	76
TABELA A4. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado a 32°C	77
TABELA A5. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado a 35° C	78
TABELA A6. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação de <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado suplementado com 10 g/l de glicose a 30°C	79

TABELA A7. Fermentação de soro de queijo desproteinado com e sem adição de glicose por <i>Erwinia aroideae</i> a 0°C, 350 rpm e 1 vvm em fermentador de 6 L.....	80
TABELA A8. Valores de atividade específica de lactase produzida por <i>Erwinia aroideae</i> em soro de queijo desproteinado com e sem glicose a 30°C, 350 rpm e 1vvm	81
TABELA B1. Valores de velocidades em função da concentração do substrato ONPG a 20°C	83
TABELA B2. Valores de velocidades em função da concentração do substrato ONPG a 23°C	83
TABELA B3. Valores de velocidade em função da concentração do substrato ONPG a 25°C	83
TABELA B4. Valores de velocidades em função da concentração do substrato ONPG a 27°C	83
TABELA B5. Estabilidade a temperatura de 45°C	84
TABELA B6. Estabilidade a temperatura de 47°C	84
TABELA B7. Estabilidade a temperatura de 49°C	84
TABELA B8. Estabilidade a temperatura de 50°C	85
TABELA B9. Valores de Kd em função da temperatura	85
TABELA B10. Valores de atividade de lactase em função do pH de incubação a 45°C	85

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 4.1. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função da concentração de lactose no meio de cultura. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm34
- FIGURA 4.2. Atividade específica de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função da concentração de lactose no meio de cultura. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm34
- FIGURA 4.3. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo em desproteinado em função do pH de incubação. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm.....37
- FIGURA 4.4. Atividade específica de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função do pH de incubação. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm.37
- FIGURA 4.5. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado em função da temperatura de incubação. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm.38
- FIGURA 4.6. Atividade específica de lactase de *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado em função da temperatura de incubação. Fermentações em erlenmeyer por 12 horas a 30°C e 200 rpm.38
- FIGURA 4.7. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25°C, 350 rpm e 1vvm (atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose reidual42
- FIGURA 4.8. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25°C, 350 rpm e 1vvm.(pH, concentração de glicose, massa celular seca)42

FIGURA 4.9. Atividade específica de lactase em soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 25°C, 350 rpm e 1vvm	43
FIGURA 4.10. Fermentação de soro de queijo por <i>Erwinia aroideae</i> a 25°C, 350 rpm e 1vvm (com soro integral e com soro desproteinado).....	43
FIGURA 4.11. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 27°C, 350 rpm e 1vvm.(atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose residual).....	45
FIGURA 4.12. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 27°C, 350 rpm e 1vvm (pH, concentração de glicose, massa celular seca).....	45
FIGURA 4.13. Atividade específica em soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 27°C, 350 rpm e 1vvm.....	46
FIGURA 4.14. Fermentação em soro de queijo por <i>Erwinia aroideae</i> a 27°C, 350 rpm e 1vvm (com soro integral e com soro desproteinado).....	46
FIGURA 4.15. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1vvm. (atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose residual).....	48
FIGURA 4.16. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1vvm (pH, concentração de glicose, massa celular seca).....	48
FIGURA 4.17. Atividade específica de lactase em soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroidea</i> a 30°C, 350 rpm e 1vvm.....	49
FIGURA 4.18. Fermentação em soro de queijo por <i>Erwinia aroidea</i> a 30°C, 350 rpm e 1 vvm. (com soro integral e desproteinado).....	49

FIGURA 4.19. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 32°C, 350 rpm e 1vvm.(atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose residual).....	51
FIGURA 4.20. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 32°C, 350 rpm e 1vvm (pH, concentração de glicose, massa celular seca)	51
FIGURA 4.21. Atividade específica de lactase em soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 32°C, 350 rpm e 1vvm	52
FIGURA 4.22. Fermentação de soro de queijo por <i>Erwinia aroideae</i> a 32°C, 350 rpm e 1 vvm (com soro integral e desproteinado).....	52
FIGURA 4.23 Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 35°C, 350 rpm e 1vvm (atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose residual).....	54
FIGURA 4.24. Fermentação de soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 35°C, 350 rpm e 1vvm (pH, concentração de glicose, massa celular seca).....	54
FIGURA 4.25. Atividade específica de lactase em soro de queijo desproteinado por <i>Erwinia aroideae</i> a 35°C, 350 rpm e 1 vvm	55
FIGURA 4.26. Fermentação em soro de queijo por <i>Erwinia aroideae</i> a 35°C, 350 rpm e 1 vvm (com soro integral e desproteinado).....	55
FIGURA 4.27. Fermentação com soro de queijo desproteinado suplementado com glicose (10 g/l) por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1 vvm (atividade nas células, atividade no sobrenadante, lactose residual).....	58
FIGURA 4.28. Fermentação com soro de queijo desproteinado suplementado com glicose (10 g/l) por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1 vvm (pH, concentração de glicose, massa celular seca).....	58

FIGURA 4.29. Atividade específica de lactase de soro desproteinado suplementado com glicose (10 g/l) por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1vvm	59
FIGURA 4.30. Comparação das fermentações de soro de queijo desproteinado com e sem glicose por <i>Erwinia aroideae</i> a 30°C, 350 rpm e 1vvm	59
FIGURA 4.31 Ajuste dos dados experimentais da constante Km em função da temperatura.....	61
FIGURA 4.32 Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação Kd em função da temperatura.....	63
FIGURA 4.33. Efeito do pH na estabilidade de lactase	64
FIGURA B1. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 20°C	86
FIGURA B2. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 23°C	86
FIGURA B3. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 25°C	87
FIGURA B4. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 27°C	87
FIGURA B5. Estabilidade a temperatura de 45°C	88
FIGURA B6. Estabilidade a temperatura de 47°C	88
FIGURA B7. Estabilidade a temperatura a 49°C	89
FIGURA B8. Estabilidade a temperatura de 50°C	89

FIGURA B9. Curva padrão de ONPG	90
---------------------------------------	----

RESUMO

Soro de queijo integral e/ou desproteinado por acidificação e aquecimento podem ser utilizados como meio de cultura para produção de lactase de *Erwinia aroideae* NRRL B-132.

A maior atividade de lactase obtida em fermentação de soro de queijo desproteinado (434,10 UI/ml) foi com 55 g/l de lactose, em doze horas de fermentação em erlenmeyer com produção de 1,9 g/l de massa celular seca. A suplementação do meio de cultura com 5g/l de asparagina aumentou em 15% a atividade da enzima intracelular e 202% a atividade da enzima extracelular. A temperatura ótima de incubação da enzima para hidrólise de ONPG foi 45°C e pH na faixa de 7,5 a 8,0.

Em fermentador de 6 litros variou-se a temperatura de fermentação (25, 27, 30, 32 e 35°C) mantendo-se a taxa de aeração em 1 vvm e rotação de 350 rpm. Obteve-se maior atividade de lactase quando foi utilizado soro de queijo integral. A 30°C a produção em lactase extracelular foi maior e a 32°C houve maior produção de lactase intracelular.

Utilizou-se o modelo matemático de Michaelis-Mentem para caracterizar cineticamente a enzima, obtendo-se o valor para K_m de 3,46, 3,62, 3,85 e 0,60 mM para as temperaturas de 20, 23, 25 e 27°C, respectivamente. A energia de ativação para K_m , determinada pelo modelo de Arrhenius foi 3.84 Kcal/mol.

A inativação da enzima nas temperaturas de 45, 47, 49 e 50°C seguiu cinética de primeira ordem com constante de inativação K_d de 23,20, 47,60, 60,20 e 90,90 mM, respectivamente, e energia de ativação para a desnaturação E_d 51,50 Kcal/mol. A enzima apresentou baixa estabilidade quando quando pré-incubada em pH diferente do ótimo por 20 minutos.

SUMMARY

Production of intra and extracellular β -galactosidase by *Erwinia aroidea* grown in cheese whey was studied.

Preliminary experiments with erlenmeyers and desproteinized cheese whey showed the optimal lactose concentration of 5.5% when the lactase activity achieved 434.10 UI/ml and cellular dried mass 1.9048 g/l for 12 hours culture. Optimal temperature and pH for ONPG hidrolisis was 45°C and 7.5, respectively. Medium culture supplementation with asparagine (5g/l) caused an increase of 15% in intracellular enzyme activity and of 202% in extracellular enzyme activity.

Fermentation experiments were carried out in 6 liters fermenter; it was used integral and deproteinized cheese whey under temperatures of 25, 27, 30, 32 and 35°C, 350 rpm and 1 vvm for 12 hours culture. When integral cheese whey was used the largest activity was achieved compared with the deproteinized cheese whey. The production of extracellular enzyme was greater at 30°C and the largest production of intracellular enzyme was obtained at 32°C. Enzyme inhibition by temperature occurred above 32°C. Glucose in culture medium caused enzyme carbon catabolite repression.

Kinectis parameters was obtained through Michaelis-Mentem model ; Km for ONPG was 3.46 mM, 3.62 mM, 3.85 mM and 0.5960 mM at 20, 23, 25 and 27°C, respectively. The activation energy for ONPG hidrolisis was 3.84 Kcal/mol °K.

In stability study, it was obtained Kd values of 23.20 mM, 47.60 mM, 60.20 mM and 90.90 mM at 45, 47, 49 and 50°C, respectively. The activation energy for denaturation was 51.50 Kcal/mol °K. Enzyme low pH stability was observed and this fact means that it must be used around the optimum value (7.5 - 8.0).

1. INTRODUÇÃO:

A produção de lactases microbianas é de grande interesse industrial, pois os produtos de hidrólise de lactose, glicose e galactose, não apresentam os inconvenientes causados por este açúcar em produtos de laticínios como doce de leite, sorvetes, leites condensados, etc., uma vez que a solubilidade dos monossacarídeos é maior que a solubilidade da lactose (WISEMAN, 1987).

O uso da enzima na indústria de laticínios é amplo, uma vez que novos produtos podem ser obtidos, como é o caso do aproveitamento de soro de queijo para produção de xarope, produção de leite lactose hidrolisado destinado à pessoas intolerantes a lactose, produção de yogurte e outros produtos. (BOUVY, 1975)

A β -galactosidase é uma das enzimas melhor definidas na literatura. É amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada em plantas, órgãos de animais, leveduras, bactérias e fungos (RICHMOND, 1981), contudo a sua preparação para aplicação industrial tem sido feito a partir de leveduras e fungos dados sua facilidade de aplicação e produção.

As propriedades e fisiologia da produção de lactase microbiana variam de acordo com o tipo produtor: fungos, leveduras ou bactérias (KENNEDY, 1987).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos no sentido de estudar a produção e características de lactase (β -galactosidase) usando como principal fonte de carbono soro de queijo desproteinado ocasionando, desta maneira, uma diminuição do potencial poluidor causado por este, bem como o aproveitamento de seus nutrientes.

A bactéria *Erwinia aroideae* tem sido utilizada desde 1957 para produção de L-asparaginase cujo substrato, composto de lactose, induz a formação da enzima lactase.

Devido a estes fatores e fundamentado no estudo da produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae* feito por MINIM (1991), este trabalho teve como objetivo explorar uma nova fonte de β -galactosidase intra e extracelular.

Realizou-se então o estudo da produção e caracterização da enzima em soro de queijo desproteinado e integral por *Erwinia aroideae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. APLICAÇÕES DA ENZIMA

Lactases tem aplicações em diversas áreas: - Leite, para pessoas com problemas de intolerância a produtos lácteos; na produção de iogurte e queijo; no soro ou lactose usados na produção de doces e xarope hidrolisado de soro; produtos de leite concentrado tais como leite condensado e para prevenir a textura arenosa causada pela lactose na produção de sorvetes.

No homem, como na maioria dos mamíferos, a atividade da lactase intestinal diminui após o período normal de amamentação. Em algumas populações a atividade da enzima lactase permanece relativamente alta até a idade adulta, porém, a atividade desta enzima apresenta relação com a origem étnica das populações (JOHNSON, (1981) citado por DURAN et alii.(1985)).

Nas populações das regiões norte e central da Europa as dissacaridases predominam com atividade elevada, entretanto, em certos grupos étnicos de negros e asiáticos ocorre grande prevalência de deficiência de lactase intestinal (SIMONS, (1981) citado por DURAN et alii (1985)). Os sintomas são dores abdominais, cólicas, flatulência e diarreia. Entretanto, leite e produtos lácteos podem ser ingeridos por estas pessoas se a lactose for hidrolisada no leite através da β -galactosidase (KIESLICH, 1984).

BOUVY (1975) comprovou que o uso de soro hidrolisado melhorava o corpo e a doçura do iogurte. Vale salientar que o aumento de doçura, pelo uso da lactose hidrolisada é realizada sem adição de calorias.

Um dos principais fatores de custo na produção de queijo cheddar é o tempo requerido para a maturação do produto. Usando-se leite com 65-80% de lactose hidrolisado o produto apresentou melhor sabor, corpo e textura em 3-4 meses comparados com amostras padrões de queijo de 6 a 8 meses de idade. A presença de glicose livre como fonte de carbono modificou, consideravelmente, o processo de produção do queijo cheddar (THOMPSON & BROWER, 1976).

Constatou-se que a pré-hidrólise da lactose do leite diminuiu o tempo de produção do iogurte e do queijo em 20%, bem como aumentou a produção de doçura. Reduções significativas de tempo de produção, tempo de cura e qualidade melhorada foram observadas na produção de queijo cheddar (KIESLICH, 1984).

A hidrólise enzimática de lactose como meio para aumentar a utilização de soro tem sido bastante empregada (BOUVY, 1975). Cerca de 50.000 toneladas de soro são produzidos por todo o mundo, sendo que 70% da matéria seca é lactose, de 9-14% está na forma de proteína e o conteúdo de cinzas é em torno de 9%. Deste soro, 50% é descartado para o sistema de esgoto municipal. A matéria orgânica do soro causa sérios problemas de poluição. Mil galões de soro bruto são equivalentes a despejos de 1800 pessoas. Sólidos de soro doce são mais usados para alimentação animal, porém a maior porção de subprodutos da produção de queijo caseiro e queijo fresco é soro ácido. Novos métodos de hidrólise enzimática foram desenvolvidos com objetivos comerciais a fim de evitar problemas ambientais e econômico (KIESLICH, 1984).

Costuma-se fazer hidrólise prévia do leite para prevenir a cristalização da lactose e melhorar, desta maneira, a textura de produtos lácteos congelados, sorvete ou leite congelado (POMERANZ, 1964). Muitos estudos têm acrescentado várias formas de soro, tais como soro ácido (YOUNG et alii, 1980), proteína concentrada de soro "Succinylated" (THOMPSON et alii (1983) citados por MARTINEZ (1987)) e soro concentrado (LOWENSTEIN et alii, 1975) em sorvetes e outros produtos lácteos congelados. Com a incorporação de soro sólido em produtos lácteos congelados e subsequente hidrólise da lactose, a quantidade de açúcar adicionada na mistura pode ser reduzida.

SABIONI et alii (1984) fizeram o estudo do controle da cristalização de lactose em doce de leite pela β -galactosidase de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*. A adição de 400 ou 800 mg/l de células permeabilizadas no leite usado para fazer doce, seguida de incubação de 2,5 ou 3,5 horas a 35°C, resultou na hidrólise de 45,02 e 69,13% de lactose. Não houve nenhuma cristalização de lactose após 120 dias de estocagem em produtos tratados por células permeabilizadas. As características sensoriais do doce foram similares as da amostra padrão.

MARTINEZ & SPECMAN (1988) estudaram a otimização da utilização do soro em misturas de produtos lácteos congelados pelo uso de β -galactosidase de origem microbiana. As qualidades físico-químicas e organolépticas do sorvete, leite congelado, "milk shake" e sobremesas de baixa caloria congeladas contendo soro, com e sem tratamento de enzima, foram comparadas com misturas padrões. Constatou-se que o soro bruto pode ser usado substituindo o soro desmineralizado, pois o alto teor de cinzas não teve nenhum efeito inibidor na atividade da enzima. O tratamento destes produtos com β -galactosidase reduz os problemas associados com cristalização, aumenta a doçura e pode melhorar a qualidade das características tais como "Scoopability". O custo da enzima pode ser compensado pela economia causada pelo uso de material bruto como soro comum.

BOUVY (1975) cita também como aplicação de soro tratado com lactase o aumento na solubilidade pois, comparados com lactose, glicose e galactose são mais solúveis. Ao mesmo tempo, aumenta-se a pressão osmótica, dando proteção ao crescimento de microrganismo. Com aumento da solubilidade é possível produzir soros hidrolizados concentrados, ainda fluidos e de fácil manuseio.

Outra aplicação é obtenção de açúcares mais fermenticíveis. A maioria dos microrganismo usa preferencialmente glicose e galactose do que lactose como fonte de carbono. Um interessante exemplo deste efeito envolve produtos incorporados com leveduras de panificação, pois lactose não é fermentável por esse microrganismo. A galactose, originária da hidrólise de lactose contribui para a formação da crosta nos produtos de panificação, através da reação de Maillard. Este escurecimento também é vantajoso na produção de alimentos fritos tais como batata frita e salgadinhos similares (POMERANZ, 1964)

2.2. MICROORGANISMOS PRODUTORES

A β -galactosidade é produzida por uma grande quantidade de microrganismo, tais como:

Leveduras: *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *Candida pseudotropicalis*, *Zygosaccharomyces anamensis*.

Fungos: *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Mortierella vinacea*, *Penicillium multicolor*, *Curvularia inaequalis*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor pusillus*, *M. miehei*, *Hemicola grisea*, *H. lanuginosa*, *Sporotrichum sp.*, *S. thermophile*, *Torula thermophila*.

Bactérias: *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. thermophila*, *Caldariella acidophila*, *Leuconostoc citrovorum*, *Streptomyces coelicolor*.

Destes microrganismo os mais usados para a produção de lactase são:- *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Escherichia coli*. (KIESLICH, 1984).

2.3. ASPECTOS GERAIS E OCORRÊNCIA

A enzima que hidrolisa a lactose e outros β -galactosídeos chama-se β -galactosidase ou, mais comumente, lactase. Esta enzima é encontrada em plantas, nos intestinos animais e em muitos microorganismos. As melhores fontes para uso comercial são os microorganismos.

Segundo (PARK, 1975) as preparações de lactases usadas em indústria alimentícia tem sido obtidas por leveduras e fungos. As leveduras são comumente encontradas em laticínios, tais como *Saccharomyces fragilis* e *Candida pseudotropicalis*. A lactase pode ser obtida pelo seu cultivo em soro de queijo ou em meio de lactose. A levedura separada é autolisada o que permite obter o extrato livre de células por filtração. A enzima pode ser precipitada, no filtrado, por meio de solventes. A preparação bruta pode ser obtida pela secagem de leveduras após o processo mas, nesse caso, um cuidado especial deve ser tomado para destruir qualquer atividade residual de fermentação, pois a lactose pode ser convertida a álcool e CO_2 . A secagem é feita por liofilização, atomização ou mesmo em secadores de bandejas em temperatura de 45°C a 65°C. A lactase é muito usada na indústria de alimentos para hidrolisar a lactose.

A enzima lactase ocorre em amêndoas, damascos, pêssegos, maçãs, semente de alfafa e café. Dentre os animais ela se encontra no intestino de cachorro, coelho,

bezerros, ovelhas, cabras e no homem. Lactase é produzida por microorganismos e esta é a fonte mais aceitável para aplicação industrial (POMERANZ (1964); WIERZBICKI & KOSIKOWSKI (1973); RICHMOND et alii (1981))

A enzima de leveduras e bactérias tem sido bastante investigada a fim de se estudar a modificação do leite e produtos do leite. Em *Escherichia coli* estudou-se mecanismos de controle genético e efeito de indução-repressão das proteínas. (WALLENFELS, 1960)

2.4. PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA

Vários tipos de microorganismos produzem lactase. As propriedades da enzima e a fisiologia de sua produção diferem de acordo com o produtor: fungos, leveduras ou bactérias. KENNEDY (1987) caracterizou as diferentes lactase de acordo com o microorganismo produtor:

A) Lactases produzidas por leveduras são geralmente intracelulares e requerem indução. Sua produção pode ser inibida catabolicamente mas são produzidas rapidamente e em grande quantidade sob condições de cultivo submerso. Elas têm baixa acidez e são termicamente estáveis; atuam em valores de pH neutro e requerem certos íons para obtenção de atividade ótima. Suas propriedades estão longe das ideais para aplicação industrial, porém vantagens como: alta produção, fácil cultivo e a segurança comprovada dos produtores serem microorganismos alimentares compensam as desvantagens, a ponto das lactases de leveduras serem facilmente comercializadas.

B) Lactases produzidas por fungos são mais termoestáveis e ácido-estáveis e são menos exigentes quanto a necessidade de ativadores e estabilizadores. Elas são produzidas em fermentação com substrato sólido ou usando-se cultivo submerso com constituintes sólidos suspensos no meio, que são liberados durante a fermentação. A produção e rendimento são mais baixos dos que os obtidos por leveduras.

C) Lactases produzidas por bactérias, especialmente os gêneros termofílicos, têm sido largamente estudadas mas ainda não foram comercializadas. Os microorganismos produtores crescem rapidamente mas as produções reportadas são mais baixas do que as das leveduras. As enzimas são, normalmente, retidas dentro das

células na fermentação. Muitas têm estabilidade térmica maior do que as enzimas de fungos e esta é uma vantagem para aplicação na forma imobilizada.

WIERZSBICKI & KOSIKOWSKI (1973) estudaram 23 espécies de fungos, leveduras e bactérias e avaliaram a produção de células e características que influenciaram no potencial de atividade da enzima. Obtiveram como resultados:

Fungos: O peso celular seco de diferentes fungos variou de 2,3 a 7 g/l de meio de cultura. A hidrólise de lactose em soro de queijo, após 5 horas sob condições ótimas foi de 2 a 34 %. Lactases de *Aspergillus* e *Mucor* apresentaram um pH ótimo de 3,5 a 5,5, mas alguns gêneros de *Neurospora* mostraram alta atividade em pH 4,5 a 7,0. Obtiveram atividade ótima de lactase de fungos a 40 - 55 °C.

Leveduras: O peso celular seco de leveduras variou de 0,5 a 6,9 g/l de meio de cultura. Fermentação contínua de *Saccharomyces fragilis* produziu 40% a mais da massa celular seca comparada com a fermentação em batelada. A hidrólise de lactose em soro de queijo após 5 horas variou entre 57 a 59,2%. O pH ótimo foi de 6,0 a 7,0 e a temperatura foi de 30 a 50 °C.

Bactérias: O peso celular seco da bactéria ácido láctica termofílica variou de 0,4 a 1,2 g/l de meio. Fermentação contínua de *L. helveticus* comparada com a fermentação em batelada produz 25% a mais de massa celular seca, sem perda de atividade da enzima. Hidrólise de lactose em soro foi de 50 a 80% em pH ótimo e temperatura, respectivamente, 5,0 a 6,5 e 30 - 50 °C.

TABELA 2.1. Produção e atividade de lactase das células de fungos

Microorganismo	Produção MCS (g/l)	Hidrólise de lactose após 5 horas (%) [*]	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Aspergillus niger</i> - C15	3,1	7,5	3,5-4,5	35-55
<i>Aspergillus oryzae</i> - ATCC 7561	2,3	7	3,5-5,5	40-55
<i>Aspergillus phoenicis</i> - ATCC 11362	2,5	15	4,0-5,5	40-55
<i>Aspergillus phoenicis</i> - ATCC 11363	2,8	20,0	---	---
<i>Neurospora crassa</i> - C16	3,3	7,5	4,5-7,5	35-55
<i>Neurospora crassa</i> ATCC 10815	3	29	4,5-7,5	40-55
<i>Neurospora crassa</i> - ATCC 18419	7	34	4,5-7,0	40-55
<i>Neurospora crassa</i> - ATCC 10816	2,5	21,5	4,5-7,5	40-55
<i>Mucor pusillus</i> - ATCC 16458	2,3	12	4,5-5,5	45-55
<i>Mucor pusillus</i> - ATCC 16459	4	12	---	---
<i>Mucor meihei</i> - ATCC 16457	2,3	2	4,0-5,0	45-55

* - Com 80 mg de células/ 100g soro de queijo à pH 4,5 e 55 °C
MCS: massa celular seca

FONTE: WIERZBICKI & KOSIKOWSKI (1973)

TABELA 2.2. Produção e atividade das células de leveduras.

Microorganismo	Produção MCS (g/l)	Hidrólise de lactose em 5 horas % *	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>S. lactis</i> - ATCC 10689	0,5	57,2	6,0-7,0	30-50
<i>Candida pseudotropicalis</i> - ATCC 2540	0,1	59	6,0-7,0	35-45
<i>S. fragilis</i> - ATCC 8582	1	59,2	6,0-7,0	30-45
<i>S. fragilis</i> -C17	6,9	57	6,0-7,5	30-50

* - Com 80 mg de células/ 100g de soro de queijo à pH 4,5 e 55 °C

MCS: massa celular seca

FONTE: WIERZBICKI & KOSIKOWSKI (1973)

TABELA 2.3. Produção e atividade de células de bactérias ácido lácticas.

Microorganismo	Produção MCS (g/l)	Hidrólise de lactose em 5 horas (%)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Streptococcus thermophilus</i> - C12	0,4	50	5,5-6,5	30-50
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> - C10	0,5	60	5,5-6,5	30-50
<i>Lactobacillus helveticus</i> - C11	1,2	80	5,0-6,5	30-50
<i>Streptococcus thermophilus</i> - C11#	--	--	--	--
<i>Streptococcus lactis</i> #	--	--	--	--
<i>Streptococcus cremoris</i> #	0,3	traços	6,5	37
<i>Leuconostoc citrovorum</i> #				
<i>Leuconostoc paracitrovorum</i> #				
<i>Streptococcus lactis</i> - C18	0,6	sem atividade	sem atividade	sem atividade

Usados como multigêneros comerciais iniciadores

* - Com 80 mg de células/100g de soro de queijo à pH 6.5 e 50 °C, exceto *S. lactis* a 37 °C.

MCS: massa celular seca

FONTE: WIERZBICKI & KOSIKOWSKI (1973)

2.4.1. LACTASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS

POMAR et alii (1977) estudaram a produção de lactase por leveduras. Usaram soro de queijo como substrato para cultivar uma cepa de levedura *Saccharomyces fragilis* (D.B.L. 507) capaz de produzir β -galactosidase. Analisaram e buscaram as melhores condições para obter um bom extrato enzimático bruto, a fim de passarem para uma escala semi-industrial e realizarem purificação e concentração adequadas. Estes autores constataram que usando-se um meio de cultura contendo 3,8 - 4,5 % de lactose, incubado a 30°C com pH inicial de 4,5, ao final de 12 horas de fermentação encontravam-se apenas vestígios de lactose e a concentração final de células era de aproximadamente 6×10^8 células/ml. Como ao longo da fermentação havia uma tendência do pH cair, tornou-se necessário a neutralização do meio elevando-se para o pH de origem com NH_4OH . Esta neutralização do meio ocasionou uma aceleração no consumo de lactose, bem como um aumento na produção de células. Com estes dados comprovados realizaram então, estudos comparativos utilizando reatores tipo coluna e mostraram que a taxa de aeração ótima está na faixa de 0,75-0,90 vvm. Nestes reatores observou-se crescimento celular mais rápido do que na mesa rotativa, bem como uma melhora significativa quando o pH foi ajustado.

Em 1979, DE BALES & CASTILLO estudaram a produção de lactase em soro de queijo desproteinado por *Candida pseudotropicalis*. A produção máxima da enzima em meio contendo 2% de soro foi obtida com um suplemento de 0,15% de extrato de levedura., 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,05 % de KH_2PO_4 (m/v). Os valores mais altos de atividade (4,35 UI/mg de células e 68 UI/ml) foram obtidos com 10 a 12% de soro, porém a máxima produção foi com 2 % (0,87 UI/mg de soro). O pH ótimo para cultivo foi 3,5. Analisando-se as condições de extração da enzima observaram que os melhores resultados foram alcançados quando usou-se 2% de clorofórmio e 10 horas de tratamento. A máxima extração foi obtida em valores de pH 6,6 a 7,8, quando a temperatura de extração foi de 30 a 37°C. Como pH e temperatura ótimas para a atividade obtiveram 6,2 e 47°C, respectivamente. Esta enzima teve um K_m para o-nitrofenil- β -galactopiranoside (ONPG) de $3,06 \times 10^{-3}$ M e a V_{max} inicial foi estimada como $6,63 \times 10^{-8}$ M por minuto. Ela hidrolisa de 50 a 100% de lactose no soro de queijo e leite em 4 e 5 horas, respectivamente; a 37°C. A enzima liofilizada retêm 95% da atividade por 3 meses quando estocadas a - 20°C.

A cinética de indução de β -galactosidase em *Kluyveromyces lactis* foi estudada por DICKSON & MARKIN (1980). Os mesmos concluíram que a atividade da enzima começou a aumentar 10 a 15 minutos após a adição de indutores e continuou a aumentar linearmente antes de alcançar o máximo, cerca de 125 a 150 vezes comparado com a média de células não induzidas. Daí em diante um crescimento longo e logarítmico foi mantido. A indução da enzima requer a presença constante de indutores, já que a remoção dos mesmos causou a redução da concentração da enzima. Três indutores de atividade de β -galactosidase foram identificados: lactose, galactose e ácido lactobiônico. Vários indutores do "lac operon" de *Escherichia coli* incluindo metil-, isopropil- e fenil-1-tio- β -D-galactoside e tioalolactose não induziram β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, embora eles tenham aderido às células. A máxima taxa de indução foi apenas alcançada com concentrações de lactose maiores do que 1 a 2 mM. A taxa diferencial inicial de β -galactosidase constatada após indução foi reduzida quando usou-se meio contendo glicose, indicando repressão catábolica de carbono transiente. Os autores observaram que *K. lactis* cresceu ligeiramente mais rápido em lactose do que em glicose, indicando que este microorganismo desenvolve um eficiente sistema para a utilização de lactose.

BANERJEE et alii (1982) estudaram a produção e imobilização de células contendo β -galactosidase. Estes autores usaram o microorganismo *Saccharomyces anamensis* e obtiveram como dados ótimos pH igual a 4,5, temperatura de 26°C e 30 horas de incubação. Adição de lactose na 24ª hora aumentou consideravelmente a concentração da enzima. A imobilização não afetou muito o pH ótimo, temperatura, estabilidade ao pH e termoestabilidade da enzima. Os valores de Km da enzima nativa e imobilizada foram 102 mM e 148 mM, respectivamente. Glicose inibiu não-competitivamente a atividade da enzima. A adição de substâncias tais como ditioritritol, glutationa e soro de albumina bovina antes da imobilização teve efeitos estimuladores na atividade da enzima. Íons dos metais como Ca^{2+} e Mg^{2+} aumentaram a atividade da enzima. As células imobilizadas retiveram 68,6% da atividade de β -galactosidase das células intactas e não apresentaram perda de atividade em estocagem a 4 °C por 28 dias.

GONZALEZ & BERRY (1982) analisaram o efeito indutivo de lactose, β -metil-tio-D-galactopiranoside (TMG) e glicose na síntese de β -galactosidase por *Kluyveromices lactis* e constataram que a adição de lactose não ocasionou aumento significativo no estímulo da síntese da enzima. O valor mais alto foi obtido com a

concentração de 0,03M de lactose. Entretanto, o indutor tiometil- β -D- galactopiranosose ocasionou um estímulo de 5 vezes maior na atividade quando adicionado em 10^{-2} M. Os resultados mostraram que glicose exerce um efeito repressivo quando adicionado a concentração de 10^{-3} M e acima desta, mas a baixas concentrações ($< 10^{-3}$ M) é um indutor muito efetivo na síntese da enzima.

A produção de biomassa e β -D-galactosidase em soro de queijo pela levedura *Candida pseudotropicalis* NCYC 744 foi estudada por GOMEZ E CASTILLO (1983). A otimização das condições de cultivo e meio foi feita em cultura contínua. A temperatura e pH ótimos foram 36 a 38°C e 2,6, respectivamente. O crescimento da levedura foi estimulado com a adição de triptofano. O meio, sob condições ótimas, foi suplementado com excesso de triptofano, Cu, Zn e Mn e obtiveram valores máximos como: concentração de levedura, 4,6 g/l; produtividade de levedura, 1,4 g/l h (a $-D=0,35$ h $^{-1}$); produtividade volumétrica da enzima, 2100 U/lh (a $D=0,25$ h $^{-1}$); coeficiente de manutenção, 5-10 mg lactose/g de células h; constante de saturação (Ks) para lactose, 4,76 mM; taxa máxima de crescimento específica (μ_{max}), 0,47 h $^{-1}$. Neste estudo não foi constatado um aumento significativo na atividade específica da enzima (U/mg de células) após a otimização do meio, evidenciando desta maneira, a importância de controles reguladores na síntese da enzima.

Sob diferentes condições de indução, a levedura industrial *Kluyveromyces fragilis* é um excelente produtor das enzimas inulase (β -D-frutofuranoside frutohidrolase, EC. 3.2.1.26) e lactase (β -D-galactosidase galactoctohidrolase, EC. 3.2.1.23) produzindo 27 e 1,6 U/mg de peso celular seco, respectivamente. A fim de melhorar a produção total da enzima foram examinadas condições para a produção simultânea das duas enzimas em fermentação de único estágio. As técnicas empregadas incluem fermentação em batelada com carbono limitado e fermentação contínua, com um ou vários substratos carbonados e o uso de mutantes semi-constitutivo para produção de inulase. Das fontes de carbono apenas glicerol e DL-maltase não reprimiram as duas enzimas. Os não-metabolizáveis análogos à lactose, isopropil- β -D-tiogalactoside e metil- β -D-tiogalactoside induziram lactase em fermentação em batelada utilizando glicerol como substrato mas não foram efetivos quando o substrato era sacarose, em fermentação contínua. Os maiores valores simultâneos de atividade de inulase e lactase foram obtidos em cultivo contínuo em uma mistura equivalente de D-frutose e D-galactose (25 e 0,78 UI/mg de células, respectivamente). Nesta fermentação, a produção combinada por unidade de substrato

de carbono das duas enzimas foi de 141 %, comparado com os valores referenciais de 100 % para as maiores produções de cada enzima separadamente. Na mesma mistura de D-frutose e D-galactose, o mutante produziu 60 e 0,70 UI/mg de células secas, respectivamente e a produção combinada das enzimas por unidade de substrato de carbono foi 172%. (HEWITT & GROOTWASSINK, 1984)

BARBOSA et alii (1984) testaram dois gêneros de *Kluyveromyces fragilis* (145 e 276) e um gênero de *Kluyveromyces lactis* para a produção de β -galactosidase em soro de queijo. *Kluyveromyces fragilis* 145 foi selecionado como o produtor de maior atividade por célula no final da fase exponencial de crescimento. Os autores verificaram que a adição de sulfato de amônia (0,3%) e extrato de levedura (0,1%) em soro de queijo desproteinado aumentaram a massa celular e a produção da enzima. Adição de 3 % de lactose não influenciou na atividade de β -D-galactosidase por célula e uma redução na aeração de 1 vvm para 0,25 vvm elevou a atividade da enzima. As células das leveduras foram permeabilizadas com etanol e acetona a fim de aumentar a hidrólise de lactose.

Estudos feitos sobre a produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces fragilis* concluíram que a máxima atividade específica (14,71 U) foi observada após 72 horas de incubação a 30° C em pH de 5,5. Verificou-se que esta enzima era do tipo induzida e seus indutores eram lactose e galactose. A concentração de lactose de 10% foi avaliada como a ótima para a máxima síntese da enzima. Verificou-se também que extrato de levedura era a melhor fonte de nitrogênio (atividade igual a 13,24 U) seguido de peptona (11,84 U). A concentração de extrato de levedura para a máxima produção da enzima observada foi de 0,5%. Co^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} em concentrações de 10^{-3}M estimularam a produção da enzima enquanto que metais pesados inibiram-na (THOMAS et alii, 1984).

Em 1992, CHEN et alii pesquisaram um método rápido e efetivo a fim de otimizar um meio para a produção de lactase por *Kluyveromyces fragilis*. Os componentes mais importantes para melhorar a produção da enzima foram primeiro escolhidos na literatura (lactose, água de maceração de milho, glicose e glicerol). O meio continha esses quatro componentes e mais uma quantidade fixa de K_2HPO_4 (3,5 g/l). Um teste inicial do intervalo de cada variável para aproximação das condições ótimas foi selecionado baseado nos resultados experimentais de uma proposta simplificada de projeto fatorial. A composição ótima do meio nutriente foi, então,

facilmente encontrada pelo uso de CCD (projeto central composto), para experimentos em frascos agitados. A composição do meio ótimo foi calculada como sendo 80,6 g/l de lactose, 107,7 g/l de água de maceração de milho, 4,1 g/l de glicose e 9,6 g/l de glicerol. A produção da enzima aumentou 60% quando o microorganismo foi cultivado neste meio, comparada com a composição de meios convencionais encontrados na literatura.

Foram analisados cinco gêneros de *Kluyveromyces marxianus* para a produção de lactase intracelular, pectinase intra e extracelular e inulinase intra e extracelular. O produtor NRRL-Y-1109 apresentou alta atividade de lactase, mas o gênero CDBB-L-278 produziu atividades mais elevadas de inulinase e pectinase do que todos os outros testados. Como o interesse da pesquisa era a evolução do microorganismo para a produção simultânea de lactase e pectinase ou inulinase, o produtor CDBB-L-278 foi selecionado. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio incubados em mesa rotativa à 250 rpm, 30°C com 5 ml de inóculo cultivado em meio da mesma composição. Para a produção das enzimas foram usados os meios descritos na TABELA 2.4.

TABELA 2.4. Meios de cultura para produção de lactase, pectinase e inulinase.

PECTINASE	LACTASE	INULINASE
2 % glicose	2 % de lactose	2 % de glicose
0.2 % de extrato de levedura	0.2 % de extrato de levedura	0.5 % de extrato de levedura
0.1 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 % (NH ₄) ₂ SO ₄
0.05% de KH ₂ PO ₄	0.05% de KH ₂ PO ₄	0.05 % de KH ₂ PO ₄
0.05 % de MgSO ₄	0.05 % de MgSO ₄	0.05 % de MgSO ₄
0.5 % de pectina	-----	0,5 % de inulina

FONTE: ESPINOZA et alii. (1992)

Para a produção simultânea de lactase e pectinase usou-se o meio de lactase suplementado com 0.5 % de pectina. E para a produção simultânea de lactase e inulinase 0.5 % de inulina foi adicionado ao invés de pectina. O pH foi ajustado a 5.0 com H₂ SO₄ em todos os casos.

TABELA 2.5. Atividade de lactase, pectinase com e sem indutor e atividade intra e extracelular de inulinase.

Gênero	Lactase (UL)	Pectinase (UPG) com indutor	Pectinase (UPG) sem indutor	Inulinase intracelular	Inulinase extracelular	Total
CDBB-L-278	1590	329	28	2000	812	2812
UCD-C-351	699	306	N.D	1812	554	2366
NRRL-Y-1109	2046	N.D	N.D	760	226	986
NRRL-Y-1195	1068	N.D	N.D.	770	28	798
CDBB-L-337	60	N.D.	N.D.	136	62	198

N.D. = não detectada

FONTE: ESPINOZA et alli (1992).

Todas as atividades foram reportadas em unidades por gramas de biomassa de levedura. A TABELA 2.5. mostra lactase intracelular, pectinase extracelular com e sem pectina como indutor e inulinase medida intra e extracelularmente. Pectinase intracelular não foi detectada em nenhum caso. A fermentação das duas enzimas alcançaram produções de 44% lactase e 53% pectinase ou 26% lactase e 47% inulinase comparadas com os níveis das enzimas isoladamente (ESPINOZA et alli, 1992)

KU & HANG em 1992 estudaram a produção de lactase por leveduras usando salmoura "sauerkraut", que é um produto obtido da fermentação láctica de repolho salgado. Esta solução tem DBO elevada, alta acidez expressa em ácido láctico e alto conteúdo de sais e isto causa um sério problema de poluição ambiental. A fim de aproveitar esta salmoura este trabalho teve como objetivo produzir lactase (uma enzima de grande interesse na indústria de alimentos) usando *Kluyveromyces marxianus*. A salmoura foi diluída 2 vezes a fim de obter-se uma acidez titulável de 0,49 % . Cincos gêneros de *Kluyveromyces marxianus* (NRRL-Y-610, NRRL-Y-1109, NRRL-Y-1140, NRRL-Y-1196, UCDC-351) e um tipo de *K. lactis* NRRL-Y-8279 foram usados neste estudo. A atividade da enzima variou de 2,8 a 8,5 U/mg de células dependendo da quantidade de lactose adicionada e o tempo de fermentação. O gênero *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1196 produziu a maior atividade de lactase quando cultivado em frascos agitados por 24 horas em salmoura de "sauerkraut" com 0,2 % de lactose como indutor. A enzima foi purificada 4 vezes e teve uma atividade específica de 28 UI/mg de proteína. O valor de Km foi 3,94 mM

para ONPG. O pH e temperatura ótimos da enzima foram 7,0 e 50°C, respectivamente. A enzima apresentou boa estabilidade em pH de 6,0 a 7,6 mas perdeu atividade à 60 °C.

NUNES et alii (1993) usaram permeado de soro de queijo e soro desproteinado por acidificação como meio de crescimento de *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-2415 para a obtenção de β -galactosidase. Estes autores verificaram que a suplementação destes meios com 0,1 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,05 % de KH_2PO_4 aumentou as produções de massa celular seca e β -galactosidase. A extração da enzima das células de levedura feita por autólise em tampão fosfato e 2% de clorofórmio foi mais rápida do que quando se substituiu o clorofórmio por 2% de tolueno, sendo a atividade obtida função da concentração celular da suspensão. Esta enzima tem pH ótimo entre 6,6 e 6,8 e sua estabilidade a respeito do pH de pré-incubação por 1 hora é baixa, o que indica que durante o processo de sua obtenção deve-se trabalhar na faixa ótima de pH e temperaturas baixas. Quanto a temperatura de atividade máxima, não há diferença em trabalhar a 30°C e a 37°C, a 50°C a enzima é totalmente inativada. Uma alternativa para pré-purificar esta enzima é utilizar membranas de ultrafiltração. Usando membrana de 0,08 μm , foi possível obter um extrato enzimático livre de fragmentos celulares; com outra de 15000 Daltons, foi possível aumentar sua concentração obtendo-se no final extrato de 2500 UI/ml de ONPG.

2.4.2. LACTASES PRODUZIDAS POR FUNGOS

Culturas de 54 fungos filamentosos termofílicos, representantes de 15 espécies e 12 gêneros foram testados por SORENSEN & CRISAN (1974) pela habilidade de produzir lactase. Todos foram capazes de produzir algum crescimento a 45°C em meio contendo lactose como única fonte de carbono. Quatro tipos de *Mucor pusillus* exibiram a maior atividade enzimática (0,81-0,95 $\mu\text{moles/mg}$) e foram testados quanto a influência do pH e temperatura. Apresentaram como dados ótimos pH de 4,4 quando obteve-se atividade de 1,58-2,50 $\mu\text{moles/mg}$ a 61°C e no mínimo 75% da atividade máxima foi mantida na faixa de 53-63°C. A enzima produzida pelas espécies de *Mucor pusillus* perderam apenas 27% de sua atividade após 1 hora a 60°C e reteve mais de 60% de sua atividade após 2 horas nesta temperatura.

Em 1979, MUSTRANTA et alii investigaram a produção de lactase por fungos selecionando o melhor produtor entre os tipos *Aspergillus*, *Neurospora* e *Mucor*. Esta seleção foi feita em frascos agitados e o meio de cultura foi composto de soro de queijo concentrado, peptona e extrato de levedura em pH inicial de 5,0 e temperatura de 30°C. Um gênero de *Aspergillus niger* (VTT-D-79106) foi selecionado para posterior estudo. O efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na formação de lactase foi investigado e concluíram que as melhores fontes de carbono eram soro de queijo e farelo de trigo e as melhores fontes de nitrogênio eram fosfato de amônia e resíduo líquido de destilação ("distiller's spent grain"). A máxima atividade de lactase foi alcançada em 3-4 dias de fermentação. O pH ótimo desta enzima foi 4,0 e a temperatura ótima foi de 62°C. A enzima mostrou boa estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 8,0. Obteve-se 90% de sua atividade inicial após 1 mês a temperatura ambiente.

PASTORE & PARK (1979) isolaram 1067 tipos de fungos do solo pelo método de cultura em placas usando meio P.D.A. e examinaram lactase extracelular. Um gênero de *Scopulariopsis* foi selecionado para estudos posteriores devido sua alta produtividade de enzima. Usando meio de cultura com farelo de trigo (processo Koji) a máxima atividade foi atingida em 110 horas de incubação e sua produtividade não foi alterada com a adição de 1% de lactose (como indutor) no meio de farelo de trigo. A máxima hidrólise de lactose pela enzima ocorre em pH entre 4,0 e 5,0 e para ONPG foi entre pH 3,6 e 5,0. A temperatura ótima para hidrólise de ONPG foi a 65°C. Após 50 horas de incubação, aproximadamente, 95% de lactose do soro foi hidrolisada e papel cromatográfico não detectou lactose. Foi constatado que lactase produzida por *Scopulariopsis* é altamente termoestável e muito ativa em pH ácido, quando comparada com lactases de leveduras.

PARK et alii (1979) selecionaram um gênero de *Aspergillus orizae* que hidrolisou lactose em soro de queijo e de produtos lácteos. O concentrado de células foi preparado tanto em fermentação usando meio semi-sólido como usando meio submerso. As produções enzimáticas em meio semi-sólido foram bastantes superiores as do meio submerso. Este extrato cru enzimático hidrolisou 83% de lactose a 55°C, porém sua atividade foi bastante reduzida em leite de vaca. A enzima foi purificada por fracionamento com sulfato de amônia, cromatografia em DEAE- Sephadex A-50, DEAE-celulose e CM-celulose. A enzima purificada teve pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima 50°C, enquanto que para o extrato cru enzimático foi de 55°C. A enzima apresentou boa estabilidade em pH na faixa de 3,8 a 8,0 em temperatura

ambiente por uma noite. A constante de Michaelis foi de 0,77 mM para ONPG e 50mM para lactose. Os valores de V_{max} para ONPG e lactose foram 55,6 $\mu\text{g}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína e 2,4 $\mu\text{g}/\text{minuto}/\text{mg}$, respectivamente. Verificou-se que galactose inibia competitivamente a atividade enzimática e glicose não.

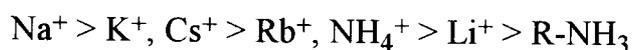
Com o objetivo de explorar novas fontes de lactase extracelular, MACRIS (1982) selecionou o fungo *Alternaria alternata* por produzir elevadas quantidades de uma forma termoestável da enzima lactase, cultivado em soro de queijo. Condições ótimas para a máxima produção da enzima foram atingidas quando a concentração de lactose no meio foi de 6% suplementado com 0,050M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a fermentação foi realizada em 5 dias a 28-30°C. O pH ótimo foi na faixa de 4,5 a 5,5 e a temperatura ótima da reação enzimática foi na faixa de 60 a 70°C. A meia-vida da enzima a 65°C foi de 84 minutos. O pH ácido da enzima acrescentou uma vantagem já que enzimas deste tipo são aproveitadas no uso da hidrólise de lactose de produtos lácteos ácidos ou subprodutos.

CASTILLO et alii (1984) encontraram um produtor de lactase extracelular em meio de lactose denominado *Trichoderma reesei* Rut-C30. Os níveis máximos da enzima em cultura contínua foram observados em uma taxa de diluição (D) entre 0,02 e 0,027 h^{-1} . A produtividade da enzima alcançou 27,3 U/lh a uma D igual 0,027 h^{-1} . A síntese desta enzima demonstrou ser induzida e sujeita a repressão catabólica. A temperatura e o pH ótimos para a produção foram de 28°C e 5,0, respectivamente. A máxima atividade da enzima foi observada a 63°C e pH igual a 4,6. A constante K_m aparente, determinada com ONPG, foi estimada como 0,4 mM.

2.4.3. LACTASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS

KUBY & LARDY (1953) estudaram a purificação e cinética de β -galactosidase por *Escherichia coli* K-12 e concluíram que com substrato ONPG a máxima atividade foi obtida entre pH 7,2 a 7,3 em concentração de Na^+ constante de 0,14 M. O efeito do pH na estabilidade da enzima foi determinado pela pré incubação a 30°C por 36 minutos na ausência de substrato, em tampão fosfato a vários valores de pH e obteve-se que a enzima apresentou boa estabilidade entre pH 6 a 8. Foi estudado também o efeito da concentração do substrato, a determinação de K_s e V_{max} para vários substratos. Estes resultados encontram-se resumidos na TABELA 2.6. Foi analisado o

efeito inibidor de alguns íons e conclui-se que alguns cátions têm efeito indutor na síntese da enzima:



e alguns ânions são fortes inibidores:

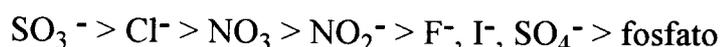


TABELA 2.6. Constantes de Michaelis e velocidades máxima de lactase de *Escherichia coli* para varios substratos.

Composto	Ks (moles/litro)	Vmax ($\mu\text{mol/litro}$)
o-nitrofenil β -D-galactoside	$1,8 \times 10^{-4}$	32×10^{-3}
p-nitrofenil β -D-galactoside	$0,93 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-3}$
o-nitrofenil α -L-arabinoside	$2,6 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
Fenil β -D-galactoside	$7,3 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$
Metil β -D-galactoside	$6,9 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$
η -butil β -D-galactoside	$6,9 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-3}$
Lactose	10^{-3}	3×10^{-3}
Lactositol	0,03	$2,5 \times 10^{-4}$
Lactobionate	0,04	$1,0 \times 10^{-4}$

FONTE: KUBI E LARDY (1953)

GRAY et alii (1972) estudaram o crescimento de um mutante de *Escherichia coli* ML308 em um meio contendo extrato de levedura, glicerol e sais. Os autores avaliaram o efeito da temperatura na produção da enzima (25, 35, 40, 42°C) e constataram que as atividades das enzimas nas temperaturas de 35, 40 e 42°C foram bastante similares, variando em um intervalo de 4,3-4,6 U/mg de células. A 25°C a máxima taxa de crescimento e a atividade final da enzima foram menores comparadas com as outras temperaturas. Estes resultados demonstram que entre 35 a 42°C não

houve efeito da temperatura na produção da enzima e que a temperatura ótima de crescimento foi também a temperatura ótima de produção enzimática. A grande limitação de oxigênio durante o crescimento causou repressão da síntese de lactase e subsequente diminuição da atividade específica das células.

Foram estudados 8 tipos de *Bacillus termofilico* produtores de β -galactosidase. Um dos produtores, investigado no extrato de células, teve um pH ótimo na faixa de 6,0-6,4. A temperatura ótima da enzima é 65°C e a E_a é 24 Kcal/mol abaixo de 47°C e 16 Kcal/mol acima desta temperatura. A 55°C K_m é 0,11M para lactose e $9,8 \times 10^{-3}$ M para ONPG. A enzima é um produto fortemente inibido por galactose ($K_i = 2,5 \times 10^{-3}$ M). É relativamente estável a 50°C, perdendo apenas metade de sua atividade após 20 dias nesta temperatura. A 60°C mais do que 60% de sua atividade é perdida em 10 minutos. Porém, muitas vezes, a enzima é protegida da inativação térmica pela proteína e a presença de 4 mg/ml de soro de albumina bovina na enzima faz com que apenas 18% seja inativada em 10 minutos a 60°C (GOODMAN & PEDERSON, 1976)

β -D-galactosidase (EC 3.2.1.23) foi produzida por *Streptococcus thermophilus* cultivado em soro de queijo desproteinado por RAO & DUTTA (1977). Estes autores testaram soros ácidos de vaca, búfalo, cabra, misturas de leite (vaca e búfalo) e soro de queijo para determinar o efeito dos diferentes tipos na produção da enzima. As atividades de todas as amostras estiveram em um intervalo de 630 - 678 U/l de meio. Selecionou-se, deste modo, soro de queijo para os testes posteriores. Obtiveram como condições ótimas de cultivo pH de 7,0 e temperatura de 40°C em 24 horas de fermentação. Peptona protease (2% m/v) e água da maceração de milho (2,8% m/v) demonstraram serem ótimos estimuladores, aumentando a atividade da enzima de 660 U/l (na sua ausência) para 18 200 e 10 000 UI/l de meio, respectivamente.

KOBAYASHI et alii (1978) estudaram a produção e imobilização de β -galactosidase usando *Bacillus acidocaldarius* HM-1 e 11-10. Os autores cultivaram o microorganismo em meio contendo 2 g de triptona, 2 g de extrato de levedura, 2 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de NaCl, 0,1g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 25mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 25mg $MnSO_4 \cdot H_2O$ em 900ml de água destilada. O pH do meio foi ajustado em 4,0 e esterilizado a 110°C por 10min.. A lactose (10g) foi dissolvida em 100ml de água e esterilizada separadamente. Os meios foram cultivados a 65°C e pH 4,0 em fermentadores tipo jarra de 1litro, equipados com controladores de pH e

oxigênio dissolvido ou em um fermentador de 10 litros com agitador e aerador. Como resultados obtiveram para os *Bacillus acidocaldarius* HM-1 e 11-10, temperaturas ótimas de 65°C e 70°C, respectivamente. O pH ótimo foi aproximadamente 6,0 para as duas enzimas. Notaram também que em pH abaixo de 5,0 não foi observada atividade em nenhuma das enzimas. Do gráfico de Arrhenius, a energia de ativação foi estimada como: 24 kcal/mol (abaixo de 57°C) e 14 kcal/mol (acima de 57°C) para a enzima de *Bacillus* 11-10 e 23 kcal/mol (abaixo de 54°C) e 15 kcal/mol (acima de 54°C) para o *Bacillus* HM-1. Do gráfico de Lineweaver-Burk obtiveram Km para a lactose como: 0,12 M e 0,10 M, respectivamente. As enzimas do produtor 11-10 foi imobilizada em Dowex MWA-1 e Sepharose 4B e com gel poliacrilamido. O perfil de pH da enzima imobilizada em Dowex MWA1 mudou na parte ácida. A temperatura ótima da enzima imobilizada em "Sepharose 4B" foi 5°C maior quando comparada com a enzima nativa. A meia vida da enzima imobilizada em "Sepharose 4B" em operação contínua foi de 42 dias a 50°C, quando a solução de lactose (pH 6,5) foi passada através da coluna e 32 dias quando utilizou-se leite bovino. Os resultados de meia vida obtidos tanto para a lactose quanto para o leite são superiores aos da enzima imobilizada de *Aspergillus niger* comercial (Lactase LP).

GRIFFITHS & MUIR (1978) pesquisaram as propriedades de β -galactosidase produzida por um "*bacillus termofilico*" ("*Bacillus stearothermophilus*") e compararam com as propriedades da enzima purificada e com células imobilizadas. A enzima parcialmente purificada apresentou atividade ótima a temperatura de 60°C e pH 6,0. As atividades da enzima em células integrais e células integrais imobilizadas apresentou diferença na temperatura ótima (75 e 65°C respectivamente) e pH ótimo (6,2 e 6,6 respectivamente). A atividade enzimática das células integrais foi significativamente mais termoestáveis do que a das células parcialmente purificadas. A meia vida das células integrais foi 125 minutos e das células purificadas foi de 22 minutos. O microorganismo foi cultivado em fermentador contínuo a 65°C, com agitação e aeração em meio básico usando lactose (20mM) como única fonte de carbono. As propriedades desta β -galactosidase tornou a enzima aceitável para hidrólise de lactose em produtos lácteos. A possibilidade do uso de células integrais, por ser um microorganismo não-patogênico e incapaz de crescer a temperatura de 37°C é uma vantagem desta enzima.

GREENBERG & MAHONEY (1982) selecionaram entre 4 gêneros de *Streptococcus thermophilus* (19871, 19258, 14485, e B-3641) o melhor produtor

de β -galactosidase como sendo o gênero B-3641. Os microorganismos foram cultivados em meio contendo 3% de água de maceração de milho (filtrado 2 vezes), 2% de peptona e 7% de soro de queijo desproteinado. A enzima obtida foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônia e cromatografia de troca iônica. O gênero B-3641 produziu 942 U/l de meio comparada com 616 U/l do produtor 19 258, 466 U/l do produtor 14 485 e 268 U/l do produtor 19 871. A quantidade de enzima produzida aumentou em 9 vezes pela diminuição da concentração de soro de 7% para 2%, tamponando o meio a pH 7,0 com 2% de fosfato de potássio (m/v) e aumentando o período de incubação de 24 horas para 28 horas. As atividades mais elevadas foram obtidas em pH 7,1 e na presença de íons potássio e manganês. Esta β -galactosidase apresentou 28% de sua atividade original após 10 minutos a 55 °C (pH 7,0). A enzima foi bastante estável (90%) em um intervalo de pH 7,0 a 10,0. O valor de Km para ONPG e lactose foi 0,98 mM e 6,9 mM, respectivamente. Galactose inibiu competitivamente sendo Ki igual a 60 mM. O peso molecular determinado por gel-filtração foi de 530 000.

Uma β -galactosidase induzida de um organismo extremamente termofílico, *Thermus* tipo 4-1A, foi isolada e parcialmente purificada. Foi utilizado um meio padrão aerado contendo 0,5% de galactose e a máxima atividade produzida foi de 1500 UI/ml (500 UI/mg peso seco celular) em 12 e 16 horas. A ordem de indução efetiva foi galactose > lactose > isopropiltiogalactoside. A enzima foi inibida por inibidores sulfídricos e grande quantidade de metais de transição e foi ativada por EDTA e reagentes contendo radical SH. A estabilidade da enzima foi bastante elevada a pH 8,0 em solução diluídas a 90°C. Na imobilização o pH ótimo foi 6,0 e o Km com ONPG 5 mM e a inibição pelo produto não foi alterada (COWAN et alii, 1984).

SMART et alii (1985), estudaram o potencial de hidrólise de lactose no leite e soro de queijo através da produção da enzima β -galactosidase de "*Streptococcus thermophilus*". Foi utilizado permeado de queijo cheddar (250g/l) suplementado com Na₂HPO₄ (5,5g/l), KH₂HPO₄ (5,0g/l) e polipeptona (2,5g/l) como meio de cultura. Este meio teve pH 6,8, contendo 2,2 % de lactose. A fermentação foi realizada a 42°C, com pH controlado por adição de NaOH 2M e agitação de 500 rpm. As células autolisadas liberaram β -galactosidase em alta concentração no meio de cultura. A enzima liberada teve pH ótimo neutro, boa estabilidade térmica e poderia ser usada a temperatura acima de 55°C. A atividade hidrolítica de lactose foi sensível a íons presentes no leite. A enzima apresentou atividade satisfatória em leite e soros neutros.

Foram encontradas importantes diferenças nas propriedades de β -galactosidase produzidas por diferentes tipos de "*Streptococcus thermophilus*" dependendo do substrato usado: ONPG ou lactose. Por exemplo galactose, um produto da reação de hidrólise da lactose, inibia a enzima quando o substrato ONPG era usado mas não apresentava nenhum efeito com a lactose. Da mesma maneira, Na^+ , que inibiu a reação com a lactose na presença de Mg^{++} e K^+ foi um ótimo ativador na reação com ONPG.

CHANG & MAHONEY (1989) produziram e purificaram lactase de "*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*". O inóculo (2% v/v) foi adicionado a 10 litros de meio contendo 2% de lactose que fermentou por 6h a 42°C em pH 6 e agitação de 150 rpm. A enzima foi purificada 109 vezes e sua recuperação foi de 41% e atividade específica inicial 592 U/mg a 37°C. A estabilidade da enzima foi de 37 a 83 vezes maior em leite do que em tampão fosfato em um intervalo de temperatura de 60 a 65°C. A 60°C a meia vida em leite foi de 146 minutos. Como dados cinéticos obtiveram energia de desativação, E_d de 453 kJ/mol em leite e 372 kJ/mol em tampão fosfato. No leite, a energia de ativação, E_a para hidrólise de lactose foi de 35,1kJ/mol.

2.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA

Sendo as enzimas de natureza protéica, sofrem desnaturação térmica, perdendo com isso, sua atividade total ou parcialmente. O conhecimento da estabilidade térmica é de grande importância, pois como se sabe, a maioria das reações em que as enzimas estão envolvidas, sofrem um aumento na taxa de reação, a medida que aumenta a temperatura (DIXON et alii, 1979).

As constantes de taxa de reação variam com a temperatura, segundo a equação de Arrhenius

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

onde

K = constante da taxa de reação

A = fator de frequência para a reação

Ea = energia de ativação

T = temperatura absoluta

R = constante dos gases ideais

A equação de Arrhenius descreve bem a dependência da taxa de reação com a temperatura, numa ampla faixa da mesma. Porém, o comportamento da reação enzimática difere em relação a faixa de temperatura, pois as enzimas são proteínas e a faixa de temperatura em que se trabalha é pequena, em relação as reações químicas. Em uma reação enzimática, a velocidade de reação aumenta com o aumento da constante de velocidade, até a chamada "temperatura ótima", depois decresce rapidamente, devido a desnaturação da enzima. Normalmente, uma cinética de desativação térmica de primeira ordem é suficiente para descrever o comportamento da desativação com o tempo de operação (DIXON et alii, 1979). Utilizando-se o modelo:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d A \quad (2)$$

onde:

t = tempo

A = concentração de enzima ativa ou atividade num tempo t qualquer.

Kd = constante da taxa de desativação

Integrando a equação 2 entre tempo t = 0 e t, obtem-se

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = K_d t \quad (3)$$

ou

$$A = A_0 \exp(-K_d t) \quad (4)$$

onde: A₀ = concentração inicial de enzima ativa ou atividade inicial

Costuma-se expressar a estabilidade térmica também em termos de meia vida, que é definida como sendo o tempo necessário para a enzima perder 50% de sua atividade inicial (DIXON, 1979), ou seja :

$$A/A_0 = 0,5 \quad (5)$$

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pode ser relacionado a constante de desativação K_d , através da equação abaixo:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (6)$$

Pode-se obter o valor da constante de desativação (K_d) plotando $-\ln(A/A_0)$ versus tempo, para uma dada temperatura, sendo que K_d varia com a temperatura segundo as equações abaixo:

$$K_d = A \cdot e^{-E_d/RT} \quad (7)$$

ou

$$\ln K_d = -\frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (8)$$

onde: E_d = energia de desativação da enzima ou energia de ativação para a reação de desnaturação

R = constante universal dos gases

A = constante da equação de Arrhenius/ fator de frequência

Com valores de K_d , a várias temperaturas, pode-se obter o valor de E_d , plotando K_d em função de $1/T$.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMO

Erwinia aroideae NRRL B-138 foi utilizada neste trabalho. Esta cultura foi obtida através do Instituto Northern Regional Reserch Center, U.S. Department of Agriculture - U.S.A. e mantida em estoque no laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

3.2. MEIO DE MANUTENÇÃO

Erwinia aroideae foi mantida em ágar inclinado contendo a composição apresentada na tabela 3.1 e repicada periodicamente.

TABELA 3.1. Composição do meio de manutenção em ágar inclinado para *Erwinia aroideae*.

Composição	g/l
Extrato de levedura microbiológico	5
Triptona	5
Soro de queijo	5
Ágar	20

3.3. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura líquido utilizado para fermentação teve sua composição variada em função da concentração de lactose, suplementado com extrato de levedura em concentração de 5g/l.

3.4. PREPARO DO INÓCULO

Tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura, previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos, foram inoculados com uma alçada de cultura estoque. Estes tubos foram mantidos em incubadora por 24 horas a 30°C. O conteúdo do tubo foi

transferido para erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio de cultura previamente esterilizado.

3.5. FERMENTAÇÃO

A etapa de fermentação foi realizada em duas fases. Inicialmente, foram feitos ensaios preliminares em erlenmeyers de 500 ml e incubados sobre mesa rotativa e os ensaios finais foram feitos em escala maior onde usou-se fermentador de 6 litros marca Biolafitte modelo 6 L.

3.5.1. EXPERIMENTOS EM ERLLENMEYERS

Os ensaios para determinação da composição do meio e a influência do pH e temperatura na produção da enzima foram feitos em erlenmeyer de 500 ml com volume de meio de 100 ml. Os meios foram esterilizados em autoclave vertical Fabbe modelo 103 a 121°C por 15 minutos e resfriados a temperatura ambiente. A fermentação se deu transferindo volume de 5 ml do inóculo (item 3.4) e incubado por 12 horas sobre mesa rotativa com temperatura controlada a 28°C e agitação de 200 rpm.

3.5.2. EXPERIMENTOS EM FERMENTADOR

Nesta etapa utilizou-se um fermentador de 6 litros marca Biolafitte. Foi utilizado como meio fermentativo soro de queijo integral e desproteinado por acidificação e aquecimento com concentração de 55 g/l de lactose e suplementado com 5 g/l de extrato de levedura .

O meio de fermentação foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos e resfriado até a temperatura de fermentação. Em seguida, o inóculo foi adicionado iniciando-se o processo fermentativo.

Amostras foram retiradas em intervalos de 1 hora para análises de pH, massa celular seca, concentração residual de ART, glicose e atividade enzimática..

3.5.2.1. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LACTASE

Foram realizados ensaios em fermentador de 6 litros com diferentes temperaturas de fermentação usando-se soro de queijo desproteinado (25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C) e usando soro integral (25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C) com a finalidade de se determinar a temperatura ótima de crescimento e produção da enzima. A taxa de aeração foi de 1 vvm e a agitação de 350 rpm. Não houve controle de pH durante a fermentação.

3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS

Todas as amostras foram centrifugadas em centrífuga Fanem Excelsa Baby modelo 206 a 3000 rpm por 20 minutos . O sobrenadante foi separado para análise de ART e glicose e a massa celular decantada e lavada por duas vezes foi usada para determinação de massa seca e atividade enzimática.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE

Parte do sobrenadante do item 3.6.1 de cada amostra foi usado para determinação de concentração residual de lactose no meio de fermentação pelo método de Fehling.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da concentração de glicose (Dahlqvist, 1964) foi feita conforme procedimento do catálogo técnico do reagente Glicose Enz-color. A uma alíquota de reagente glicose Enz-color (2,5 ml) foi adicionado 20 µl da solução do sobrenadante obtido no item 3.8.1 e levado a um banho de água a 37°C por 10 minutos. Após a formação de uma coloração rosa, a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 510 nm. A leitura foi

comparada com a de uma solução padrão de glicose (0,1 %) e a concentração de glicose foi calculada pela equação abaixo:

$$\text{Concentração de glicose (g/l)} = \frac{\text{Absorbância (amostra)}}{\text{Absorbância (padrão)}}$$

3.6.4. DETERMINAÇÃO DE pH

Os pHs das amostras foram determinados diretamente através de pHmetro marca Analyzer pH300.

3.6.5. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO CELULAR

O precipitado obtido no item 3.6.1. foi ressuspensionado em água destilada e centrifugado novamente em centrífuga Fanem a 6000 rpm por 15 minutos. Após o descarte do líquido sobrenadante as células foram novamente lavadas e centrifugadas nas mesmas condições acima. Posteriormente, foram secas em estufa à vácuo a 62 °C por 24 horas.

A massa seca da bactéria foi determinada pela diferença de peso entre o tubo com as células secas e o tubo vazio, previamente tarado.

3.6.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACTASE

As células do item 3.6.1 foram ressuspensionadas em 50 ml de água destilada. Um ml desta suspensão foi adicionada a 5 ml de ONPG e incubadas em banho a 45 °C por 10 minutos. Em seguida, a enzima foi inativada em banho a 100 °C. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm.

Um ml de sobrenadante do item 3.6.1 foi adicionado a 5 ml de ONPG, incubado em banho à 45 °C por 1 hora e inativado em banho a 100 °C . A absorbância foi medida como descrito acima.

3.7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

3.7.1. DETERMINAÇÃO DE K_m e V_{max}

Para este estudo, utilizou-se uma suspensão de células obtidas de uma fermentação em erlenmeyers, conforme descrito no item 3.5.1

Usou-se mini-reatores nas temperaturas de 20°C, 23°C, 25°C, 27°C e como substrato usou-se ONPG nas concentrações 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mM. Retirou-se amostras de 10 em 10 minutos para uma posterior análise de atividade enzimática.

Usou-se o modelo matemático de Michaelis-Mentem na forma de Lineweaver-Burk para determinação de K_m e V_{max} .

3.7.2 DETERMINAÇÃO DE K_d e E_d

Suspensões de células foram incubadas a diferentes temperaturas (45, 47, 49 e 50°C). De cada amostra incubada, após atingir a referida temperatura, tomava-se a primeira amostra considerada como inicial ($t = 0$). Tomou-se em sequência, amostras em espaços de tempo apropriados. Para cada amostra retirada, procedia-se a análise de atividade enzimática (item 3.6.6).

Com os dados de atividade em relação ao tempo de incubação para cada temperatura e considerando-se cinética de 1ª ordem , determinou-se as constantes de desativação K_d , graficando-se $\ln (A/A_0)$ em função do tempo de reação. Após determinação de K_d e sendo $K_d = f (t)$, determinou-se a energia de desativação E_d , graficando-se estes dados na forma da equação de Arrhenius.

3.8. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA

Para este experimento usou-se suspensões de células obtidas de erlenmeyers, incubados a diferentes pHs (4 a 10) por 20 minutos em um banho a 45°C. Posteriormente, foi medida a atividade da enzima (item 3.6.6) a fim de se determinar a estabilidade da enzima relativa ao pH de incubação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FERMENTAÇÃO EM ERLLENMEYERS

Foram feitas fermentações em erlenmeyers de 500 ml (item 3.5.1) e obteve-se resultados referentes a melhor concentração de lactose para a produção de lactase e os valores de pH e temperatura de incubação que apresentaram máxima atividade da enzima. Analisou-se também, o efeito da suplementação do meio com asparagina na atividade da enzima.

4.1.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA ATIVIDADE DE LACTASE.

A TABELA 4.1 mostra valores de atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado suplementado com 5 g/l de extrato de levedura, determinada utilizando células integrais conforme item 3.6.6 de Materiais e Métodos.

A concentração de lactose no meio de cultura variou de 20 a 70 g/l e a concentração que apresentou a melhor atividade de lactase (227,90 UI/mg de células) foi de 55 g/l, a melhor produção de massa celular seca (2,5310 g/l) foi na concentração de 50 g/l e o maior consumo de lactose (47%) foi obtido na concentração de 40 g/l .

As figuras 4.1 e 4.2 mostram as curvas de atividade de lactase por ml de meio de cultura e específica respectivamente, utilizando ONPG como substrato. Em ambas as figuras observa-se que na concentração de 40 g/l de lactose houve uma queda na produção de lactase, porém sua atividade aumentou para concentrações mais altas de lactose no meio de cultura. A atividade específica apresentou uma queda quando a concentração de lactose era 50 g/l, porém sua atividade era maior que com 40 g/l de lactose. Como observado em experimentos preliminares, a *Erwinia aroideae* produz lactase intra e extracelular. A lactase extracelular atua no meio de cultura,

hidrolisando lactose e produzindo glicose e galactose. A glicose, por sua vez, inibe a produção de lactase, como observado por MAGASANIK (1970) citado por DICKSON & MARKIN (1980), o que justifica os picos de atividade, pois quando a sua concentração no meio de cultura é alta, as células novas consomem-na preferencialmente, sendo por isso células ou desprovidas de lactase ou com baixa atividade de lactase intracelular

TABELA 4.1. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* NRRL B-132 cultivada em soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura (5g/l) em função da concentração de lactose.*

Concentração de lactose (g/l)	MCS (g/l de meio)	Atividade (UI/ml de meio)	Atividade específica (UI/mg de células)	Concentração residual de ART (g/l)	Porcentagem de consumo de ART (%)
20	1,85	268,20	144,60	12,14	40
30	2,11	301,38	142,86	18,58	38
35	2,33	318,59	136,53	19,29	45
40	2,30	296,47	129,16	21,34	47
45	2,14	376,34	175,62	29,72	33
50	2,53	399,69	158,06	34,64	30
55	1,90	434,10	227,90	36,88	32
60	2,07	394,78	190,58	39,19	34
65	1,90	340,71	178,87	42,22	35
70	2,14	392,18	183,08	47,32	32

*Fermentações realizadas em 12 horas a 30°C e 200 rpm.

UI = μ M de ONPG/min

MCS: massa celular seca

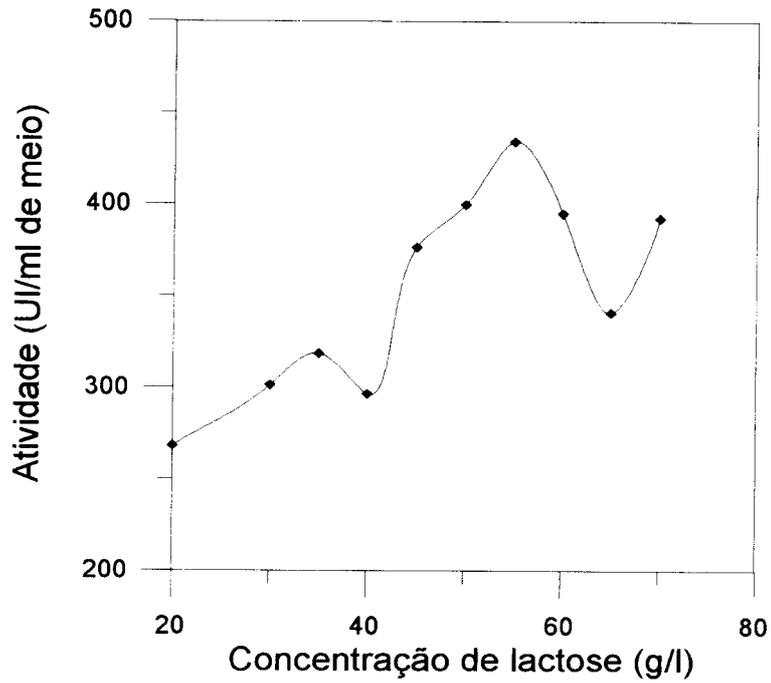


FIGURA 4.1. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função da concentração de lactose no meio de cultura. Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

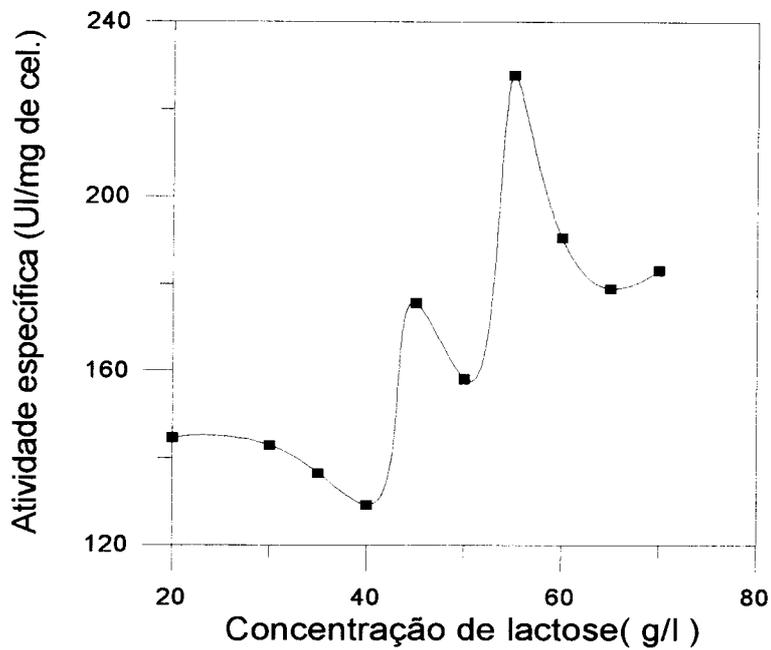


FIGURA 4.2. Atividade específica de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função da concentração de lactose no meio de cultura. Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

4.1.2. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA ENZIMA

As FIGURAS 4.3 e 4.4 e TABELA 4.2 mostram os valores de atividade de lactase em ONPG (ítem 3.6.6 de Material e Métodos) em função do pH de incubação. Nota-se que a medida que aumentou-se o pH de incubação houve um aumento na atividade de lactase (UI/ml, FIGURA 4.3 e 4.4) até o valor limitante de 7,5 a partir do qual a atividade começou a decrescer. Em pH 8,5 a atividade reduziu-se a 44,53% e em pH 7,0 a 77,58% da atividade em pH 7,5, razão pela qual este valor de pH foi selecionado para ensaios posteriores de atividade.

KUBY & LARDY (1953) analisando as propriedades de β -D-galactosidase de *Escherichia coli* K-12 obtiveram a máxima atividade enzimática na faixa de pH 7,2 a 7,3 usando ONPG como substrato.

RAO & DUTTA (1977) produziram β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* em soro de queijo desproteinado e obtiveram valores ótimos de atividade enzimática na faixa de pH 6,5 a 7,5 com substrato ONPG.

GREENBERG & MAHONEY (1982) obtiveram a melhor atividade em pH 7,1 na produção de β -galactosidase por *Streptococcus thermophilus* B3641.

4.1.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA ENZIMA

A enzima obtida das fermentações em erlenmeyers (ítem 3.5.1) foi incubada a diferentes temperaturas e observou-se que a temperatura que apresentou atividade mais elevada foi de 45°C (44UI/ml de meio e 104,78 UI/mg de células). Estes resultados podem ser comprovados pelas FIGURAS 4.5 e 4.6 e TABELA 4.3. A 50°C a atividade (UI/ml) teve uma redução de 10% e a 35°C de 14% comparado com o valor de 45°C, sendo a faixa de 40 a 50°C onde observou-se os maiores valores de atividade.

WIERZBICKI & KOSIKOWSKI (1973) no estudo de lactase por bactérias obtiveram atividade enzimática ótima na faixa de 30 a 50°C.

Valores de temperatura ótima de 40°C para a atividade de lactase foram relatados por RAO & DUTTA (1977) quando estudaram a produção de β -galactosidase por *Streptococcus thermophilus* em soro de queijo desproteinado.

TABELA 4.2 Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado suplementado com 5 g/l de extrato de levedura em função do pH.*

pH	Atividade (UI/ml de meio)	Atividade específica (UI/mg de célula)	Porcentagem em relação a atividade máxima (%)
4.0	0	0	0
4.5	5,81	2,44	2,58
5.0	10,85	4,55	4,82
5.5	23,75	9,97	10,54
6.0	46,60	19,57	20,69
6.6	103,87	43,62	46,11
7.0	174,78	73,90	77,58
7.5	225,28	94,61	100,00
8.0	199,48	83,78	88,55
8.5	100,31	42,13	44,53

*Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

UI = μ M de ONPG/ min

TABELA 4.3. Valores de atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado suplementado com 5 g/l de extrato de levedura em função da temperatura de incubação.*

Temperatura (°C)	Atividade (UI/ml de meio)	Atividade específica (UI/mg de cél.)	Porcentagem em relação a atividade máxima (%)
25	26,30	62,63	59,77
30	28,67	68,28	65,16
35	37,73	89,85	85,75
40	41,99	99,98	95,43
45	44,00	104,78	100,00
50	40,00	95,25	90,00
55	31,24	74,39	71,00

* Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm

UI = μ M de ONPG/min.

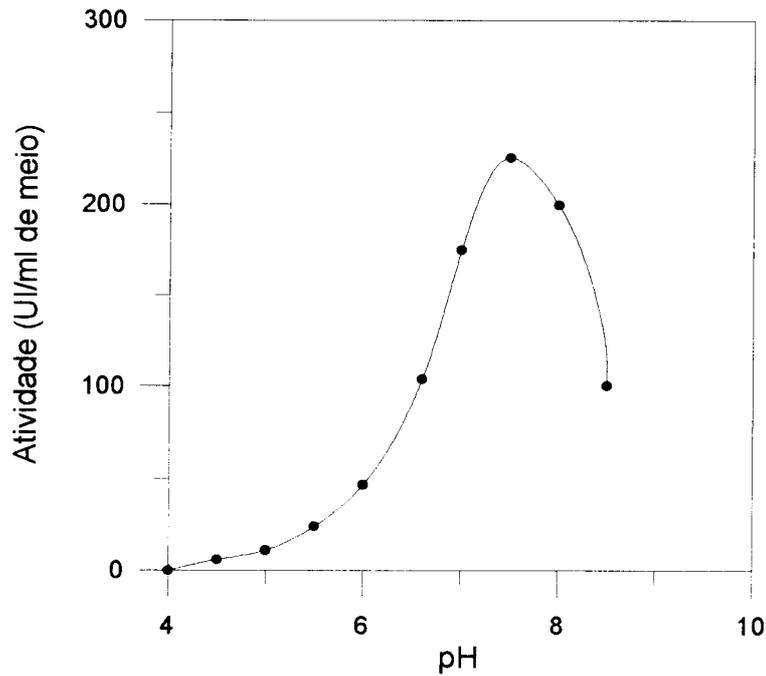


FIGURA 4.3. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função do pH de incubação. Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

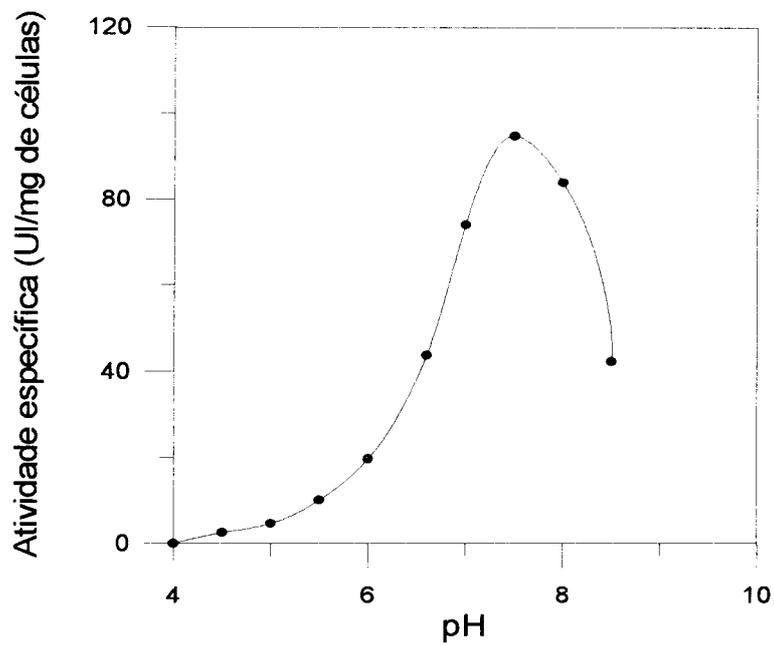


FIGURA 4.4. Atividade específica de lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo desproteinado em função do pH de incubação. Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

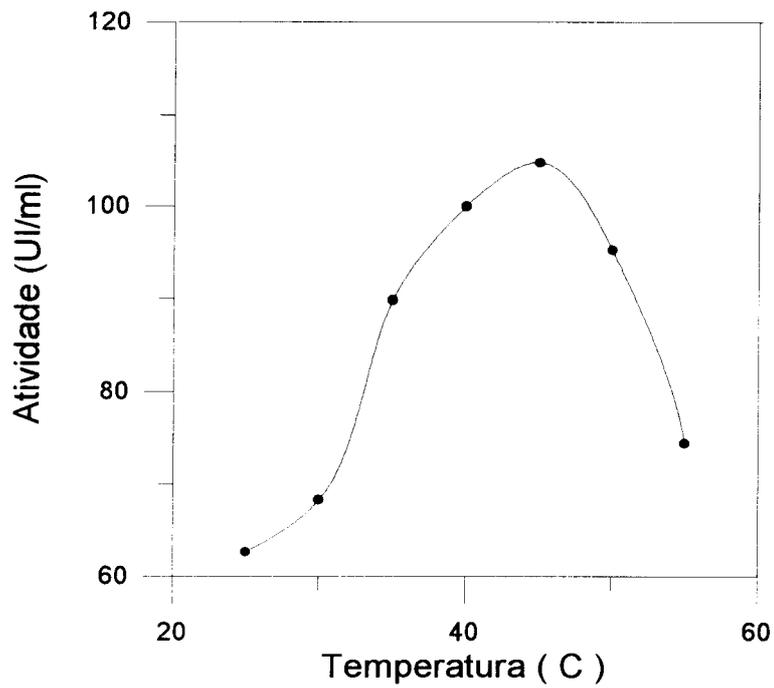


FIGURA 4.5. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado em função da temperatura de incubação. Fermentação em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

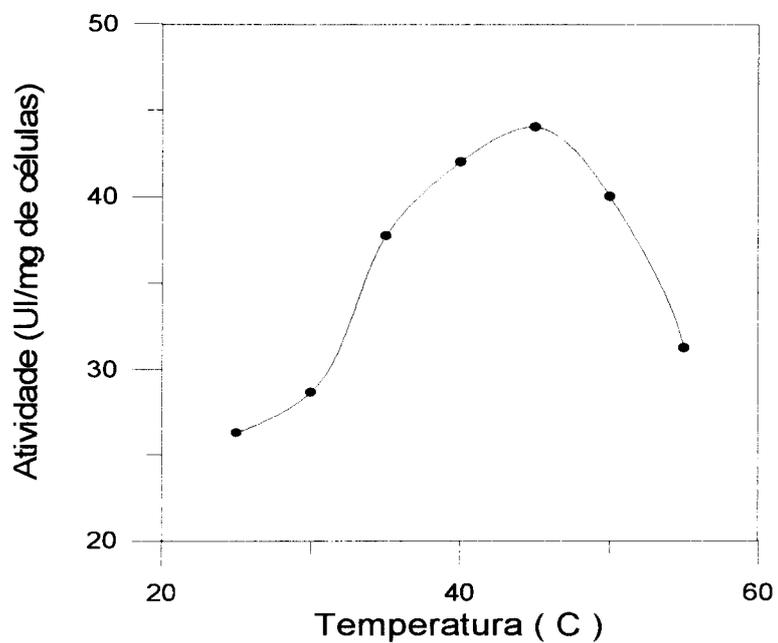


FIGURA 4.6. Atividade específica de lactase de *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado em função da temperatura de incubação. Fermentações em erlenmeyers por 12 horas a 30°C e 200 rpm.

4.1.4. SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM ASPARAGINA

Erwinia aroideae é conhecido como um dos microorganismos produtores de L-asparaginase em presença de lactose, cuja produção aumenta com a presença de L-asparagina até a concentração máxima de 8 g/l, conforme observado por Minin (1992). Assim, suplementou-se o meio de cultura com 8 g/l de L-asparagina a fim de observar seu efeito na produção de lactase. Pela TABELA 4.4 pode-se verificar que a adição de asparagina no meio aumentou a atividade da enzima intracelular em 15 % e na enzima extracelular de 202 %, mostrando a importância deste composto na produção da enzima.

TABELA 4.4. Atividade de lactase de *Erwinia aroideae* com e sem asparagina usada como suplemento do meio de soro de queijo desproteinado e extrato de levedura a 30°C, 200 rpm. Fermentações em erlenmeyers.

Meio	Atividade nas células (UI/ml de meio)	Atividade no sobrenadante (UI/ml de meio)
Com asparagina	76,27	3,21
Sem asparagina	66,25	1,06

4.2. EXPERIMENTOS EM FERMENTADOR

Com o fim de aumentar a produção da enzima, utilizou-se um fermentador marca Biolafitte modelo 6 litros no qual foram realizadas fermentações em diferentes temperaturas (25, 27, 30, 32 e 35°C) utilizando soro de queijo integral e desproteinado suplementado com 5 g/l de extrato de levedura, taxa de aeração de 1 vvm e 350 rpm.

4.2.1. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE LACTASE

4.2.1.1. FERMENTAÇÃO A 25°C

A TABELA A1 do Apêndice A e as FIGURAS 4.7 a 4.9 mostram os resultados da fermentação de soro de queijo desproteinado a 25°C. Pode-se notar que a massa celular seca não atingiu a fase de crescimento estacionário em 12 horas de fermentação (FIGURA 4.8) e o consumo lactose foi de apenas 21,5%. Estes resultados demonstram a necessidade de um tempo maior de fermentação a fim de completar o processo de produção de lactase nesta temperatura. O pH aumentou até a quarta hora atingindo o valor de 7,46 a partir do qual houve uma queda até a oitava hora permanecendo praticamente inalterado por volta de 5,90, até a décima segunda hora quando a fermentação foi interrompida.

A lactase extracelular atuando no meio de cultura produziu glicose, cuja concentração atingiu 0,92 g/l na décima hora de fermentação, apresentando porém oscilações, que são resultado da somatória da concentração de glicose produzida pela lactase e seu consumo pela bactéria. Observa-se que até a quarta hora de fermentação, tanto a atividade de lactase intracelular como extracelular não eram tão altas, quando o pH do meio em fermentação coincidia com o pH ótimo da enzima (FIGURA 4.8 e TABELA 4.2). A partir da quarta hora de fermentação, o pH caiu rapidamente, reduzindo a atividade da lactase, o que induziu a produção da enzima nas horas posteriores de fermentação. A melhor atividade intracelular foi na décima primeira hora de fermentação (64,26 UI/ml de meio) e da enzima extracelular foi na sexta hora de fermentação (30,47 UI/ml de meio). Observando-se as curvas de atividade nas células e no sobrenadante (FIGURA 4.7) nota-se que o comportamento da enzima extra e intracelular foi praticamente idêntico, onde ambas apresentaram picos de atividade na sexta hora de fermentação. Na enzima extracelular a atividade volta a crescer a partir da sétima hora de fermentação e na enzima intracelular a partir desta hora permanece praticamente inalterada. Na sexta hora de fermentação observou-se um pico de atividade da enzima e como o pH ainda não atingira valor para reduzir demasiadamente sua atividade, observou-se alta concentração de glicose, consequência da atividade enzimática neste pH (6,87) e da maior produção de enzima.

Observou-se pela FIGURA 4.9 que o inóculo tinha atividade específica de lactase alta, que reduziu-se rapidamente nas horas iniciais de fermentação. Na sexta hora, de forma semelhante (FIGURA 4.7.), observou-se um pico de atividade, porém enquanto a atividade total aumentou a partir da sétima hora de fermentação, a atividade específica nas células e sobrenadante, apresentou uma ligeira queda até o tempo de doze horas.

Comparando as fermentações com soro desproteinado e soro integral (FIGURA 4.10) observou-se que as curvas de produção tiveram comportamento semelhante, porém quando foi usado soro integral obteve-se valores maiores de atividade. Na fermentação usando soro integral teve-se a desvantagem da proteína precipitar no meio após a esterilização o que impediu a determinação de massa celular seca e a elevada turbidez do meio preparado impediu a determinação de atividade da enzima extracelular (no sobrenadante), porém a presença de proteínas no meio de cultura permitiram produzir maior concentração de lactase.

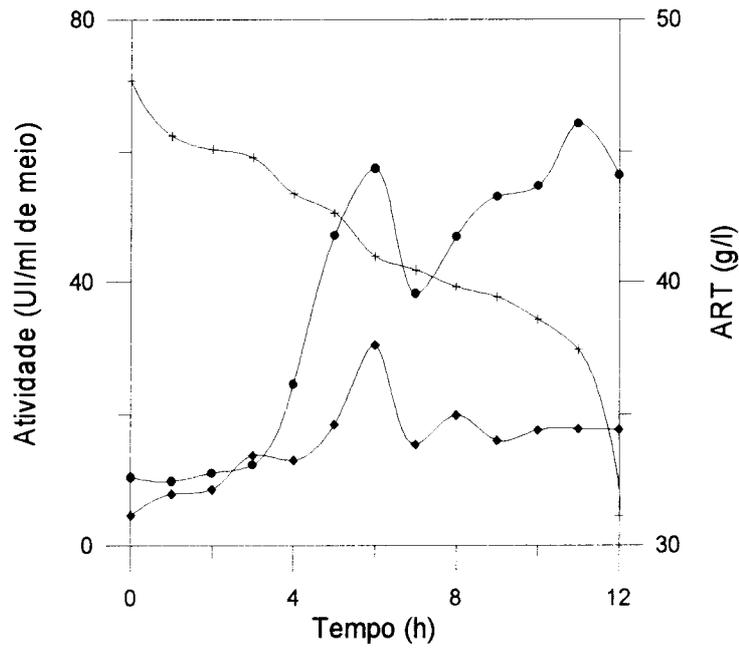


FIGURA 4.7 Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25°C, 350 rpm e 1 vvm. - (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante, (+) ART residual.

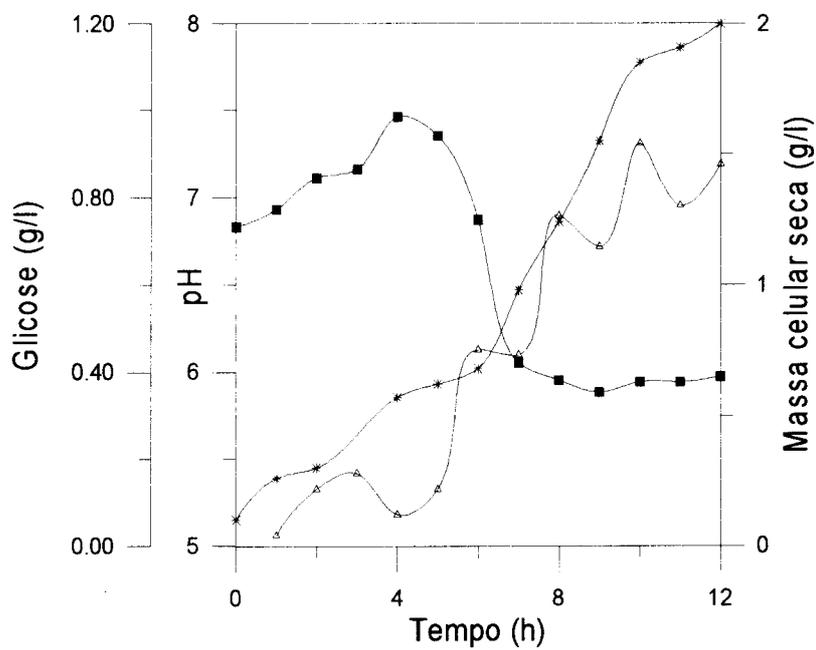


FIGURA 4.8 Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25°C, 350 rpm e 1vvm. (■) pH, (Δ) concentração de glicose (*) massa celular seca

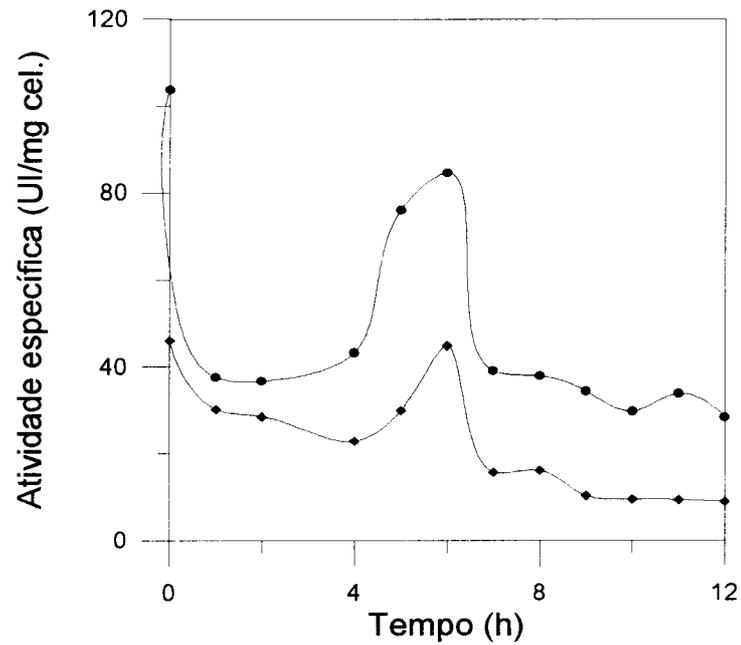


FIGURA 4.9. Atividade específica de lactase de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25 °C, 350 rpm e 1 vvm. (●) atividade nas células (◆) atividade no sobrenadante.

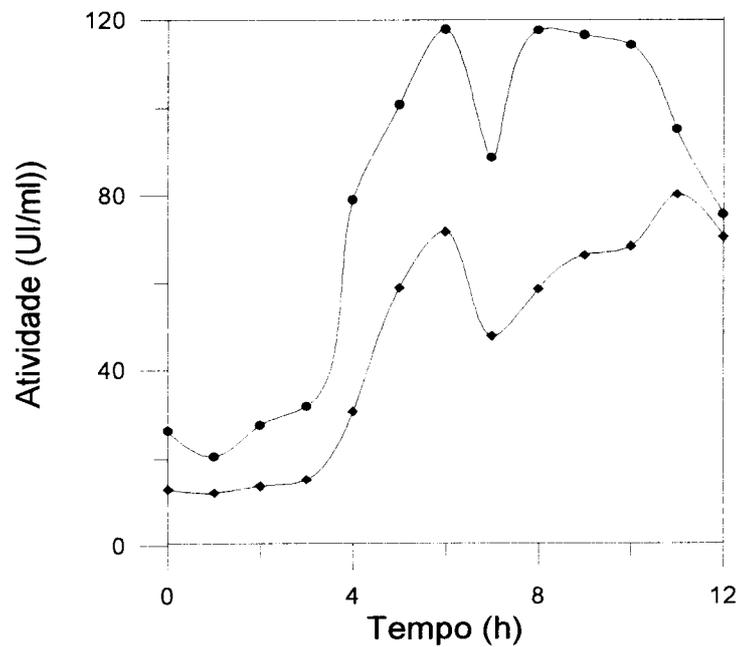


FIGURA 4.10. Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 25°C, 350 rpm e 1vvm. (●) com soro integral (◆) com soro desproteinado

4.2.1.2. FERMENTAÇÃO A 27°C.

As FIGURAS 4.11 a 4.13 e TABELA A2 do Apêndice A mostram os resultados da fermentação de soro de queijo desproteinado a 27°C. Observa-se que não foi atingida a fase de crescimento celular estacionário em 12 horas de fermentação e o consumo de lactose, comparado com ao da fermentação a 25°C, aumentou em 11,83% (sendo de 33,33% a 27°C). O pH aumentou até a quinta hora de fermentação atingindo o valor de 7,26 (FIGURA 4.12), decrescendo em seguida até o tempo de 8,5 horas a partir da qual permaneceu praticamente constante (5,85).

A presença de glicose no meio de cultura só foi observada após a sexta hora e sua concentração máxima (0,36 g/l) foi atingida na décima hora. Na sexta hora observou-se o pico de atividade de lactase intracelular (FIGURA 4.11), diminuindo em seguida até a décima hora, quando voltou a aumentar. O pico de atividade de lactase extracelular ocorreu uma hora mais tarde, isto é, na sétima hora quando o pH atingiu o valor de 6,34.

Comparando os resultados das fermentações a 25°C e 27°C (FIGURAS 4.7, 4.8 e 4.11, 4.12) observou-se que a 25°C a concentração de glicose no meio era maior do que a 27°C, o mesmo acontecendo com a atividade de lactase (intra e extracelular), mostrando que embora a enzima tivesse atividade menor a 27°C a bactéria consumiu glicose mais rapidamente. Após o pico de atividade da enzima (FIGURA 4.7 e 4.11) observou-se que a 27°C a curva de atividade de lactase intracelular teve comportamento diferente da sua recíproca a 25°C, mostrando valores de atividade menores, inclusive atividade específica (FIGURAS 4.9.e 4.13). A FIGURA 4.13 mostra que a 27°C a atividade específica extracelular máxima (47,92 UI/mg de células na quinta hora) foi pouco maior que a atividade específica intracelular máxima (43,65 UI/mg de células na sexta hora).

A FIGURA 4.14 mostra valores de atividade de lactase de fermentação de soro de queijo integral e desproteinado. Novamente observou-se que soro integral permitiu obter valores maiores de atividade enzimática. Comparando os resultados de atividade de soro integral a 27°C e a 25°C (FIGURAS 4.14 e 4.10, respectivamente), observou-se que a 27°C houve maior produção de lactase, porém com soro desproteinado ocorreu o contrário, isto é, a produção de lactase foi maior a 25°C.

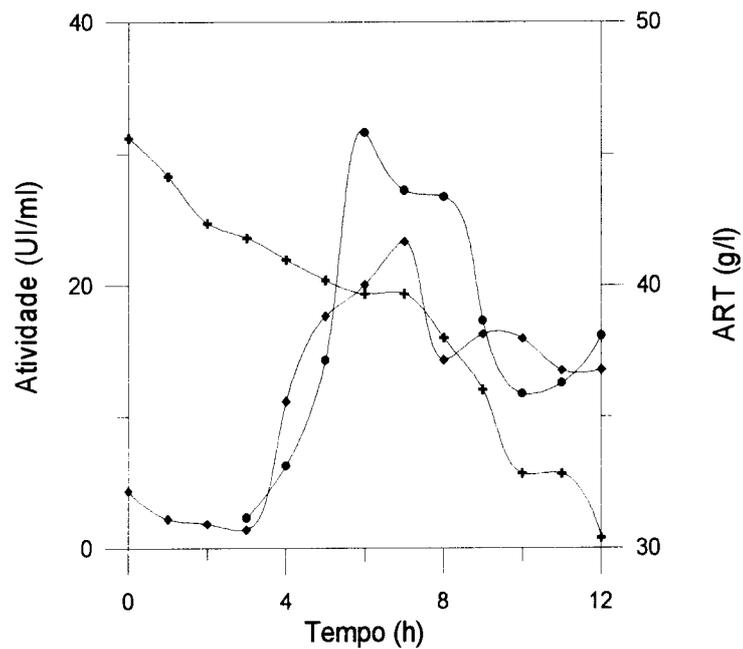


FIGURA 4.11. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 27°C, 350 rpm e 1 vvm. (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante, (+) ART residual.

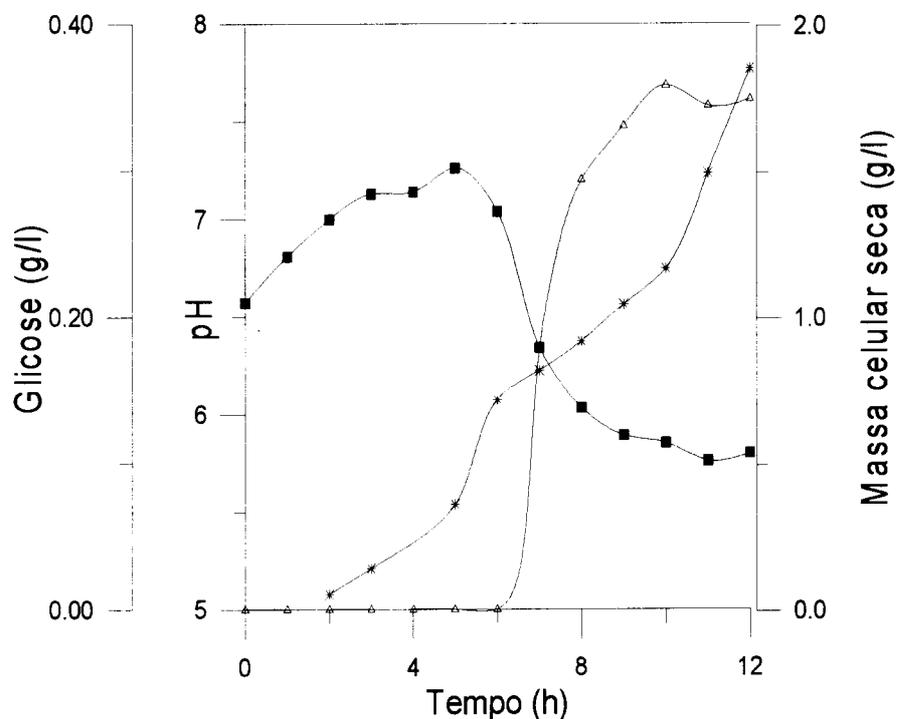


FIGURA 4.12. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 27°C, 350 rpm e 1 vvm - (■) pH, (Δ) concentração de glicose, (*) massa celular seca.

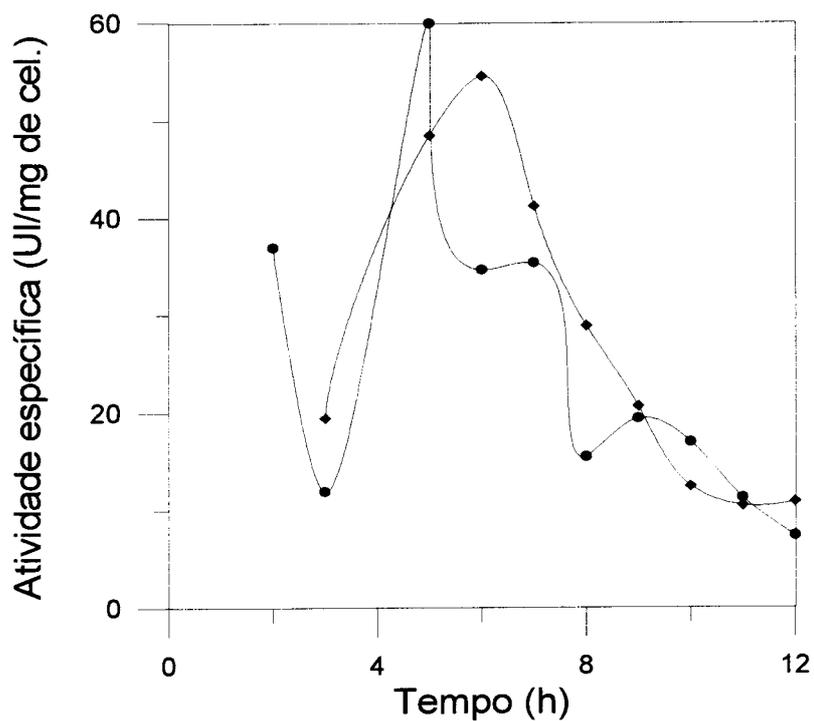


FIGURA 4.13. Atividade específica de lactase de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 27°C. (●) nas células, (◆) no sobrenadante.

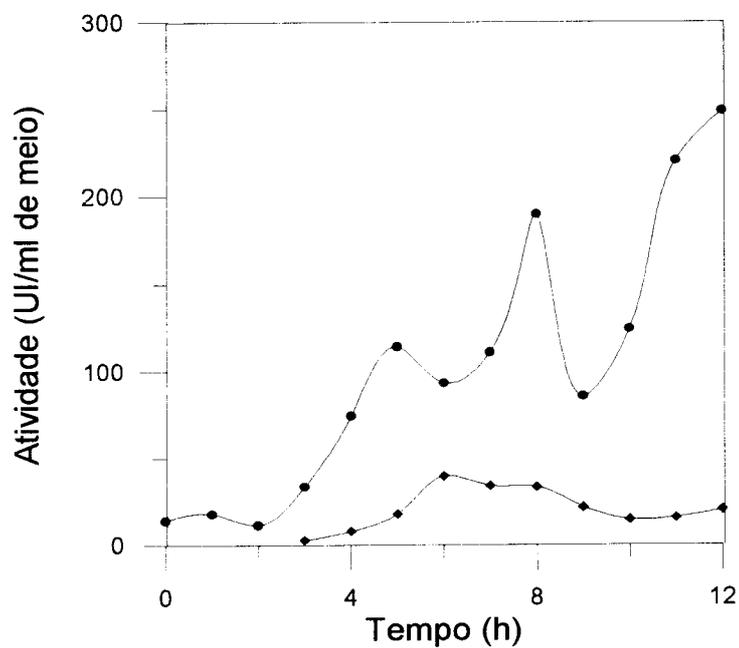


FIGURA 4.14. Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 27°C, 350 rpm e 1vvm. (●) com soro integral, (◆) com soro desproteinado.

4.2.1.3. FERMENTAÇÃO A 30°C

As FIGURAS 4.15 a 4.17 e TABELA A3 do Apêndice A mostram os resultados da fermentação de soro de queijo desproteinado a 30°C. Observa-se que o crescimento celular não apresentou fase estacionária em 12 horas de fermentação e o consumo de lactose foi de 63,74%. A curva de pH (FIGURA 4.16) mostrou o mesmo comportamento observado anteriormente, isto é, o pH aumentou até a quarta hora atingindo o valor de 6,90 a partir da qual decresceu até a oitava hora, oscilando em torno de um valor médio de 5,60. A concentração de glicose permaneceu constante até a quarta hora de fermentação, aumentando em seguida, atingindo a concentração de 0,59 g/l em doze horas. O primeiro pico de atividade de lactase intracelular (50,81 UI/ml de meio) ocorreu na oitava hora e extracelular (45,70 UI/ml de meio) na nona hora. A curva de atividade intracelular mostrou comportamento semelhante a sua recíproca a 27°C (FIGURA 4.11), isto é, apresentou apenas um pico de atividade, diminuindo nas horas finais de fermentação. Embora na oitava hora o pH estivesse ao redor de 5,7, pouco menor que na FIGURA 4.12 (6,0), a concentração de glicose no meio era mais alta que a 27°C, pois houve maior produção da enzima.

A máxima atividade da enzima intracelular atingida nesta temperatura foi na décima segunda (108,30 UI/ml de meio) e da enzima extracelular foi na nona hora (45,70 UI/ml de meio)

Quanto a atividade específica observa-se que o pico máximo da enzima intracelular foi na décima segunda hora de fermentação (57,54 UI/mg de cel.) coincidindo com o pico de atividade total e na enzima extracelular foi na oitava hora (55,96 UI/mg de cel.).

Comparando as fermentações com soro integral e com soro desproteinado (FIGURA 4.18) obteve-se valores mais elevados para a atividade enzimática na fermentação com soro integral, como observado a 25°C e 27°C

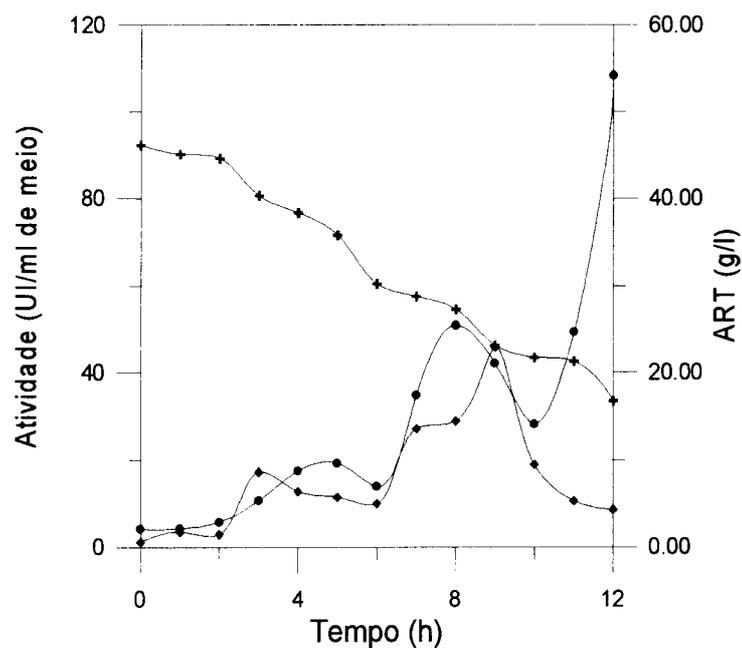


FIGURA 4.15. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm. (●) atividade nas células (◆) atividade no sobrenadante, (+) ART.

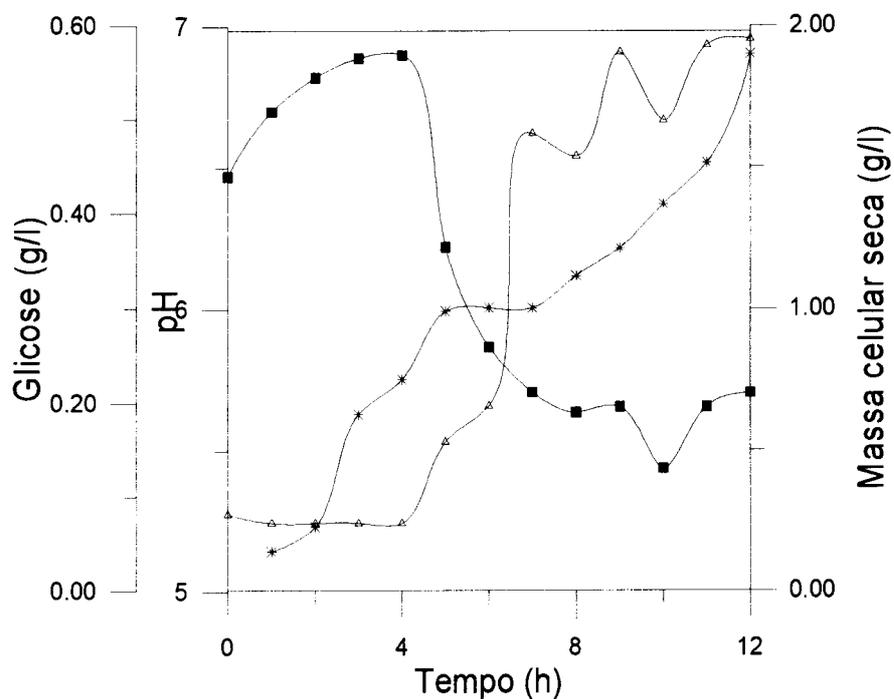


FIGURA 4.16. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 30°C. - (■) pH, (Δ) concentração de glicose, (∗) massa celular seca.

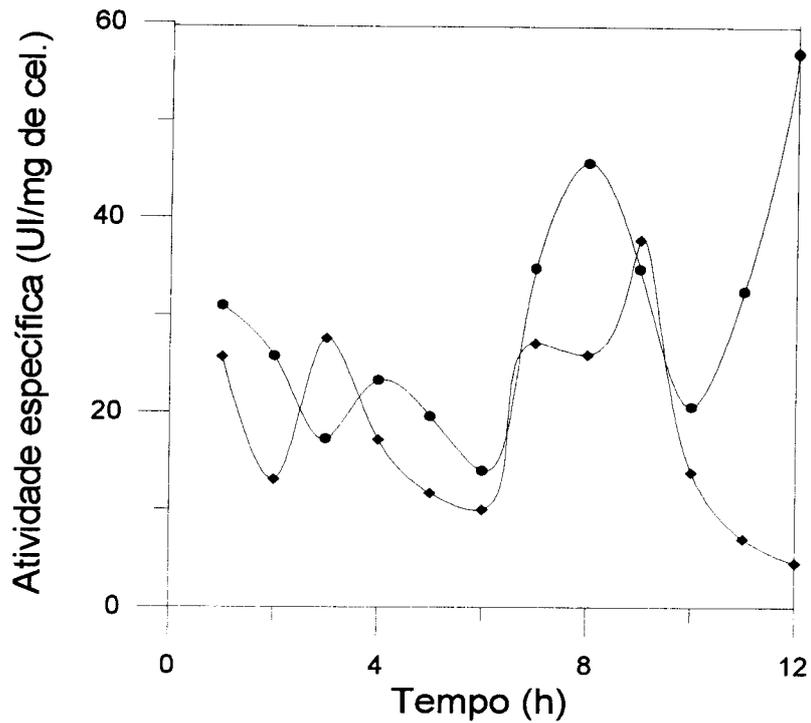


FIGURA 4.17. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm. (●) atividade nas células (◆) atividade no sobrenadante.

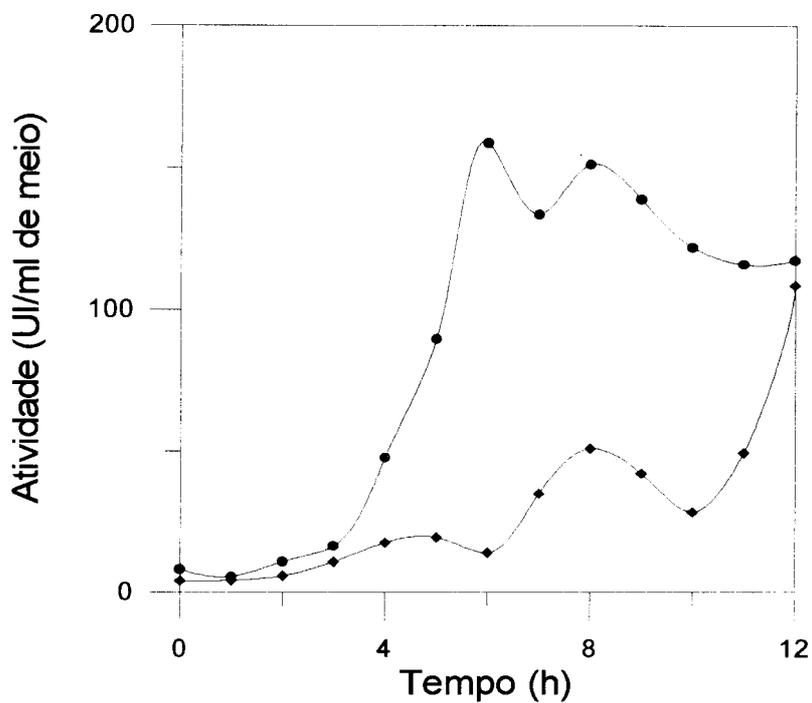


FIGURA 4.18. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm. (●) com soro integral, (◆) com soro desproteínado.

4.2.1.4. FERMENTAÇÃO A 32°C

As FIGURAS 4.19 a 4.21 e TABELA A4 do Apêndice A mostram os resultados da fermentação de soro de queijo desproteinado a 32°C. Observa-se nesta temperatura a fase estacionária de crescimento celular que foi atingida a partir da nona hora com uma concentração média de massa celular seca de 1,56 g/l . O consumo de lactose foi o maior encontrado comparado com as fermentações anteriores (77,90%). O pH aumentou até a segunda hora (6,90) e a partir deste tempo decresceu até a nona hora; permanecendo praticamente constante em 5,48. Somente a partir da quinta hora que observa-se a presença de glicose no meio de cultura, cuja concentração máxima ocorreu na quinta hora, 0,29 g/l, menor que a concentração máxima de glicose nas fermentações a 25, 27 e 30°C.

A máxima atividade da enzima intracelular observada ocorreu na sexta hora (133,18 UI/ml de meio) e para a enzima extracelular na quinta hora (28,41 UI/ml), sendo que antes e após estes picos, tanto a atividade intra e extracelular apresentaram valores inferiores as demais fermentações (25, 27 e 30°C).

Em relação a atividade específica nota-se que tanto nas células como no sobrenadante o pico de atividade ocorreu na segunda hora de fermentação (605,00 UI/mg e 347,57 UI/mg) quando a massa celular seca era ainda muito pequena. A atividade intracelular apresentou outro pico na sexta hora (107,40 UI/mg de células), a partir do qual reduziu-se até o final da fermentação. A atividade do sobrenadante decresceu continuamente a partir da segunda hora, atingindo 5,22 UI/mg na sétima hora e oscilando em torno de 2,00 UI/mg no final da fermentação. A curva de massa celular seca mostra que a cultura atingiu a fase de crescimento exponencial na terceira hora de fermentação e os picos de atividade, em UI/ml de meio, ocorreram nesta fase de crescimento, mostrando que embora a atividade específica fosse pequena, houve grande multiplicação celular, aumentando a atividade enzimática.

Nesta temperatura (32°C), comparando com as demais fermentações (25, 27 e 30°C) os valores de atividade da enzima extra e intracelular apresentaram uma diferença marcante, sendo que a atividade da enzima extracelular foi bem menor do que a enzima intracelular.

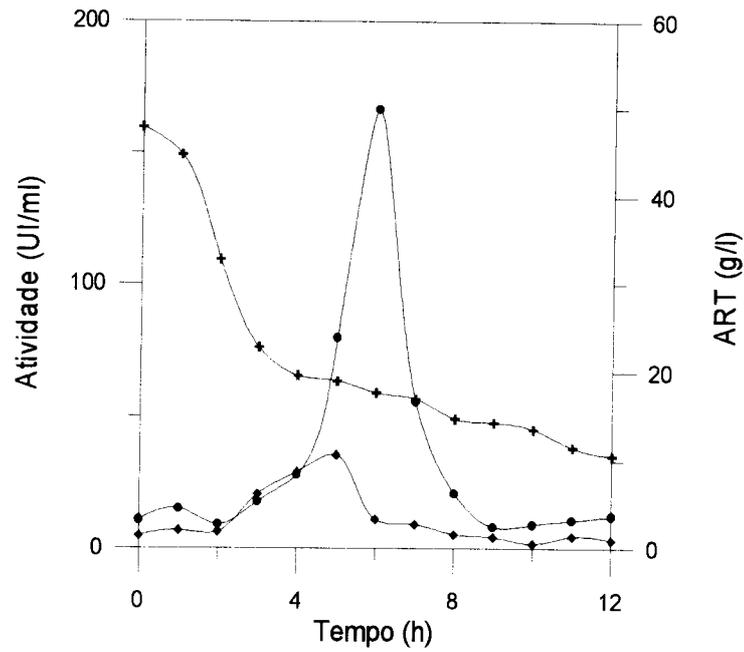


FIGURA 4.19. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 32 °C, 350 rpm e 1vvm (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante, (-+-) ART residual.

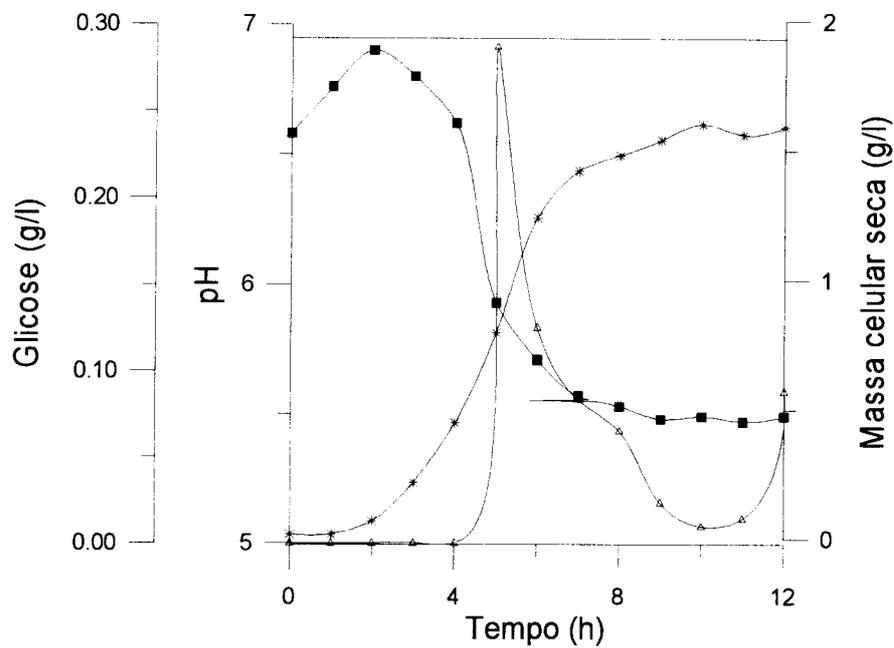


FIGURA 4.20. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 32°C, 350 rpm e 1vvm.-(■) pH, (Δ) concentração de glicose, (*) massa celular seca.

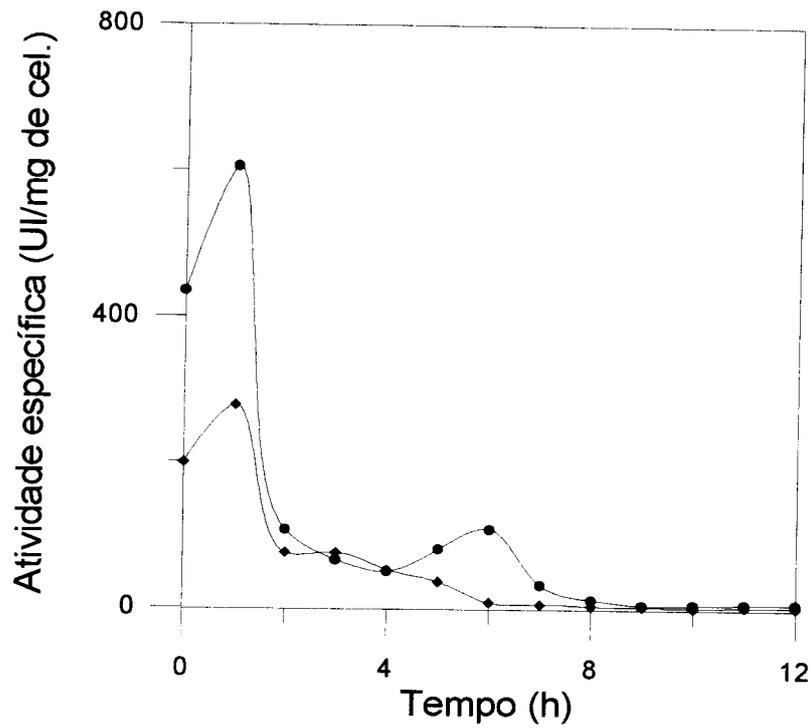


FIGURA 4.21. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 32 °C, 350 rpm e 1vvm. (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante.

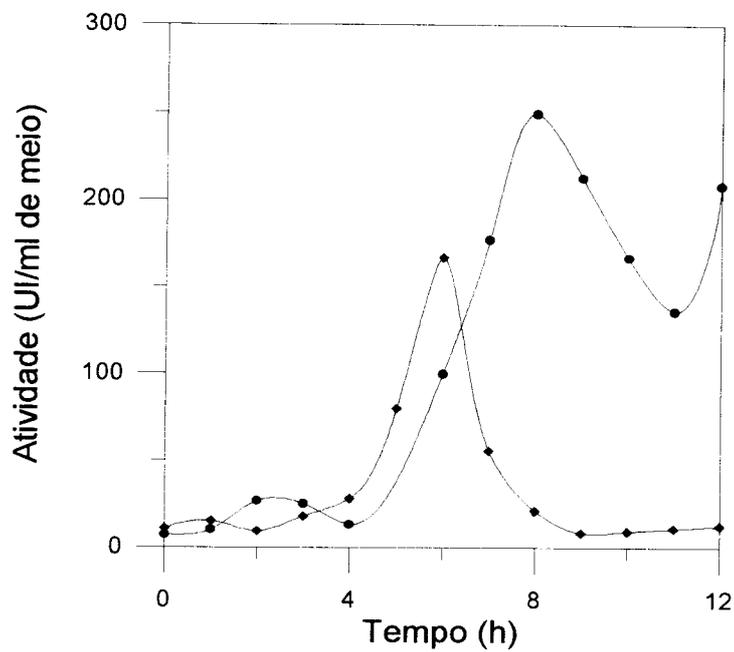


FIGURA 4.22. Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 32°C, 350 rpm e 1vvm. (●) com soro integral (◆) com soro desproteinado.

4.2.1.5. FERMENTAÇÃO A 35° C

As FIGURAS 4.23 a 4.25 e TABELA A5 do Apêndice A mostram os resultados de fermentação de soro de queijo desproteinado a 35°C. Observa-se que nesta temperatura houve uma redução da atividade da enzima, comparados com os valores atingidos nas outras fermentações, indicando que houve inibição da produção da enzima nesta temperatura. O pH começou a cair já a partir da segunda hora quando atingiu o valor de 6,58 e da sétima hora em diante permaneceu praticamente inalterado oscilando em torno de 4,80.

Na terceira e quinta horas observou-se picos de atividade de lactase extra (11,36 UI/ml de meio) e intracelular (34,91 UI/ml de meio) respectivamente, ocasionando acúmulo de glicose no meio de cultura na quarta hora, cuja concentração máxima atingiu o valor de 0,24 g/l. Ambas atividades permaneceram baixas a partir da sexta hora de fermentação, quando a cultura já havia atingido a fase de crescimento estacionário. As atividades específicas intra (27,27 UI/mg) e extracelular (26,67 UI/mg) apresentaram picos na quinta e segunda hora de fermentação respectivamente, permanecendo em valores bastante baixos a partir da sexta hora até o final da fermentação

A FIGURA 4.26 mostra que a 35°C a produção de lactase foi maior quando utilizou-se soro de queijo integral.

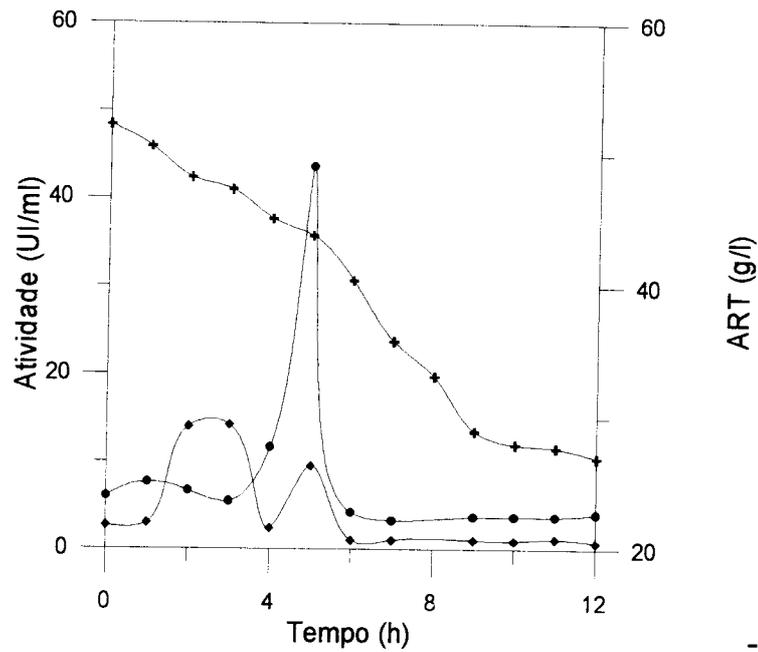


FIGURA 4.23. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 35°C, 350 rpm e 1vvm. (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante, (+) ART residual.

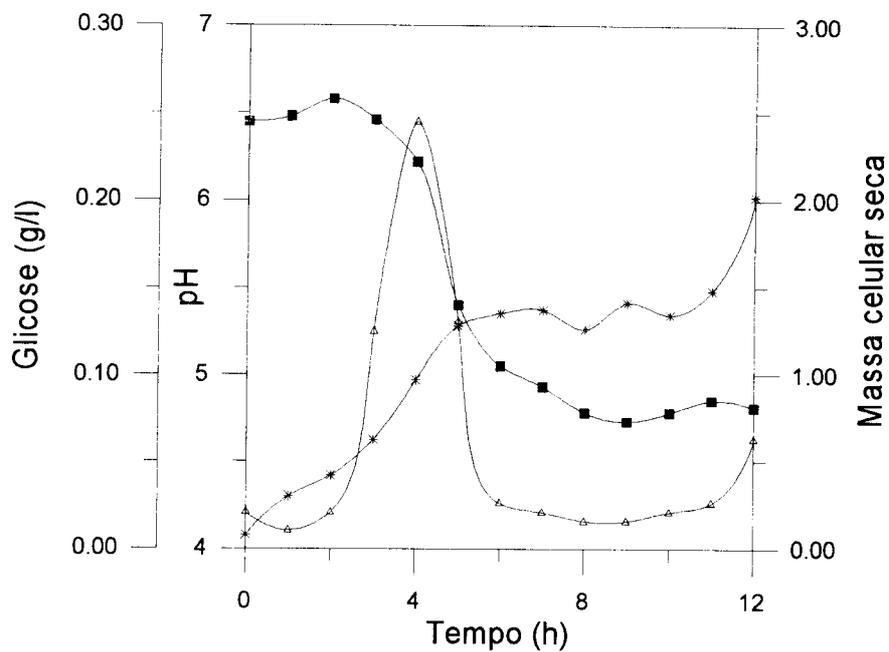


FIGURA 4.24. Fermentação de soro de queijo desproteínado por *Erwinia aroideae* a 35 °C. (■) pH, (Δ) concentração de glicose, (*) massa celular seca.

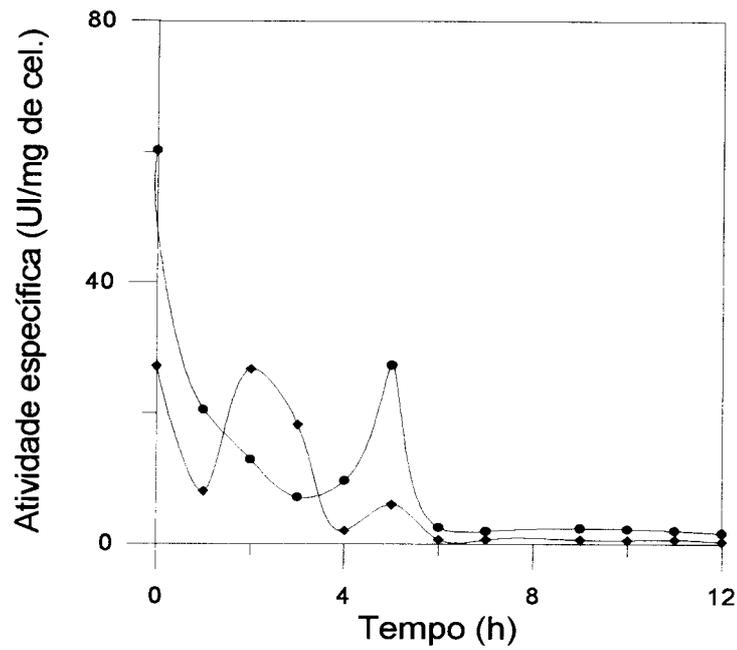


FIGURA 4.25. Fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 35°C, 350 rpm e 1vvm (●) atividade nas células (◆) atividade no sobrenadante

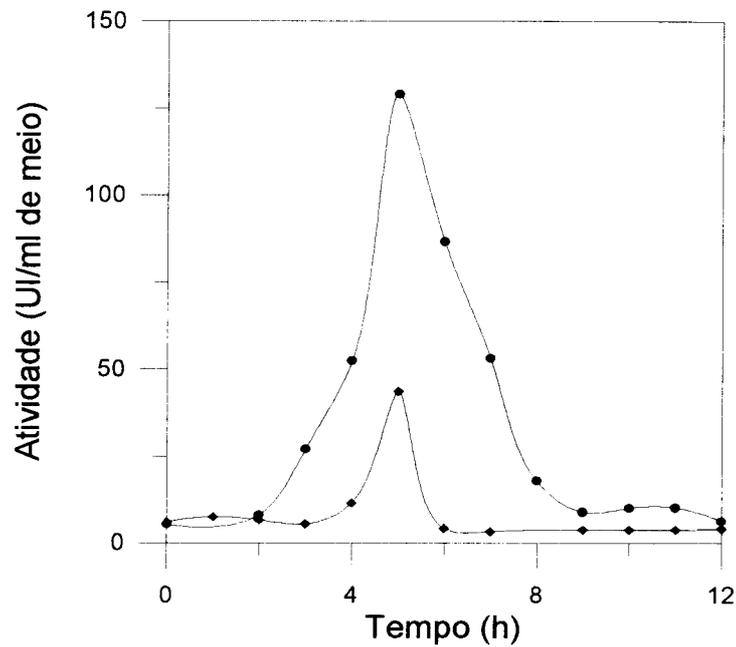


FIGURA 4.26. Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 35°C, 350 rpm e 1vvm. (●) com soro integral (◆) com soro desproteinado.

A TABELA 4.5 mostra que a temperatura em que obteve-se os melhores valores de atividade nas células foi a de 32°C na sexta hora de fermentação. Para a enzima extracelular, obteve-se os maiores valores a 30°C na nona hora de fermentação. A 35°C houve inibição da produção de lactase. Na maioria da fermentações os picos de atividade apresentaram-se por volta da sexta hora de fermentação o que leva a crer que este é o tempo ideal para a atividade máxima da enzima. GRAY et alii (1972) estudaram a cinética da produção de β -galactosidase por *Escherichia coli*. Investigaram a influência da temperatura e obtiveram as menores atividades da enzima intracelular a 25°C, enquanto que na faixa de 35 a 42 °C a diferença de atividades máximas intra e extracelular obtidas foi praticamente insignificante, sendo indiferente a escolha da temperatura de produção, nesta faixa.

TABELA 4.5 Valores máximos de atividade de lactase total e específica obtidas nas diferentes temperaturas de fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae*.*

Temperatura (°C)	Atividade (UI/ml de meio)		Atividade específica (UI/mg de células)	
	Células	Sobrenadante	Células	Sobrenadante
25	64,26 (11 ^a)	30,47 (6 ^a)	84,47 (6 ^a)	44,81 (6 ^a)
27	31,65 (6 ^a)	23,31 (7 ^a)	43,96 (6 ^a)	47,76 (5 ^a)
30	108,30 (12 ^a)	45,77 (9 ^a)	57,00 (12 ^a)	37,77 (9 ^a)
32	133,18 (6 ^a)	28,41 (5 ^a)	107,40 (6 ^a)	75,00 (3 ^a)
35	34,91 (5 ^a)	11,36 (3 ^a)	27,27 (5 ^a)	26,67 (2 ^a)

() tempo de fermentação.

* Fermentações realizadas em 12 horas, 350 rpm e 1vvm.

UI = μ M de ONPG/min.

4.3. EFEITO DA GLICOSE ADICIONADA NO MEIO FERMENTATIVO

Para analisar o efeito da glicose na produção da enzima por *Erwinia aroideae* realizou-se fermentação a 30°C cuja composição do meio foi de 45 g/l de lactose, 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de glicose.

Pelas FIGURAS 4.27 a 4.29 e TABELA A6 do Apêndice A pode-se comprovar que a presença de glicose no meio inibiu a formação da enzima, sendo os valores de atividade de lactase intra e extracelular os menores obtidos (FIGURA 4.27). Acredita-se que o microorganismo consumiu preferencialmente glicose sempre que esta apareceu no meio de cultura, ou pela hidrólise da lactose, ou pela adição da glicose, o que explica os picos apresentados nas curvas de atividade enzimática intracelular e extracelular. MAGASANIK (1970) citado por DICKSON & MARKIN (1980), explicou o efeito inibidor da glicose no estudo da síntese de β -galactosidase por *Escherichia coli* e conclui que glicose poderia influenciar na produção da enzima de três maneiras: 1) Por exclusão do indutor, quando a presença de glicose impede a entrada de lactose nas células impedindo, desse modo, a indução por lactose; 2) Por repressão catabólica de carbono (repressão permanente), quando a presença de glicose em células induzidas reduz a taxa diferencial da síntese de β -galactosidase pela metade; 3) Por repressão transiente, quando a taxa inicial de β -galactosidase de células induzidas é inibida por glicose.

DICKSON & MARKIN (1980) verificaram repressão catabólica de carbono transiente quando produziram β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis*.

Observando-se a FIGURA 4.30 e TABELA A6 do Apêndice A pode-se concluir que a presença de glicose no meio de cultura, provavelmente causou uma repressão catabólica.

O pH decresceu da primeira hora (6,67) até o valor de 5,16 na sétima hora, oscilando em torno deste valor até o final da fermentação

A FIGURA 4.30 e TABELA A7 do Apêndice A compara a atividade de lactase de *Erwinia aroideae* em meio com e sem glicose a 30°C.

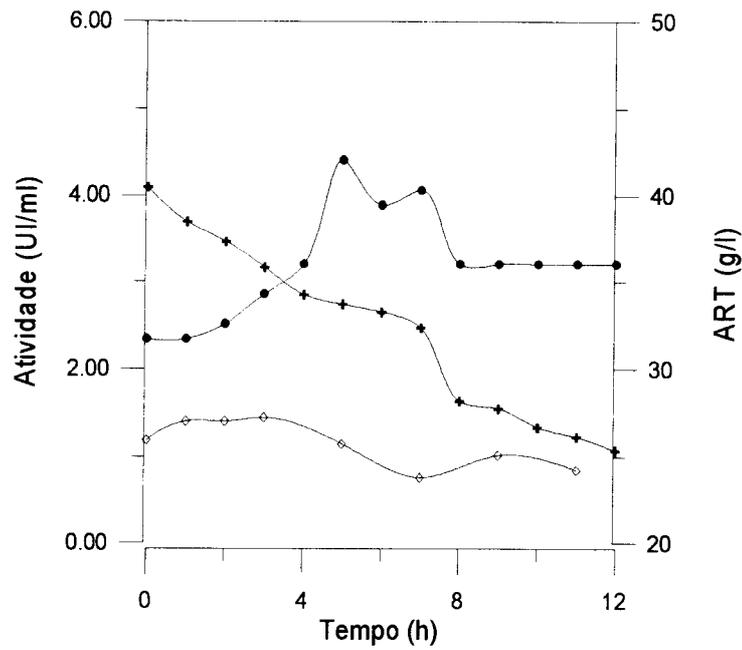


FIGURA 4.27. Fermentação de soro de queijo desproteinado suplementado com glicose (10g/l) por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm. (●) atividade nas células, (◆) atividade no sobrenadante (+) ART residual.

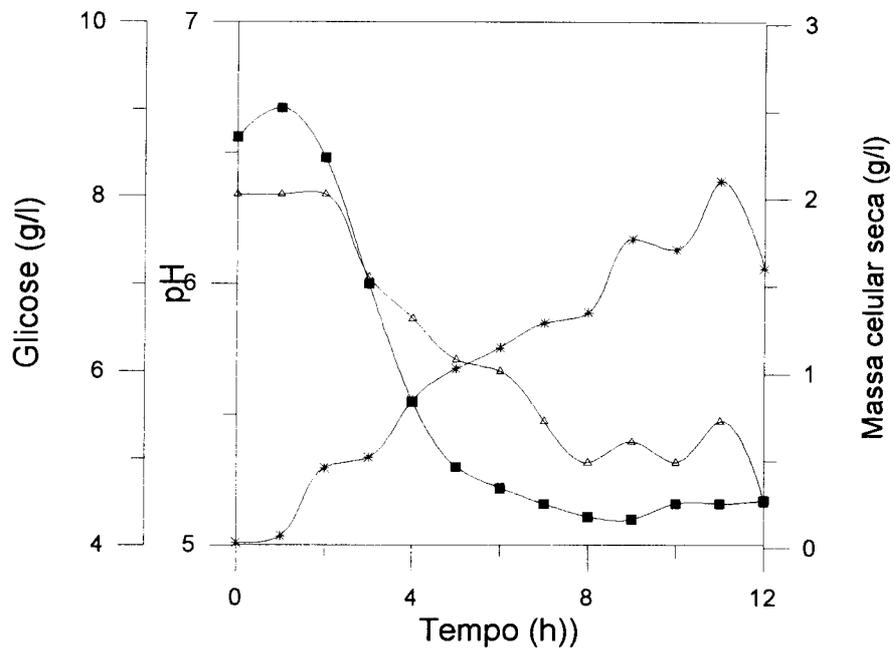


FIGURA 4.28. Fermentação com soro de queijo desproteinado suplementado com glicose (10g/l) por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm (■) pH, (Δ) concentração de glicose, (*) massa celular seca.

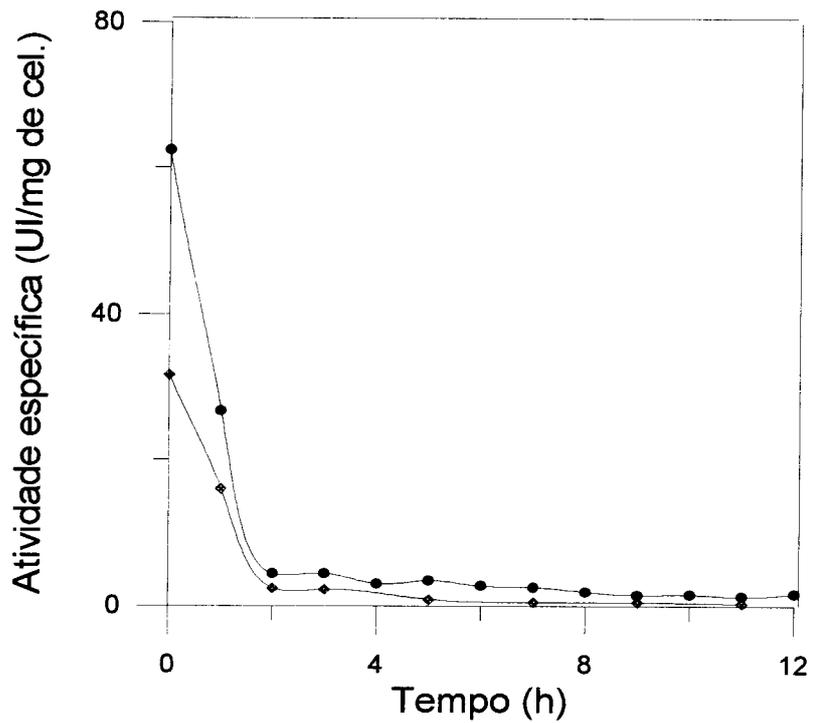


FIGURA 4.29 Fermentação de soro de queijo desproteinado suplementado com glicose (10 g/l) por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm (●) nas células, (◆) no sobrenadante

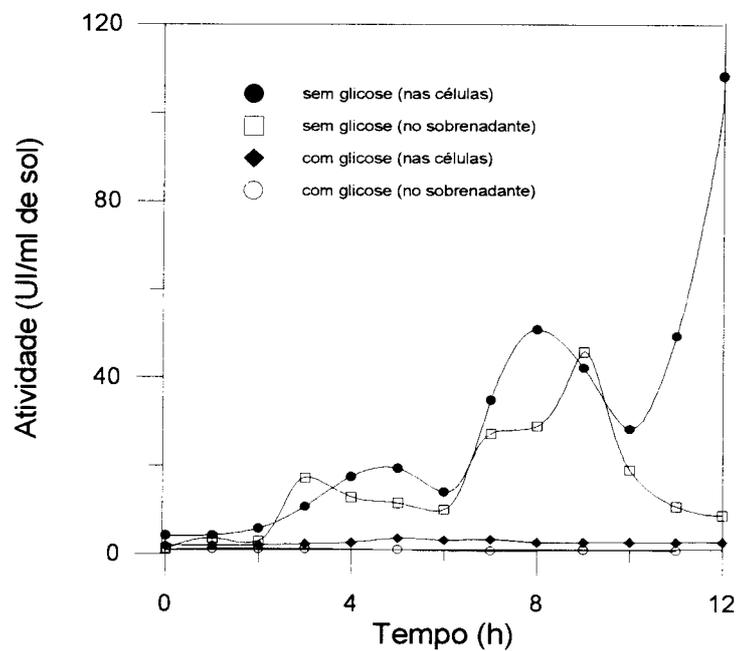


FIGURA 4.30 Comparação da fermentações de soro de queijo desproteinado com e sem glicose por *Erwinia aroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm.

4.4. DETERMINAÇÃO DE Km e Vmax

Para determinação da cinética de reação de hidrólise de ONPG por lactase de *Erwinia aroideae* (item 3.7.1 de Materiais e Métodos) usou-se o modelo matemático de Michaelis-Mentem, utilizando para isto o gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk (SEGEL,1979), equação abaixo:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

Os resultados da hidrólise de ONPG encontram-se nas TABELAS B1 a B4 e FIGURAS B1 a B4 do Apêndice B.

A TABELA 4.6 mostra a variação de Km com a temperatura da reação. Observa-se que a 27°C obteve-se o menor valor de Km, indicando que nesta temperatura a enzima tem melhor afinidade pelo substrato, justificando o fato de que nesta temperatura a bactéria produziu menor atividade de lactase do que a 25 e 30°C (FIGURAS 4.7, 4.11 e 4.15)

TABELA 4.6 Constante de Henri-Michaelis-Mentem para reação de hidrólise de ONPG por lactase de *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo.

Temperatura (°C)	Km (mM)
20	3,46
23	3,62
25	3,85
27	0,60

Para os valores de Vmax obtivemos : 130,46 mM/ml. min.; 71,07 mM/ml min.; 67,43 mM/ml min.; 61,00 mM/ml min. para as temperaturas de 20°C, 23°C, 25°C e 27°C, respectivamente.

Em testes preliminares, fez-se ensaios para determinação de K_m na faixa de temperatura de 30 a 45°C porém, a 30°C já houve grande evaporação do fenol formado da reação com o substrato ONPG o que gerou resultados não confiáveis. Nestas condições, a 30°C obteve-se o valor de K_m de 0,35 mM.

Não observou-se reação de hidrólise quando usou-se solução de lactose pela β -galactosidase produzida por *Erwinia aroideae*. Este fato, provavelmente, ocorre pela rápida perda de atividade na enzima extracelular. Já na enzima intracelular, acredita-se que a parede da célula não é permeável a lactose o que impede a reação.

Para a determinação de energia de ativação (E_a) utilizou-se apenas as temperaturas de 20, 23 e 25°C. A 27°C o valor de K_m diminuiu, mostrando maior afinidade da enzima pelo substrato. Com os valores de K_m construiu-se a curva $\log K$ versus $1/T$ (FIGURA 4.35) e obteve-se, pelo coeficiente angular da reta o valor de $E_a = 3,84$ Kcal/mol K

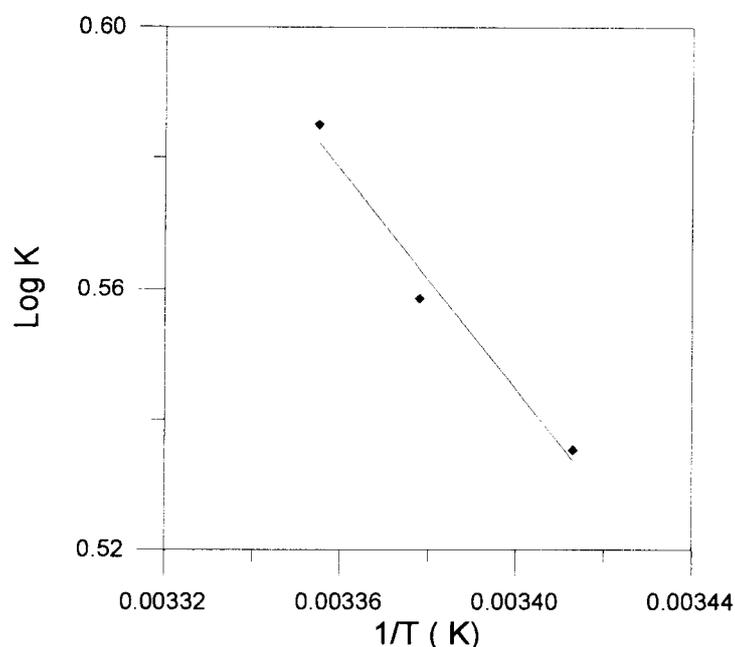


FIGURA 4.31. Ajuste dos dados experimentais da constante K_m em função da temperatura.

4.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA

A cinética de inativação térmica da enzima foi feita conforme item 3.7.2 de Materiais e Métodos através da determinação das constante de desativação K_d e energia de desativação, E_d . Os resultados obtidos encontram-se nas TABELAS B5 a B8 e nas FIGURAS B5 a B8 do Apêndice B.

As TABELAS B5 a B8 (Apêndice B) mostram o decaimento com tempo de incubação da atividade enzimática. Considerando-se cinética de primeira ordem para a desativação térmica, os dados obtidos experimentalmente foram linearizados através da equação:

$$\ln (A/A_0) = -K_d t \quad (10)$$

onde:

K_d : constante de desativação da enzima (1/min)

t: tempo (min)

A: atividade enzimática (UI/ml)

A_0 : atividade enzimática inicial (UI/ml)

A TABELA 4.7 mostra que a constante de desativação térmica aumenta com o aumento da temperatura e o tempo de meia-vida se reduz. A 50°C, o tempo de meia vida é 25,50% do tempo de meia vida a 45°C, isto é, para um aumento de 5°C na temperatura de incubação, houve uma redução de 75% no tempo de meia vida.

TABELA 4.7. Valores de K_d em função da temperatura

Temperatura (°C)	K_d (1/min.)	Tempo de meia vida (min.)
45	0,0232	29,88
47	0,0476	14,56
49	0,0602	11,51
50	0,0909	7,62

Para a determinação da energia de desativação da enzima, usou-se o modelo de Arrhenius (FIGURA 4.32) e obteve-se o valor de 51,50 Kcal/mol

$$K_d = K \cdot \exp(-E_d/RT) \quad (11)$$

onde:

K_d = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

E_d = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (1,98 cal/g mol K)

T = temperatura absoluta (°K)

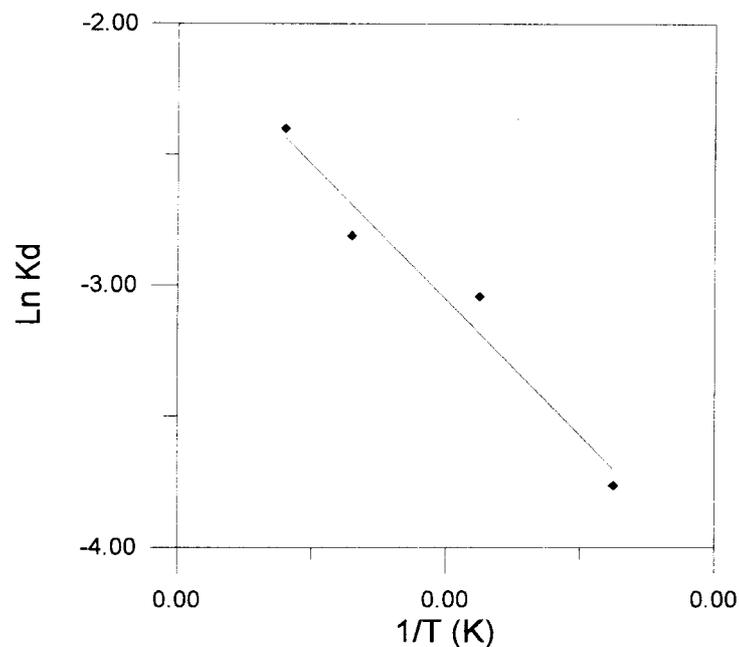


FIGURA 4.32 Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação K_d em função da temperatura.

Como resultados obteve-se os valores de K_d iguais a 23,20 mM; 47,60 mM; 60,20 mM e 90,90 mM nas temperaturas de 45, 47, 49 e 50°C, respectivamente.

Da FIGURA 4.32 obteve-se como resultado $E_d = 51,50$ Kcal/mol.

4.6. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA A 45°C

Realizou-se experimentos a fim de se descobrir o comportamento da enzima em relação ao pH de pré incubação. Pela FIGURA 4.33 e TABELA B9 do Apêndice B, nota-se que a enzima apresenta baixíssima estabilidade o que leva a concluir que deve-se trabalhar com a enzima na faixa ótima de pH (7,5 a 8,0).

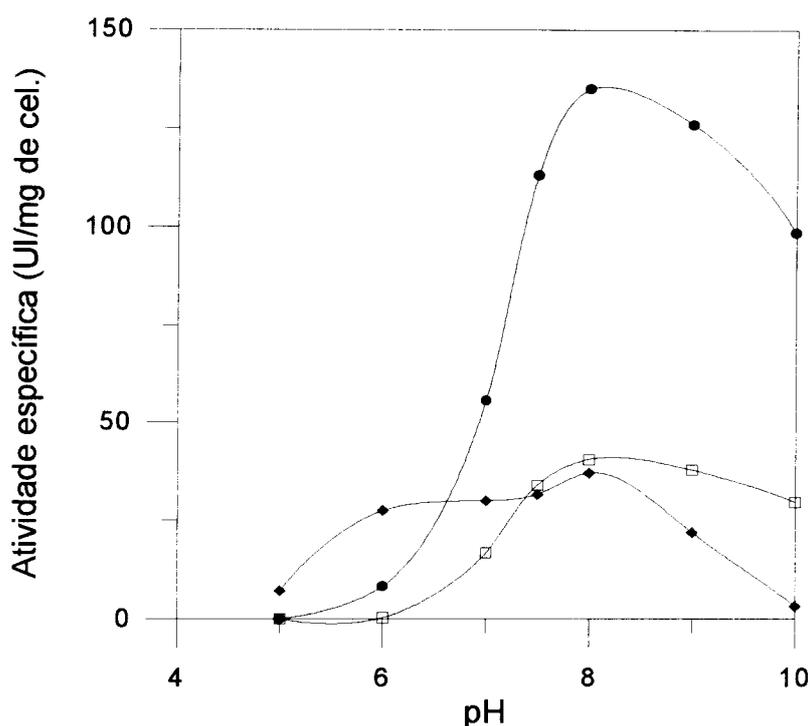


FIGURA 4.33 Efeito do pH na estabilidade de lactase. (●) Atividade em função do pH, (◆) Atividade quando pré-incubado por 20 minutos, (□) Atividade calculada pela equação 10.

A FIGURA 4.33 mostra as curvas de atividade a 45°C em função do pH. Nota-se que a curva da atividade calculada pela equação 10 apresenta a desativação da enzima somente em função da temperatura de 45°C. Observa-se, na curva de pH pré incubado por 20 minutos, que em valores baixos de pH (5 a 7) houve uma possível ativação pelo pH já que esperava-se valores mais baixos de atividade.5

5. CONCLUSÕES

- A concentração de lactose em soro desproteinado que permitiu obter a máxima atividade de lactase foi 55 g/l.

- A temperatura ótima para hidrólise de ONPG, utilizando células integrais, foi 45°C e o pH variou na faixa de 7,5 a 8,0.

- Suplementação de soro de queijo desproteinado com 8 g/l de asparagina aumentou a atividade de lactase extracelular em 202% e intracelular de 15 %.

- A temperatura de fermentação que permitiu obter a maior atividade de lactase extracelular foi 30°C e intracelular 32°C.

- O valor de K_m da lactase aumentou quando a temperatura aumentou de 20°C a 25°C, diminuindo em temperaturas maiores

- Em temperatura igual ou acima de 45°C a enzima é inativada e a constante de desativação aumentou com o aumento de temperatura.

- A produção de lactase por *Erwinia aroideae* é induzida por lactose e inibida por glicose mesmo na presença de lactose.

6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Estudo da influência da aeração, agitação e tempo de fermentação na produção da lactase por *Erwinia aroideae* em soro de queijo.

- Estudo da influência da concentração de L-asparagina adicionado ao meio de cultura na produção de lactase em fermentador por *Erwinia aroidea* em soro de queijo.

- Estudo da influência de íons adicionados ao meio de cultura na produção de lactase por *Erwinia aroideae* em soro de queijo.

- Estudo da influência de galactose adicionado no meio de cultura da produção de lactase por *Erwinia aroideae* em soro de queijo

- Extração e purificação da enzima β -galactosidase (intracelular) produzida por *Erwinia aroideae*

- Estudo do comportamento de desativação da enzima β -galactosidase produzida por *Erwinia aroideae* na faixa de 27 a 45°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, M.F.S.; SILVA, D.O.; PINHEIRO, A.J.R., GUIMARÃES, W.V. & BORGES, A.C. Production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey. Journal of Dairy Sciences, 9 (2): 10-14, 1985.
- BANERJEE, M; CHAKRABARTY, A. & MAJUMDAR, S.K. Immobilization of yeast cells containing β -galactosidase. Biotechnology and Bioengineering, 24: 1839-1850, 1982.
- BOUVY, F.A.M. Applications for lactase-treated whey. Food Product Development, 9 (2): 10-14, 1975.
- CASTILLO, F.J.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Lactase production in continuous culture by *Trichoderma Reesei* Rut C30. Biotechnology Letters, 6 (9): 593-596, 1984.
- CHANG, B.B. & MAHONEY, R.R. Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Journal of Dairy Research, 56: 117-127, 1989.
- CHEN, K.; LEE, T. & HOUNG, J. Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microbial Technology, 14 (8): 659-664, 1992.
- COWAN, D.A.; DANIEL, R.M.; MARTIN, A.M. & MORGAN, H.W. Some properties of a β -galactosidase from an extremely thermophilic bacterium. Biotechnology and Bioengineering, 24 (10): 1141-1145, 1984.
- DE BALES, S.A. & CASTILLO, F.J. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. Applied and Environmental Microbiology, 37 (6): 1201-1205, 1979.

- DICKSON, R.C. & MARKIN, J.S. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. Journal of Bacteriology, 142 (3): 777-785, 1980.
- DIXON, M.; WEBB, E.C.; THORNE, C.J.R. & TIPTON, K.F. Enzymes. 3 rd ed., London: Longman Group Limited, 1979.
- DURAN, G.A.O. & ANGELIS, R.C. Intolerância ou tolerância a produtos lácteos. Revista do ILCT, 40 (241): 17-30, 1985.
- ESPINOZA, P.; BÁRZANA, E.; GARIBAY, M.G. & RUIZ, L.G. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. Biotechnology Letters, 14 (11): 1053-1058, 1992.
- GOMEZ, A. & CASTILLO, F.J. Production of biomass and β -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. Biotechnology and Bioengineering, 25 (5): 1341-1357, 1983.
- GONZALEZ, J.B. & BERRY, D.R. Induction of β -galactosidase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Biotechnology Letters, 4 (6): 369-374, 1982.
- GOODMAN, R. E. & PEDERSON, D. M. β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Canadian Journal of Microbiology, 22 (6): 817-825, 1976.
- GRAY, P.P.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. Kinetics of β -galactosidase production by an constitutive mutant of *Escherichia coli*. Journal Fermentation Technology, 50(6): 381-387, 1972.
- GREENBERG, N.A. & MAHONEY, R.R. Production and characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Science, 47: 1824-1828, 1982.

- GRIFFITHS, M.W. & MUIR, D.D. Properties of a thermostable β -galactosidase from a thermophilic *Bacillus*: Comparison of the enzyme activity of whole cells, purified enzyme and immobilised whole cells. Journal Science Food Agriculture., 29 (9): 753-761, 1978.
- HEWITT, G.M. & GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous production of inulase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microbial Technology, 6: 263-270, 1984.
- KENNEDY, J.F. New York: VCH Publishers, 1987. vol 7a.
- KIESLICH, K. Biotechnology. Florida: Verlag Chemie Weinheim, 1984. v.6a.
- KOBAYASHI, T.; HIROSE, Y.; OHMIYA, K.; SHIMIZU, S. & UCHINO, F. Thermostable β -galactosidase from *Bacillus acidocaldarius* and its immobilization. Journal Fermentation Technology, 56 (4): 309-314, 1978.
- KU, M.A. & HANG, Y.D. Production of yeast lactase from sauerkraut brine. Biotechnology Letters, 14 (10): 925-928, 1992.
- KUBY, S.A. & LARDY, H.A. Purification and kinetics of β -galactosidase from *Escherichia coli* strain K-12. Journal of American Society, 75: 890-896, 1953.
- LOEWENSTEIN, M.; REDDI, M.B.; WHITE, C.H.; SPECK, S.J. & LUNSFORD, T.A. Using cottage cheese whey fractions or their derivatives in ice cream. Food Product Development, 9 (9): 91-95, 1975
- MACRIS, B.J. Production of a thermostable β -D-galactosidase by *Alternaria alternata* grown in whey. Applied and Environmental Microbiology, 44 (5): 1035-1038, 1982.
- MARTINEZ, S.B. & SPECKMAN, R.A. β -galactosidase treatment of frozen dairy product mixes containing whey. Journal of Dairy Science, 71 (4): 894-900, 1988.

- MININ, L. A. Contribuição ao estudo das condições de fermentação para produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae*. Campinas, UNICAMP, 1991, 105 p. Tese de Mestrado
- MUSTRANTA, A.; LINKO, M.; HARJU, M. & HEIKONEM, M. Production and use of lactase. Kemia-Kemi, 6: 306-308, 1979.
- NUNES, M.F.A.; MASSAGUER, S. & MONTE ALEGRE, R. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415. Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, 29 (1): 25-30, 1993.
- PARK, Y.K.; De SANTI, M.S.S. & PASTORE, G.M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Food Science, 44 (1): 100-103, 1979.
- PASTORE, G.M. & PARK, Y.K. Screening of high β -galactosidase producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. Journal of Food Science, 44: 1577-1579, 1979.
- POMAR, F.T.; MEINARDI, C.A. & CERENZA, C.A. Producción de beta-galactosidasa aprovechando suero de leche. Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 42: 89-98, 1977.
- POMERANZ, Y. Lactase (β -D-galactosidase) : I. Occurrence and properties. Food Technology, 18 (5): 88-93, 1964.
- POMERANZ, Y. Lactase (β -D-Galactosidase): II. Possibilities in the Food Industries. Food Technology, 18 (5): 96-103, 1964
- RAO, R.M.V. & DUTTA, S.M. Production of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. Applied and Environmental Microbiology, 34 (2): 185-188, 1977.

- RICHMOND, M.L.; GRAY, J.I. & STINE C.M. Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization. Journal of Dairy Science, 64 (9): 1759-1771, 1981.
- SABIONI, J. G.; PINHEIRO, A.J.R.; SILVA, D.O.; CHAVES, J. B.P. & BORGES, A.C. Control of lactose crystallization in "Dulce de leche" by beta-D-galactosidase activity from permeabilized *Kluyveromyces lactis* cells. Journal of Dairy Science, 67 (2): 2210-2215, 1984
- SEGEL, I.H. Bioquímica: Teoria e Problemas; Tradução de Denise Mattatia Grassiano. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 1979. 527p.
- SMART, J.B.; CROW, V.L. & THOMAS, T.D. Lactose hydrolysis in milk and whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 20: 43-56, 1985.
- SORENSEN, S.G. & CRISAN, E.V. Thermostable lactase from thermophilic fungi. Journal of Food Science, 39: 1184-1187, 1974.
- THOMAS, G.V.; KALRA, M.S. & SINGH, A. Studies on β -galactosidase production by *Kluyveromyces fragilis*. Indian Journal of Dairy Science, 37 (2): 133-136. 1984.
- THOMPSON, M.P. & BROWER, D.P. Hydrolyzed lactose cultured dairy products: I. Manufacture of cheddar cheese. Cultured Dairy Products Journal, _ (2): 22-23, 1976.
- WALLENFELS, K. & MALHOTRA, O.M. β -galactosidase. In: BOYER, P.D.; LARDY, H. & MYRBÄCK, K. The Enzymes, New York: Academic Press, 1960. cap 24, p.409-428.
- WIERZBICKI, L.E.; KOSIKOWSKI, F.V. Lactase potential of various microorganisms grown in whey. Journal of Dairy Science, 56 (1): 26-32, 1973.

WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2 ed. New York: Ellis Horwood Limited, 1987.

YOUNG, C.K.; STULL, J.W.; TAYLOR, R.R.; ANGUS, R.G. & DANIEL, T.C. Acceptability of frozen desserts made with neutralized hydrolysed, fluid cottage cheese whey. Journal of Food Science, 45 (4): 805-807, 1980.

APÊNDICE A

TABELA A1. Valores de atividade, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose da fermentação de soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 25 °C.*

Tempo	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg de cel.)		Massa celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	10,37	4,60	103,70	46,00	0,10	47,68	6,83	---
1	9,75	7,83	37,50	30,11	0,26	45,60	6,93	0,0237
2	10,99	8,52	36,63	28,40	0,30	45,10	7,11	0,1302
3	12,23	13,68	---	---	---	44,78	7,16	0,1657
4	24,62	12,96	43,19	22,74	0,57	43,39	7,46	0,0710
5	47,12	18,46	76,00	29,77	0,62	42,65	7,35	0,1302
6	57,44	30,47	84,47	44,81	0,68	40,98	6,87	0,4497
7	38,24	15,33	39,02	15,64	0,98	40,45	6,05	0,4379
8	46,91	19,84	37,83	16,00	1,24	39,81	5,95	0,7574
9	53,11	15,95	34,26	10,29	1,55	39,43	5,88	0,6864
10	54,76	17,57	29,60	9,50	1,85	38,58	5,94	0,9231
11	64,26	17,77	33,64	9,30	1,91	37,43	5,94	0,7811
12	56,41	17,67	28,20	8,83	2,0	31,12	5,97	0,8757

* Fermentações realizadas a 25 °C, 350 rpm e 1vvm.

TABELA A2. Valores de atividade de lactase, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação em soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 27 °C.*

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg a de cel.)		Massa celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	Células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	---	4,32	---	---	---	45,60	6,57	---
1	---	2,22	---	---	---	44,15	6,81	---
2	---	1,84	---	30,06	0,06	42,36	7,00	---
3	2,33	1,43	15,53	11,93	0,15	41,80	7,13	---
4	6,26	11,17	---	---	---	40,98	7,14	---
5	14,31	17,67	38,67	47,76	0,37	40,20	7,26	---
6	31,65	20,06	43,96	27,48	0,73	39,68	7,04	---
7	27,21	23,31	32,98	28,08	0,83	39,68	6,34	0,1789
8	26,69	14,33	28,85	15,41	1,41	38,00	6,03	0,2936
9	17,30	16,28	16,43	15,50	1,05	36,03	5,89	0,3303
10	11,73	15,95	9,98	13,57	1,18	34,83	5,85	0,3578
11	12,55	13,54	8,37	9,03	1,50	32,83	5,76	0,3440
12	16,16	13,58	8,73	7,32	1,86	30,40	5,80	0,3486

* Fermentações a 27°C, 350 rpm e 1vvm.

UI = μ M de ONPG/ min

TABELA A3. Valores de atividade de lactase, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação em soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 30 °C.*

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg a de cel.)		Massa celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	4,15	1,19	---	---	---	46,11	6,47	0,0820
1	4,26	3,54	30,43	25,28	0,14,	45,11	6,70	0,0720
2	5,80	2,94	25,22	12,78	0,23	44,63	6,82	0,0720
3	10,76	17,27	17,08	27,41	0,63	40,32	6,89	0,0720
4	17,47	12,86	23,29	17,15	0,75	38,35	6,90	0,0720
5	19,32	11,51	19,52	11,63	0,99	35,83	6,22	0,1586
6	13,96	10,00	13,96	10,00	1,00	30,22	5,87	0,1971
7	34,80	27,17	34,80	27,17	1,00	28,76	5,71	0,4856
8	50,81	28,91	45,77	26,04	1,11	27,26	5,64	0,4615
9	42,04	45,70	34,74	37,77	0,82	23,09	5,66	0,5721
10	28,21	18,94	20,59	13,82	1,37	21,71	5,44	0,5000
11	49,26	10,66	32,62	7,06	1,51	21,25	5,66	0,5800
12	108,30	8,65	57,00	4,55	1,90	16,72	5,71	0,5865

* Fermentação realizadas a 30°C, 350 rpm e 1vvm.

UI = μ M de ONPG/minuto

TABELA A4. Valores de atividade lactase, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação em soro de queijo desproteinado por *Erwinia aroideae* a 32 °C.*

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg de cel.)		Massa celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	8,70	3,98	435,00	199,00	0,02	47,86	6,58	---
1	12,10	5,56	605,00	278,00	0,02	44,78	6,76	---
2	7,46	5,22	106,57	74,57	0,07	32,83	6,90	---
3	14,17	16,50	60,41	75,00	0,22	22,80	6,80	---
4	22,32	23,19	49,60	51,53	0,45	19,60	6,62	---
5	63,72	28,41	79,65	35,51	0,80	19,00	5,93	0,290
6	133,18	8,95	107,40	7,22	1,24	17,66	5,71	0,125
7	44,41	7,42	31,27	5,22	1,42	16,95	5,57	0,083
8	16,74	4,39	11,31	2,97	1,48	14,75	5,53	0,064
9	6,35	3,53	4,12	2,29	1,54	14,33	5,48	0,023
10	7,35	1,52	4,59	0,95	1,60	13,56	5,49	0,009
11	8,59	3,69	5,50	2,36	1,56	11,50	5,47	0,013
12	9,83	2,58	6,18	1,62	1,59	10,54	5,49	0,088

* Fermentação realizadas a 32°, 350 rpm e 1vvm.

UI = μ M de ONPG/minuto

TABELA A5. Valores de atividade lactase, massa celular seca, lactose residual, pH e concentração de glicose na fermentação em soro de queijo por *Erwinia aroidea* a 35 °C.*

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg a de cel.)		Massa celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	4,83	2,17	60,37	27,13	0,08	52,25	6,45	0,0208
1	6,14	2,41	20,47	8,03	0,30	50,56	6,48	0,0104
2	5,38	11,20	12,81	26,67	0,42	48,23	6,58	0,0208
3	4,42	11,36	7,02	18,03	0,63	47,32	6,46	0,1258
4	9,31	1,95	9,60	2,01	0,97	45,11	6,22	0,2448
5	34,91	7,63	27,27	5,96	1,28	43,85	5,40	0,1302
6	3,39	0,85	2,51	0,63	1,35	40,45	5,05	0,0260
7	2,63	0,85	1,92	0,62	1,37	35,83	4,93	0,0208
8	---	---	---	---	1,26	33,17	4,78	0,0156
9	2,98	0,85	2,11	0,60	1,41	28,99	4,73	0,0156
10	2,98	0,78	2,22	0,58	1,34	27,99	4,78	0,0208
11	2,98	0,97	2,01	0,65	1,48	27,74	4,85	0,0260
12	3,25	0,61	1,61	0,30	2,02	26,97	4,81	0,0625

* Fermentação realizadas a 35°C, 350 rpm e 1vvm..

UI = μ M de ONPG/minuto

TABELA A6 Valores de atividade, massa celular seca, concentração residual de lactose, pH e concentração de glicose na fermentação em soro de queijo desproteinado suplementado com 10 g/l de glicose por *Erwinia aroideae* a 30°C.*

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)		Atividade específica (UI/mg de cel.)		Massa Celular seca (g/l)	ART residual (g/l)	pH	Glicose (g/l)
	células	sobrenadante	células	sobrenadante				
0	1,87	0,95	62,33	31,67	0,03	40,45	6,56	7,5472
1	1,87	1,12	26,71	16,00	0,07	38,47	6,67	7,7830
2	2,01	1,12	4,37	2,43	0,46	37,32	6,48	8,0189
3	2,29	1,15	4,40	2,21	0,52	35,83	6,00	7,0755
4	2,56	---	3,01	---	0,85	34,26	5,55	6,6039
5	3,53	0,91	3,43	0,88	1,03	33,71	5,30	6,1321
6	3,11	---	2,70	---	1,15	33,26	5,22	6,0079
7	3,25	0,61	2,52	0,47	1,29	32,36	5,16	5,4245
8	2,56	---	1,89	---	1,35	28,18	5,11	4,9528
9	2,56	0,81	1,45	0,46	1,77	27,74	5,10	5,1887
10	2,56	---	1,50	---	1,71	26,68	5,16	4,9528
11	2,56	0,67	1,22	0,32	2,10	26,12	5,16	5,4245
12	2,56	---	1,60	---	1,60	25,33	5,17	4,4811

* Fermentação realizadas a 30°C, 350 rpm e 1vvm.

UI = μ M de ONPG/minuto

TABELA A7. Fermentação de soro de queijo desproteinado com e sem adição de glicose por *Erwinia aeroideae* a 30°C, 350 rpm e 1vvm, em fermentador de 6 litros.

Tempo (h)	Atividade (UI/ml)				MCS* (com glicose)	MCS* (sem glicose)
	com glicose		sem glicose			
	células	sobrena- dante	células	sobrena- dante	com glicose	sem glicose
0	1,87	0,95	4,15	1,19	0,03	---
1	1,87	1,12	4,26	3,54	0,07	0,14
2	2,01	1,12	5,80	2,94	0,46	0,23
3	2,29	1,15	10,76	17,27	0,52	0,63
4	2,56	--	17,47	12,86	0,85	0,75
5	3,53	0,91	19,32	11,51	1,03	0,98
6	3,11	--	13,96	10,00	1,15	1,00
7	3,25	0,61	34,80	27,17	1,29	1,00
8	2,56	--	50,80	28,91	1,35	1,11
9	2,56	0,81	42,04	45,70	1,77	1,20
10	2,56	--	28,21	18,94	1,71	1,37
11	2,56	0,67	49,26	10,66	2,10	1,51
12	2,56	--	108,30	8,65	1,60	1,90

*MCS: massa celular seca

UI = μ M de ONPG/minuto

TABELA A8. Valores de atividade específica de lactase produzida por *Erwinia aroideae* em soro de queijo desproteinado com e sem glicose a 30°C, 350 rpm e 1vvm

Tempo (h)	Atividade específica (UI/mg de cel.)			
	com glicose		sem glicose	
	células	sobrenadante	células	sobrenadante
0	62,33	31,67	---	---
1	26,71	16,00	30,43	21,28
2	4,37	2,43	25,22	12,78
3	4,40	2,21	17,08	27,41
4	3,01	---	23,29	17,15
5	3,43	0,88	19,52	11,74
6	2,70	---	13,96	10,00
7	2,52	0,47	34,80	27,17
8	1,89	---	45,76	26,04
9	1,45	0,46	35,03	38,08
10	1,50	---	20,59	13,82
11	1,22	0,32	32,62	7,06
12	1,60	---	57,00	4,55

APÊNDICE B

TABELA B1. Valores de velocidades em função da concentração do substrato (ONPG) a 20°C

Concentração (mM)	Velocidade Inicial (UI/mg)	1/C (1/mM)	1/V (mg/UI)
0,2	7,245	5,00	0,1380
0,3	10,140	3,33	0,0986
0,4	14,300	2,50	0,0699
0,5	15,480	2,00	0,0611

TABELA B2. Valores de velocidades em função da concentração do substrato (ONPG) a 23°C

Concentração (mM)	Velocidade inicial (UI/mg)	1/C (1/mM)	1/V (mg/UI)
0,2	10,43	5,00	0,0958
0,3	14,91	3,33	0,0670
0,4	20,08	2,50	0,0498
0,5	24,05	2,00	0,0415

TABELA B3. Valores de velocidades em função da concentração do substrato (ONPG) a 25°C

Concentração (mM)	Velocidade inicial (UI/mg)	1/C (1/mM)	1/V (mg/UI)
0,2	11,76	5,00	0,0850
0,3	17,54	3,33	0,0570
0,4	23,90	2,50	0,0418
0,5	25,91	2,00	0,0386

TABELA B4. Valores de velocidade em função da concentração do substrato ONPG a 27 °C.

Concentração (mM)	Velocidade inicial (UI/mg)	1/C (1/mM)	1/V (mg/UI)
0,2	15,38	5,00	0,065
0,3	20,83	3,33	0,048
0,4	22,00	23,50	0,043
0,5	30,00	2,00	0,033

TABELA B5. Estabilidade a temperatura de 45°C

Tempo (min)	Atividade (UI/ml de meio)
0	504,60
10	461,71
20	428,18
30	310,51
40	199,54
50	177,35
60	140,70

TABELA B6. Estabilidade a temperatura de 47°C

Tempo (min)	Atividade (UI/ml de meio)
0	519,54
10	306,38
20	74,13
30	55,03
40	43,67
50	35,42
60	30,77

TABELA B7. Estabilidade a temperatura 49°C

Tempo (min)	Atividade (UI/ml de meio)
0	460,18
10	234,12
20	59,67
30	38,51
40	26,13
50	20,45
60	11,16

TABELA B8. Estabilidade a temperatura de 50°C

Tempo (min)	Atividade (UI/ml de meio)
0	547,41
10	442,64
20	212,45
30	92,16
40	12,71
50	---
60	---

TABELA B9. Valores de Kd em função da temperatura

Temperatura (°C)	Kd (1/min.)	Tempo de meia vida (min.)
45	0,0232	29,88
47	0,0476	14,56
49	0,0602	11,51
50	0,0909	7,62

TABELA B10. Valores de atividade de lactase em função do pH de incubação a 45°C.

pH	Atividade específica (UI/mg de células)	Atividade esperada a 45°C e pH 7,5 calculada pela equação 2	Atividade específica (UI/mg de células) pré-incubada por 20 min.
5,0	0	0	7,10
6,0	8,32	5,24	27,41
7,0	55,59	35,02	29,90
7,5	113,13	71,27	31,57
8,0	135,02	85,06	37,06
9,0	126,03	79,40	21,92
10,0	98,42	62,00	3,27

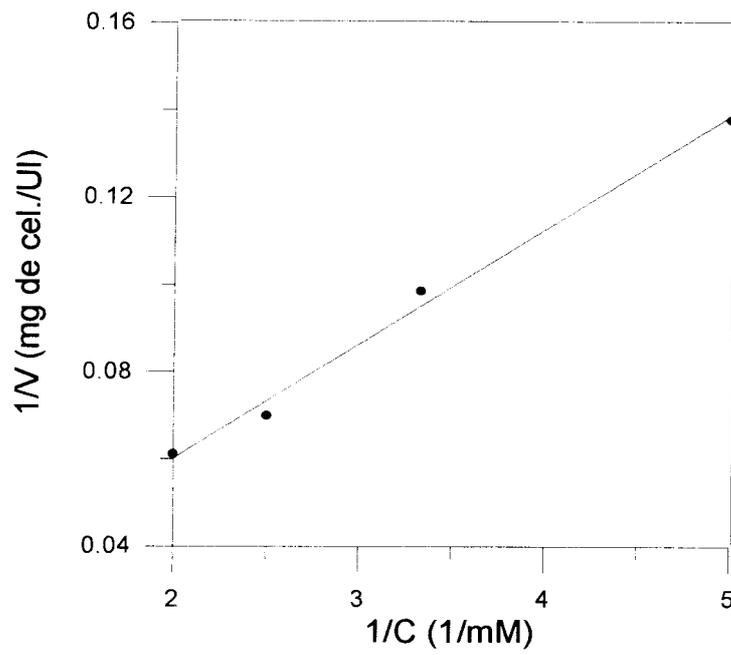


FIGURA B1. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 20°C.

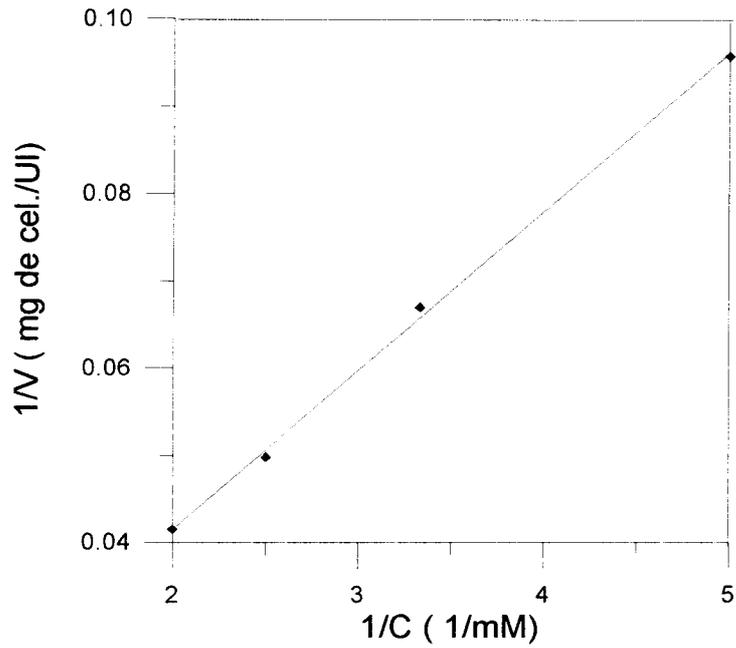


FIGURA B2. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 23°C

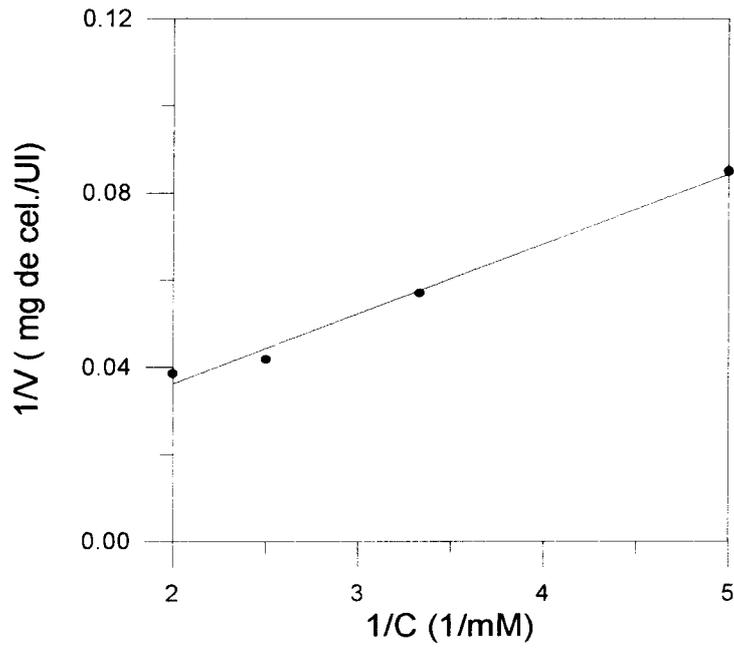


FIGURA B3 Forma de Lineweaver -Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 25 C

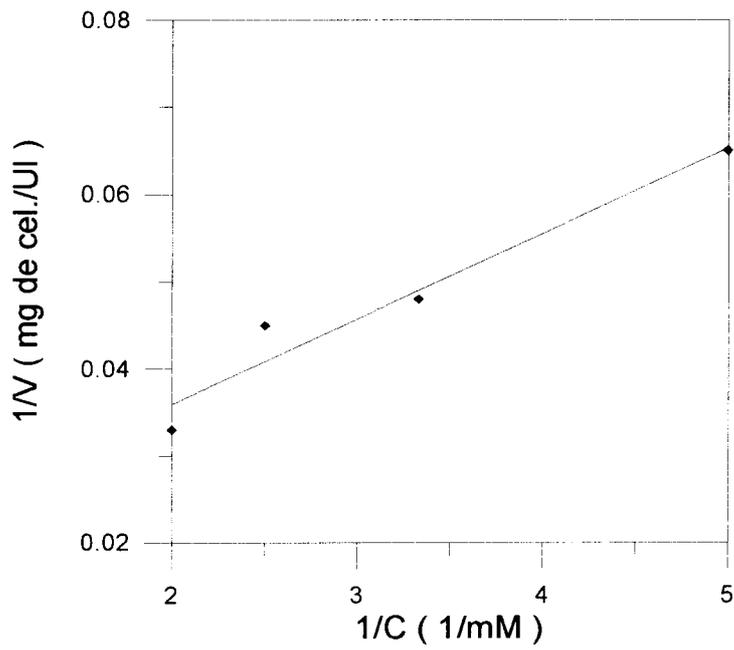


FIGURA B4. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais da hidrólise de ONPG a 27°C

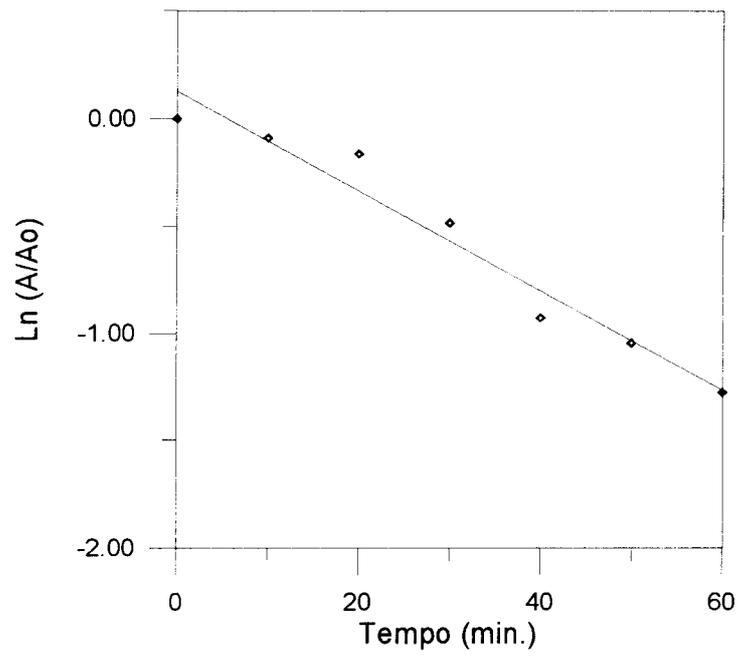


FIGURA B5. Estabilidade a temperatura de 45°C

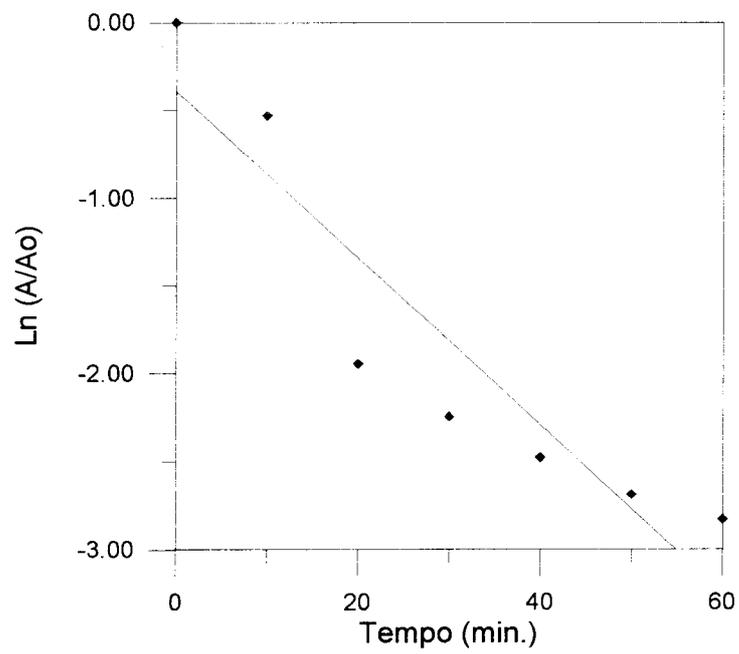


FIGURA B6. Estabilidade a temperatura de 47°C

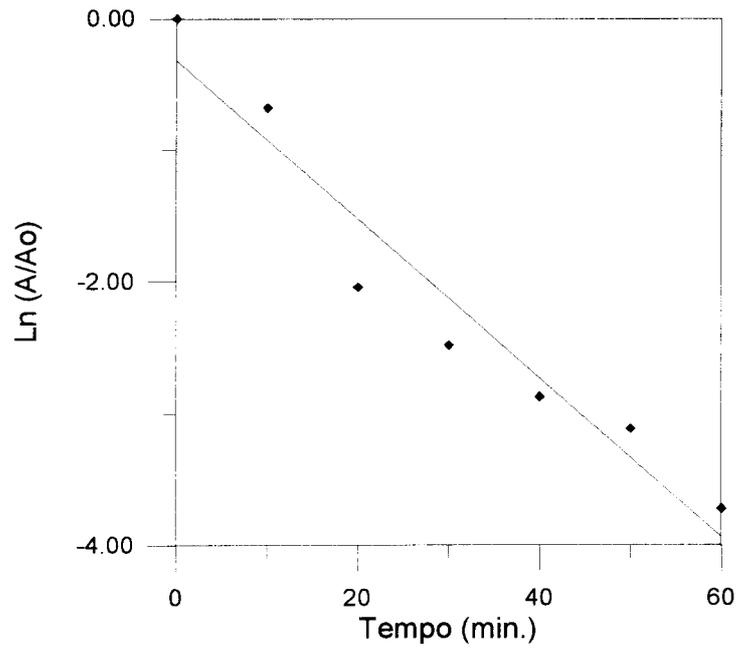


FIGURA B7. Estabilidade a temperatura de 49° C.

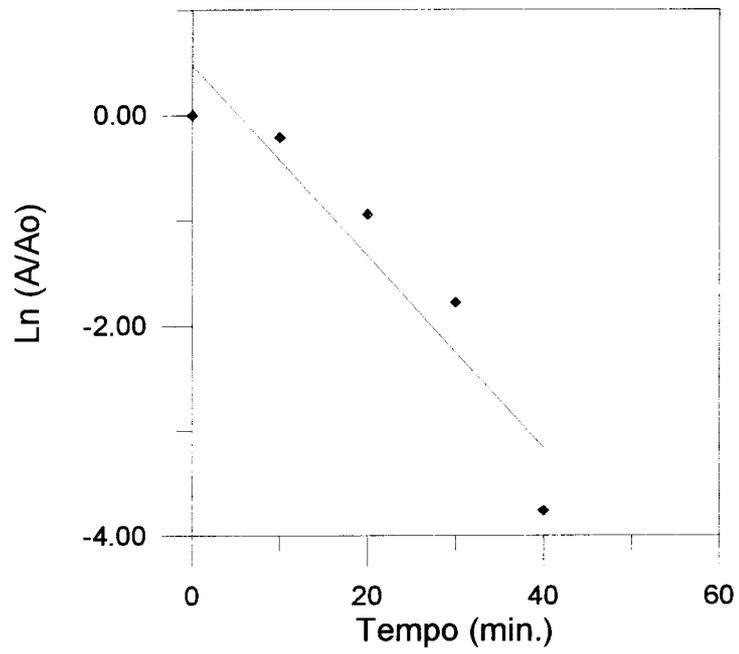


FIGURA B8. Estabilidade a temperatura de 50°C.

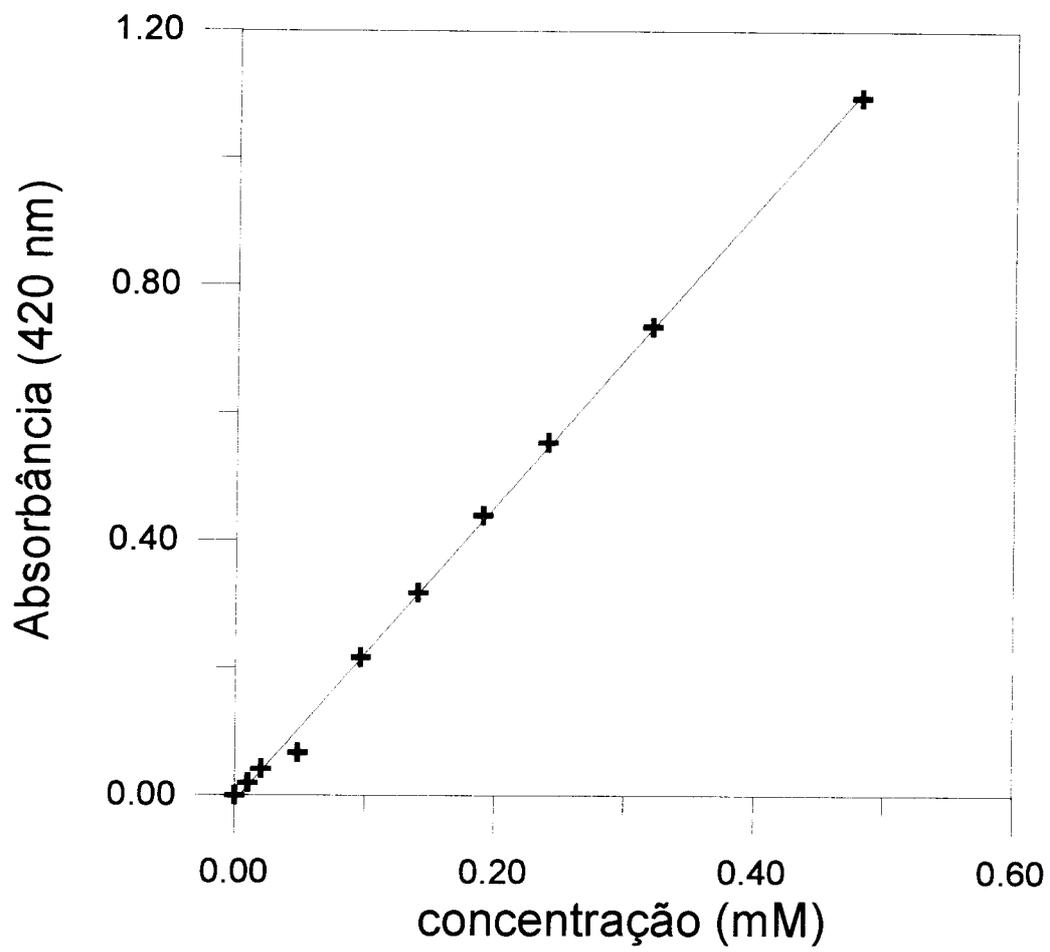


FIGURA B9 CURVA PADRÃO DE ONPG.