

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ETAPA DE CENTRIFUGAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDADE POR *Aspergillus oryzae* EM SORO DE QUEIJO

Data de submissão: 08/12/2023

Data de aceite: 26/01/2024

Werlisson Santos Souza

Universidade Federal de Sergipe
Programa de pós-graduação em
Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<http://lattes.cnpq.br/1967291372351934>

Priscila Reis dos Santos Gonçalves

Universidade Federal de Sergipe
Programa de pós-graduação em
Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<http://lattes.cnpq.br/8507936097847577>

Graziella do Nascimento Silva

Universidade Federal de Sergipe
Programa de pós-graduação em
Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<https://lattes.cnpq.br/2146151656408667>

Raiane Vieira Chaves

Universidade Federal de Sergipe
Rede Nordeste de Biotecnologia
São Cristóvão - SE
<http://lattes.cnpq.br/9096559129747858>

Sandy Poderoso da Rocha

Universidade Federal de Sergipe
Departamento de Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<https://lattes.cnpq.br/5428211901747643>

Roberto Rodrigues de Souza

Universidade Federal de Sergipe
Departamento de Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<http://lattes.cnpq.br/0292200610294281>

Jacqueline Rêgo da Silva Rodrigues

Universidade Federal de Sergipe
Departamento de Engenharia Química
São Cristóvão - SE
<http://lattes.cnpq.br/5402578453593374>

Keilla Santos Cerqueira

Universidade Federal da Bahia
Programa de pós-graduação em
Engenharia Química
Salvador - BA
<https://orcid.org/0000-0002-1308-0754>

RESUMO: A indústria de laticínios produz grandes quantidades de soro de leite como subproduto, o que tem levado a consideráveis problemas ambientais devido ao seu alto teor de matéria orgânica. Nas últimas décadas, têm sido estudadas possibilidades de utilização mais eficiente do ponto de vista ambiental e econômico, principalmente para converter produtos finais indesejados numa matéria-prima para a produção biotecnológica de produtos com

maior valor agregado, como a β -galactosidase, enzima utilizada para hidrolisar a lactose. Essa enzima pode ser produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, bastante utilizado em aplicações industriais, por tanto, o trabalho teve como objetivo produzir a lactase de *Aspergillus oryzae*, utilizando o soro do queijo como substrato e concentrar a enzima utilizando centrifugação, para isto testou planejamento fatorial 2^2 , utilizando rotações de 500 a 880 rpm, com tempo de 20 a 40 minutos, além disto foi realizado o acompanhamento da fermentação em soro de queijo e dos carboidratos totais. O soro do leite apresentou resultados satisfatórios como substrato na produção da enzima, bem como houve um aumento na produção da lactase de acordo com o aumento da concentração de glicose. Por fim, observou-se que a centrifugação é essencial antes das etapas convencionais de purificação, pois permitiu um aumento de 26,06 % na atividade enzimática do caldo bruto.

PALAVRAS-CHAVE: Soro; centrifugação; *Aspergillus*; lactase.

EVALUATION OF THE CENTRIFUGATION STEP IN THE PRODUCTION OF β -GALACTOSIDASE BY *Aspergillus oryzae* IN CHEESE WHEY

ABSTRACT: The dairy industry produces large amounts of whey as a by-product, which has led to considerable environmental problems due to its high organic matter content. In recent decades, possibilities for more efficient use from an environmental and economic point of view have been studied, mainly to convert unwanted end products into raw material for biotechnological production of products with higher added value, such as β -galactosidase, an enzyme used to hydrolyze lactose. This enzyme can be produced by the fungus *Aspergillus oryzae*, which is widely used in industrial applications. Therefore, the work aimed to produce lactase using *Aspergillus oryzae* and cheese whey as substrates, followed by the centrifugation step to concentrate the enzyme and evaluate its influence before purification. A factorial design of 2^2 was tested using rotations (500 to 880 rpm) and time (20 to 40 min) as independent variables and enzymatic activity as response. The serum presented satisfactory results as substrate in the production of enzymes, as well as an increase in lactase production according to the increase in glucose concentration. Finally, it was observed that centrifugation is essential before the conventional purification steps, as it allowed an increase of 26.06% in the enzymatic activity of the raw broth.

KEYWORDS: Whey; centrifuge; *Aspergillus*, lactase.

1 | INTRODUÇÃO

Com o crescimento da indústria de laticínios e o alto consumo de leite e derivados, grandes quantidades de subprodutos são produzidas, principalmente soro de leite, um subproduto do processo de fabricação de queijos. O soro de queijo é um forte efluente orgânico que pode apresentar um risco ao meio ambiente devido a sua alta demanda química de oxigênio (DQO) (50 a 80 g/L) e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (40 a 60 g/L) (CHATZIPASCHALI; STAMATIS, 2012). Na ausência de práticas sustentáveis, o soro de leite é considerado o poluente ambiental mais importante da indústria de laticínios porque uma grande quantidade de soro de leite é descartada como águas residuais e

está associada a sérios riscos ambientais (MACWAN *et al.*, 2016). O descarte do soro também representa uma perda significativa de potenciais nutrientes e energia, portanto, para aproveitar o valor nutricional do soro e ao mesmo tempo diminuir os efeitos nocivos do descarte no meio ambiente, é importante direcionar a gestão do soro de leite para uma forma de utilização econômica e sustentável e, ao mesmo tempo, direcioná-la para a produção de novos produtos de valor agregado.

Dentre a gama de produtos, podemos citar as enzimas, que são utilizadas em várias ramificações da indústria, dentre elas, a alimentícia e farmacêutica. Elas podem ser produzidas a partir de animais, plantas e microrganismos (bactérias, fungos, leveduras e actomicetos). As enzimas microbianas apresentam alto rendimento, além de serem mais ativas e estáveis quando comparadas as enzimas vegetais e animais (SUTAY *et al.* 2022).

β -galactosidase, também conhecida como lactase, é uma das enzimas mais utilizadas em produtos lácteos, tendo como função hidrolisar a lactose (principal carboidrato no leite dos mamíferos) em glicose e galactose (CATANZARO *et al.* 2021).

Utilizada em produtos com baixo teor de lactose e sem lactose para consumidores intolerantes à lactose. A lactase geralmente é produzida a partir de microrganismos como levedura, bactérias e fungos, como o *Aspergillus* (SUTAY *et al.* 2022).

O gênero *Aspergillus* possui várias espécies, mas para aplicação industrial o mais utilizado é o *Aspergillus oryzae*. Isso se deve a sua capacidade em secretar diversas enzimas hidrolíticas, como a xilanase, celulase e a β -galactosidase (VIANA, 2017).

Há duas metodologias para a hidrólise da lactose, o ácido e o enzimático. No ácido, a reação ocorre de forma rápida, com temperatura alta. No método enzimático, tem como vantagem a proteção das propriedades dos alimentos, utilizando uma temperatura equilibrada (MIRSALAMI; ALIHOSSEINI, 2021). Na produção enzimática é aplicado o processo fermentativo, sendo elas, a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). A FS utiliza substratos líquidos, tendo como vantagens o controle dos parâmetros do processo (MEINI *et al.*, 2021; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Em seguida a fermentação, têm as etapas *downstream*, composta pela recuperação e purificação, conferindo maior pureza no produto final (HASMANN *et al.*, 2008). A centrifugação é uma operação unitária usada nos protocolos de purificação, onde recupera a enzima presente no caldo fermentado (AGUIAR; SILVA; EL-DEIR, 2019). Diante disso, este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade do *Aspergillus oryzae* em produzir a enzima β -Galactosidase e concentrá-la por centrifugação, utilizando o soro do queijo como substrato.

2 | METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). O preparo do inóculo e os processos

fermentativos foram conduzidos com base na metodologia descrita por Martarello (2016) e Viana (2017).

2.1 Produção da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em fermentação submersa

O fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* foi o microrganismo utilizado nesse trabalho. As culturas foram mantidas em meio PDA (Potato, Dextrose, Ágar - (Sigma-Aldrich)), esterilizado a 120 °C, 1,2 bar e 30 minutos em autoclave. Em seguida, a suspensão de esporos foi adicionada em uma solução salina 0,85 % contendo o reagente Tween 80, que foi armazenada a 4 °C e serviu de inóculo para as fermentações submersas.

O soro de queijo, obtido de um laticínio em Sergipe, foi o substrato utilizado. Ele passou por um processo de esterilização a 120 °C e 1,2 bar para eliminação de microrganismos indesejados e facilitar a etapa seguinte de filtração a vácuo que serviu para reter lipídeos do soro. Por fim, ele foi novamente esterilizado e após resfriamento, inoculado com o *Aspergillus*.

A fermentação em estado submerso foi realizada em um Erlenmeyer durante cinco dias de cultivo. Nele foi adicionado 1 L de soro de queijo e 10 % do inóculo (100 mL). O meio estava sob as condições de 30 °C, pH 4,5 e agitado em 120 rpm em Shaker CERTOMAT BS-1 B. Braun Biotech International.

2.2 Métodos analíticos: atividade enzimática e carboidratos totais

A quantificação da atividade da β -galactosidase (lactase) foi realizada com o substrato ONPG (Sigma-Aldrich), ou O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, conforme procedimento similar ao de Mortoza (2012). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de luz de 410 nm.

Para a determinação da concentração de carboidratos ou açúcares totais empregou-se a metodologia do Fenol-Sulfúrico descrita por Dubois *et al.* (1956). Nela, a concentração de açúcares totais é quantificada comparando com a curva de calibração construída a partir do padrão de glicose. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de luz de 490 nm.

2.3 Concentração enzimática por centrifugação

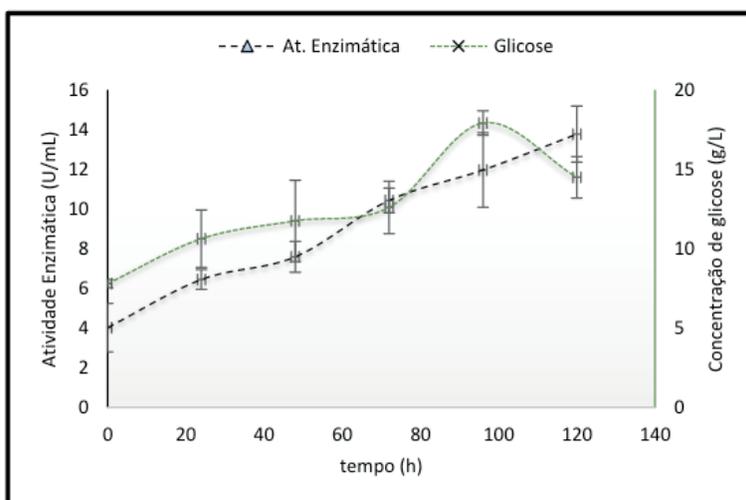
O caldo bruto obtido após os 5 dias de fermentação foi utilizado na etapa de centrifugação. Para verificar a influência da centrifugação na atividade enzimática, optou-se por variar a velocidade (500 a 880 rpm) e o tempo de rotação (20 a 40 minutos) na separação do sobrenadante presente no caldo fermentado. Para a condução dos

experimentos foi realizado um planejamento experimental do tipo Box, Hunter e Hunter, sendo um fatorial completo com 2^2 experimentos e com três repetições no ponto central. O software Statistica 10.0 foi utilizado para análise estatística dos parâmetros. Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) e a Metodologia de Superfície de Resposta para verificar a significância do modelo.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em soro de queijo

A atividade enzimática e a concentração de glicose foram avaliadas diariamente durante 5 dias em fermentação submersa e a cinética de crescimento do microrganismo representa esses parâmetros, como mostra a Figura 1.



Os resultados são representados como média \pm desvio padrão (n=2).

Figura 1 – Cinética da atividade enzimática e do teor de glicose em soro de queijo.

Com base na Figura 1 o soro de queijo pode ser considerado uma interessante alternativa de substrato na produção da enzima lactase durante cinco dias de fermentação, uma vez que foi constatado o crescimento do micro-organismo *Aspergillus oryzae* nesse período. O cultivo que foi realizado a 30 °C apresentou resultados significativos de atividade enzimática, sendo que no quinto dia atingiu um valor de 13,79 U/mL.

Os dados obtidos são semelhantes ao da literatura, pois Bosso *et al.* (2020) em uma das suas análises obtiveram uma atividade enzimática de 20,80 U/mL utilizando diferentes fontes de carbono no meio fermentativo, incluindo soro de queijo em pó reconstituído (16 g/L), sacarose (16 g/L), extrato de levedura (8 g/L) a 30 °C em 72h. De acordo com o

autor a produção da β -galactosidase pode ser aumentada se for utilizada ferramentas de otimização, como planejamento experimental e superfície de resposta, podendo atingir uma atividade enzimática de 54,68 U/mL, utilizando soro de queijo como uma das fontes de carbono.

Ademais, foi verificado a capacidade da lactase hidrolisar uma molécula de lactose em uma de glicose e galactose. Isso foi possível através da análise de açúcares totais, onde um aumento representa essa capacidade da enzima converter uma molécula em duas. Como esperado, observou-se um aumento na produção da lactase tendo em vista o aumento da concentração de glicose. Assim, com base nos dados vale destacar que o uso de um fungo filamentosos como o *Aspergillus oryzae* é viável na obtenção de enzimas e o soro de queijo é um substrato interessante no crescimento desse fungo. Diante disso, esse subproduto da indústria de laticínios pode ser reaproveitado em processos fermentativos, evitando que ele seja descartado no ambiente de forma incorreta e contribuindo para uma sociedade mais sustentável (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2019). Nesse contexto, a Figura 1 mostra que ao final de 5 dias de cultivo, o meio apresentava lactase suficiente para realizar a etapa seguinte, a centrifugação, reafirmando os pontos levantados.

3.2 Concentração da enzima via centrifugação

Para analisar a capacidade em concentrar a amostra contendo a enzima, empregou-se a centrifugação, que nada mais é do que um método para acelerar o processo de decantação. A Tabela 1 mostra a matriz do planejamento fatorial completo do tipo 2² com 3 repetições no ponto central, onde a atividade enzimática foi a variável de resposta das variáveis tempo (X1) e rotação (X2) da centrifugação.

Experimento	Variáveis (valor real)		Variável Resposta
	Tempo (min) (X1)	Rotação (rpm) (X2)	Atividade enzimática (U/mL)
1	20 (-1)	500 (-1)	10,15
2	20 (-1)	880 (+1)	15,64
3	40 (+1)	500 (-1)	17,15
4	40 (+1)	880 (+1)	18,65
5	30 (0)	690 (0)	14,69
6	30 (0)	690 (0)	15,25
7	30 (0)	690 (0)	13,94

Tabela 1 – Planejamento experimental para a centrifugação do caldo fermentado com a atividade enzimática como resposta.

De acordo com as condições empregadas na centrifugação, as atividades da β -galactosidase variaram de 10,15 a 18,65 U/mL. A máxima atividade foi obtida quando

o tempo de centrifugação e a rotação estavam em 40 minutos e 880 rpm (18,65 U/mL). Percebe-se, assim, que a centrifugação foi capaz de concentrar a enzima do caldo fermentativo, pois houve um aumento de 26,06% na atividade da β -galactosidase quando comparada com a máxima atividade do extrato bruto (13,79 U/mL).

A partir da Análise de variância (ANOVA) expressa na Tabela 2, é possível constatar que a variável tempo e rotação foram considerados significativos, tendo em vista que os valores de p^* para essas fontes estavam abaixo de 0,05, considerando um nível de significância de 95%. A interação das duas variáveis não foi significativa. Além disso, o modelo proposto pode ser considerado significativo, uma vez que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,98, indicando que 98% da variabilidade dos experimentos foi explicada pelo modelo Box, Hunter e Hunter.

Fonte de variação	SS	DF	MS	F	p valor*
X1	12,21502	1	12,21502	19,46444	0,021607*
X2	25,05002	1	25,05002	39,91680	0,008015*
X1X2	3,98003	1	3,98003	6,34210	0,086301
Erro	1,88267	3	0,62756		
Total de SS	43,12774	6			

X1: tempo; X2: rotação. Significância: * $p < 0,05$. R-quadrado: 0,95635; R-quadrado ajustado: 0,91269; DF, graus de liberdade; SS, Soma dos quadrados.

Tabela 2 – ANOVA para a atividade de β -galactosidase obtida após centrifugação.

Com base no modelo obtido foi possível construir a superfície de resposta para determinar os níveis ótimos das variáveis independentes capazes de fornecer a máxima atividade de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. As curvas de contorno para as regiões de interesse estão apresentadas na Figura 2.

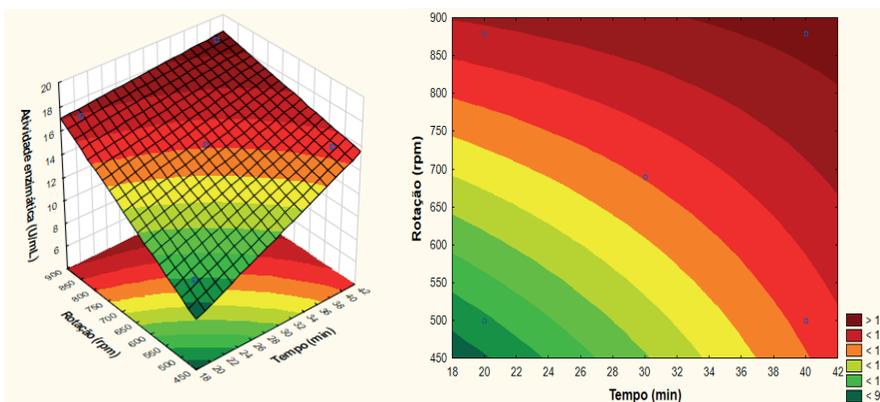


Figura 2 – Curvas de contorno da atividade enzimática vs velocidade; tempo via centrifugação.

As maiores atividades foram alcançadas quando o tempo e a rotação estavam no seu nível máximo. Ao adotar tempos curtos de centrifugação, é preciso elevar a velocidade de rotação. Além disso, ao analisar os coeficientes de regressão e o efeito estimado, constata-se que as duas variáveis exerceram efeitos lineares positivos, ou seja, o uso de valores mais elevados de qualquer uma das variáveis vai fornecer uma atividade enzimática maior. Dessa forma, o planejamento Boxx, Hunter e Hunter e a metodologia de superfície de resposta foram consideradas ótimas ferramentas para analisar a centrifugação, uma vez que foi possível otimizar a atividade enzimática.

Nos processos *Downstream*, a etapa de purificação é uma das etapas mais caras. Diante disso, a busca por métodos mais eficientes que maximizem a produção e reduzam os gastos é interessante do ponto de vista comercial (AMARAL *et al.*, 2020). Por isso, utilizar a centrifugação é essencial antes da realização da purificação de lactase, uma vez que ela ajuda a recuperar e concentrar a enzima do caldo fermentado, reduzindo o volume do extrato bruto e aumentando a concentração enzimática, levando a um aumento em sua atividade. Além disso, um volume menor de solução é mais fácil de manusear em etapas de purificação ao empregar, por exemplo, técnicas de precipitação ou cromatografias que necessitam de pequenos volumes.

4 | CONCLUSÃO

O uso do soro de queijo é uma interessante alternativa como substrato em processos fermentativos quando se deseja produzir a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Além disso, a centrifugação mostrou-se essencial na etapa *Downstream* do processo, tendo em vista que aumentou a atividade enzimática em 26,06 %. Logo, antes de realizar a purificação da lactase é recomendável reduzir o extrato bruto por centrifugação. Dessa forma, as etapas posteriores serão facilitadas e a produção da enzima será maximizada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFS, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C.; SILVA, K. A.; EL-DEIR, S. G. **Resíduos sólidos: Impactos ambientais e inovações tecnológicas**. 1 ed. Recife: UFRPE. p. 557. 2019.

AMARAL, Y. M. S.; SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S. **Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems**. *Preparative biochemistry & biotechnology*. v. 50, p. 619-626, 2020.

BOSSO, A.; TOMAL, A. A. B.; MIRANDA, L. C.; SILVA, J. B.; SUGUIMOTO, H. H.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. **Lactase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 using different carbon sources.** Ambiente & água. v. 15, n. 3, 2020.

CHATZIPASCHALI, A. A.; STAMATIS, A. G. **Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: Current status and prospects.** Energies. v. 9, p. 3492-3525, 2012.

CATANZARO, R.; SCIUTO, M.; MAROTTA, F. **Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment.** Nutrition Research, v. 89, p. 23–34, 2021.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** Analytical chemistry, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

HASMANN, F. A.; MAZZOLADE, P. G.; MAGALHÃES, P. O.; PENNA, T. C.V. PESSOA, J. A. **Purificação de biomoléculas intracelulares produzidas por microrganismo.** Microbiologia in foco, v. 6, p. 8, 2008.

LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; LATORRE-SÁNCHEZ, M.; UNGERA, P.; SCHNEIDERA, R.; LOZANOB, C. C.; VENUSA, J. **Assessing the organic fraction of municipal solid wastes for the production of lactic acid.** Biochemical Engineering Journal, v. 150, p. 107-251, 2019.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; PARMAR, S. C.; APARNATHI, K. D. **Whey and its utilization.** International Journal of Current Microbiology and Applied, v. 8. p.134–55, 2016.

MARTARELLO, R. D. **Purificação de uma beta-galactosidase produzida por *Aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas.** 2016. 112 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MEINI, M. R.; CABEZUDO, I.; GALETTO, C. S.; ROMANINI, D. **Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.** Food Bioscience, v. 42, p. 101168, 2021.

MIRSALAMI, S. M.; ALIHOSSEINI, A. **Selection of the most effective kinetic model of lactase hydrolysis by immobilized *Aspergillus niger* and free β -galactosidase.** Journal of Saudi Chemical Society, v. 25, n. 12, p. 101395, 2021.

MORTOZA, A. R. **Produção e purificação de beta-galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo.** 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade Brasília, Brasília, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 1980–0002, p. 13, 2012.

SUTAY, K. D.; LYNE, J.; USTUNOL, Z. **Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives.** Trends in Food Science & Technology, v. 119, p. 467–475, 2022.

VIANA, C. S. **Produção de beta-galactosidase por *aspergillus oryzae* cultivado em soro de queijo.** 2017. 57 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados).