

SEMINÁRIO DE

INICIAÇÃO CIENTÍFICA 2016



17 e 18
AGOSTO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE B-GALACTOSIDASE OBTIDA DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO POR *ASPERGILLUS ORYZAE* E *SACCHAROMYCES FRAGILIS*

Maicon Jhonatan Bueno do Amaral Santos (Bolsista FUNADESP/UNOPAR), e-mail: mjbas94@hotmail.com. Luiz Rodrigo Ito Morioka (Colaborador), e-mail: lrodrigomorioka@gmail.com, Caroline dos Santos Viana (Colaboradora); e-mail: carolineviana1@yahoo.com, Erika de Pádua Alves (Colaboradora), e-mail: erikaalves34@hotmail.com. Hélio Hiroshi Suguimoto (Orientador), e-mail: helio.suguimoto@unopar.com.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) | Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS.

Área do conhecimento: Microbiologia Industrial e de Fermentação

Introdução

Devido à sua baixa concentração de matéria sólida 6 – 7% (p/v), o soro de queijo normalmente é considerado um efluente. Por isso, há a necessidade de buscar por novas alternativas para o processamento da lactose presente no soro de queijo, sendo isto um passo crucial para que as indústrias possam respeitar as legislações ambientais (ROSSETO; MORAES; ZANIN, 2012). Tipicamente, por cada 100 kg de leite produzem-se 10-20 kg de queijo, dependendo da sua variedade, e cerca de 80 a 90 kg de soro (CHERYAN, 1998).

São constantes os esforços para o aproveitamento de resíduos agroindustriais em todo o mundo. Em particular o soro do queijo, pela abundância de produção, características nutricionais e elevada capacidade poluente, tem sido, há tempo, motivo de vários estudos (SILVA; HERMAN-GOMEZ, 2000; VALDUGA *et al.*, 2006; MADRONA *et al.*, 2009; GABARDO *et al.*, 2011). Portanto, o projeto teve como objetivo a análise de melhores resultados na determinação da atividade enzimática de β -galactosidase na fermentação pelos microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces fragilis* com oxigenação e sem oxigenação em soro de queijo.

Material e métodos

Microrganismos

Foi utilizado para produzir a enzima β -galactosidase os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces fragilis*, oriundos do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Norte do Paraná através do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Soro de queijo

O soro de queijo em pó formulação integral foi obtido da CONFEPAR®, localizada em Londrina-PR. A concentração de trabalho do soro foi de 5% (p/v).
Desproteínização do soro de queijo e pasteurização

O soro de queijo em pó foi solubilizado em água destilada, posteriormente foi adicionado ácido láctico até pH 4,6, e aquecido por 30 minutos a 90°C. Após a precipitação, a fração protéica foi-se removida por filtração, ajustando o pH 5,0. A pasteurização do soro de queijo desproteínizado foi de forma lenta a 90°C por 30 minutos. O soro desproteínizado foi empregado como meio de cultivo base nos experimentos.

Microrganismo e Inóculo

Para o trabalho foram utilizadas as linhagens *Saccharomyces fragilis* denominada IZ 275 e *Aspergillus oryzae* CCT 0976, CCT 4359, CCT 0979, CCT 5321, CCT 5677, CCT 0980, CCT 0978, CCT 0977. Os microrganismos foram cultivados em tubos de ensaio contendo Batata Dextrose Ágar (BDA). Para o preparo do inóculo fora utilizado o extrato de malte (15g/L), ajustado o pH para 5,5 e esterilizado por 15 minutos a 121°C. O frasco inoculado foi incubado em agitador orbital (TECNAL®) na temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm por 48 horas.

Condições de cultivo

Para a *Saccharomyces fragilis* a fermentação foi realizada durante 48 horas com soro de queijo desproteínizado, 5% (v/v) de inóculo, a 35 °C e 100 rpm. Ao final da fermentação a cultura foi filtrada e centrifugada para a obtenção da biomassa e do sobrenadante que foram utilizados para a padronização da atividade enzimática.

Para o cultivo de *Aspergillus oryzae* fora feita a contagem de esporos, com adição de solução extrativa de esporos, transferindo para placa de Neubauer e com auxílio de microscópio fez-se a contagem de esporos com uma padronização de 106 esporos por mL.

Determinação de biomassa

Para a *Saccharomyces fragilis* a determinação da biomassa foi realizada pela retirada de alíquotas de 5 mL do meio de fermentação. As amostras foram centrifugadas a 10000 xG por 10 minutos. Repetiu-se três vezes (para a completa lavagem das células). Análise da biomassa foi quantificada gravimetricamente com o peso seco das células. O material centrifugado foi transferido para cadinhos previamente tarados e colocados em estufa a 105 °C por 4 a 5 horas até o alcance de peso constante. O valor (g/L) foi dado pela diferença de peso inicial dos frascos de porcelana previamente tarados.

Para o *Aspergillus oryzae* a determinação de biomassa foi feita a cada 24h coletando amostras do agitador, a massa celular fora determinada pela diferença do peso inicial e final do béquer na balança.

Atividade da lactase

A atividade da β -Galactosidase das células permeabilizadas foi determinada conforme descrito por Inchaurredo, Yautorno & Voget, 1994. A atividade da β -galactosidase foi determinada utilizando o substrato colorimétrico ONPG (orto-nitrofenil- β -galactosídeo). Uma amostra de 50 μ L da suspensão celular permeabilizada foi misturada com 2 mL de ONPG (1,25 mM) em tampão e incubado por 5 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carbonato de sódio (1 M). O ONPG liberado foi medido em espectrofotômetro em A_{420nm} .

Determinação da Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose. Para isto, empregou-se um agitador provido de controle de temperatura e agitação, sobre o qual foi colocado um becker contendo 100 mL de solução de lactose (1%) em tampão acetato a pH 4,5 e 30°C de incubação. Após isto, foi pipetado 5 mL do sobrenadante oriundo do processo de

extração da enzima no becker. Neste momento, iniciou-se a contagem do tempo de reação de 60 minutos, amostras de 3 mL foram retiradas em intervalos de 5 minutos nos primeiros 20 minutos de reação e 10 minutos no tempo restante e colocadas em tubos de ensaio com tampa e levado a água fervente por 10 minutos para inativação da enzima. Transcorrido este tempo, a glicose foi dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se Kit de determinação da glicose por metodologia enzimática-colorimétrica – Kit Glicose (Bioliquid) de acordo com as orientações do fabricante.

Homogenizou-se e incubou-se os tubos em banho-maria a 37°C por 10 minutos para inativação da enzima. O nível de água do banho foi superior ao nível dos reagentes nos tubos. Na sequência realizou-se a leitura no espectrofotômetro do Padrão e do Teste, zerando o aparelho com o branco no comprimento de onda de 505 nm.

Determinação de lactose (metilamina)

A determinação da lactose é realizada segundo o método descrito por Nickerson, Vukicic e Lin (1975). O método baseia-se na reação da lactose com a metilamina em solução alcalina quente para formar um composto vermelho. A leitura é realizada em espectrofotômetro a 540nm.

Permeabilização celular

Após a fermentação as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm durante 10 min) e lavada uma vez com água destilada. A permeabilização celular foi realizada em tubos falcon contendo 5 mL da suspensão de reação que consiste em etanol, 50 mg (base seca) de *Saccharomyces fragilis* IZ 275 e tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8). O sobrenadante foi coletado por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos para análise posterior, e as células foi lavada uma vez com o mesmo tampão. A biomassa final foi ressuspensa em 1 mL do tampão fosfato e a atividade enzimática das células permeabilizadas foi determinada. O sobrenadante também foi avaliado para atividade enzimática da beta-galactosidase.

Extração da β -galactosidase

Para a extração da enzima β -galactosidase da biomassa do fungo *Aspergillus oryzae* foi utilizado o clorofórmio a 2 % (v/v). A amostra foi deixada em overnight a 30°C. Após este período, centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

Resultados e discussão

Soro desproteínizado fermentado com oxigenação

Foram realizadas análises da fermentação com oxigenação nos tempos (H) 1 ao 17, obtendo as seguintes respostas: Biomassa, ONPG, Atividade enzimática via glicose-oxidase, lactose e proteína, produzindo maior quantidade de biomassa nos tempos de 5 a 7, e através das demais análises pode-se verificar maior atividade enzimática nos tempos de 11 a 15 H.

Soro desproteínizado sem oxigenação

Através das análises feitas da fermentação com oxigenação nos tempos (H) 1 ao 18, foram obtidas as seguintes respostas: Biomassa, ONPG, Atividade enzimática via glicose-oxidase, lactose e proteína, produzindo maior quantidade de biomassa no tempo 12, e através das demais análises verificou-se maior atividade enzimática nos tempos de 5 a 7 H.

Através das análises testadas nos dois experimentos, constatou-se que a fermentação com oxigenação apresentou maior atividade enzimática em relação a sem oxigenação.

*Seleção de cepas de *Aspergillus oryzae**

Nas análises da seleção das 9 cepas de *Aspergillus oryzae* verificou-se maior incidência enzimática na cepa denominada *Aspergillus oryzae* 0977.

Conclusão

No experimento do soro de queijo desproteínizado com oxigenação e sem oxigenação, foi analisado melhores resultados na fermentação com oxigenação, necessitando repetir as análises para confirmação com êxito da melhor atividade enzimática, já na seleção das nove cepas de *Aspergillus oryzae*, verificou-se a possibilidade de resultados favoráveis com a cepa *Aspergillus oryzae* CCT 0977.

Agradecimentos

FUNADESP, UNOPAR, Prof. Dr. Helio Hiroshi Suguimoto e Luiz Rodrigo Ito Morioka Caroline dos Santos Viana e Erika Pádua Alves.

Referências

CHERYAN, M. Ultrafiltration and microfiltration handbook. United States of America: CRC, 1998.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z. Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: Predicting values to be used in immobilized bioreactors. *J. Chem. Eng. Data*, v.56, p.2305-2309, 2011.

MADRONA, G.S.; TERRA, C.O.; PENHA, C.B. Efeito da substituição do açúcar por oligofrutose em bebida láctea achocolatada. *Rev. Bras. Tecnol. Agroind.*, v.3, p.29-37, 2009.

ROSSETO, B.P.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Determination of the Activity of the Enzyme β -Galactosidase. *BBR*, v.1, n.2, p.28, 2012.

SILVA, C.A.; HERMAN-GOMEZ, R.C. Qualidade protéica do soro de leite fermentado pela levedura *Kluyveromyces fragilis*. *Ciênc. Rural*, v.30, p.515-520, 2000.

VALDUGA, E. *et al.* Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Aliment. Nutr.*, v.17, p.393-400, 2006.