

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GUILHERME GONÇALVES DE GODOY

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LACTASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

LORENA

2016

GUILHERME GONÇALVES DE GODOY

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LACTASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo como requisito
parcial para conclusão da graduação do curso
de Engenharia Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César dos Santos

LORENA

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Godoy, Guilherme Gonçalves de
Estudo da produção de lactase por fungos
filamentosos / Guilherme Gonçalves de Godoy;
orientador Júlio César dos Santos. - Lorena, 2016.
37 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: Júlio César dos Santos

1. Lactase. 2. Beta-galactosidase. 3. Fungos
filamentosos. 4. Lactose. 5. Aspergillus. I. Título.
II. Santos, Júlio César dos, orient.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu nascer em um ambiente estruturado, nunca me deixou faltar nada e me deu saúde para eu poder conquistar tudo que eu desejo.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, me deram todo o suporte necessário e nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar grandes conquistas e realizações.

Ao meu irmão, pelos momentos vividos juntos e pelos ensinamentos de vida passados.

À minha namorada, sempre amiga e companheira, pelo apoio e pelo incentivo incondicional em todos os momentos.

Ao meu padrinho, pelo exemplo de pessoa que foi, pelo incentivo dado e por sempre ter acreditado no meu potencial.

Às minhas tias, tios, primas e avós, por todo o amor e carinho passados.

Aos meus companheiros de graduação, pelos momentos compartilhados e todas as histórias que sempre levarei comigo.

A todos os companheiros de república que tive, pelo companheirismo, pelas experiências e por terem me aturado em todos os momentos.

Aos amigos de São José, pela irmandade, por tantas risadas e por nunca terem me deixado na mão em momento algum.

Aos membros do Diretoria, por todas as aventuras vividas.

Ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos, pela orientação, pela paciência e por todo o auxílio dado para a elaboração deste trabalho.

À Escola de Engenharia de Lorena, por toda a estrutura que me permitiu me graduar como engenheiro bioquímico.

RESUMO

GODOY, G. G. **Estudo da produção de lactase por fungos filamentosos**. 2016. 37 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Engenharia Bioquímica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Muitas pessoas apresentam intolerância à lactose ao redor do mundo. Este problema se desenvolve ao longo da vida e em muitos casos leva a pessoa a evitar alimentos contendo este açúcar. Como alternativa, pode-se incluir na dieta alimentos tratados, em que a lactose presente no meio é hidrolisada pelo uso da enzima lactase. Neste contexto, fez-se um trabalho de revisão da literatura sobre o processo de produção de lactases (β -galactosidases) empregando fungos filamentosos. Foram abordadas as aplicações da enzima e métodos de imobilização, constatando-se que o uso de um suporte adequado pode promover o aumento da estabilidade da enzima e permitir a reutilização do biocatalisador. As propriedades das enzimas produzidas por diferentes espécies foram revisadas, sendo discutida a importância de se escolher corretamente o microrganismo a ser empregado, de modo a garantir que seja produzida uma enzima adequada à aplicação. A análise dos trabalhos mostrou que as propriedades da lactase produzida, como pH e temperatura ótimos, são diretamente influenciadas pela fonte de obtenção da enzima. Mostrou também que diferentes meios de cultura têm sido usados para o cultivo do fungo e produção da lactase, sendo que há a necessidade da presença de lactose no meio, além de fontes de nitrogênio e aminoácidos. Com relação às condições ótimas para o crescimento do fungo e produção da enzima, tem sido relatado que a produção da lactase extracelular se inicia após o crescimento do microrganismo. A temperatura ótima de crescimento do fungo varia dependendo da espécie, porém a de produção da enzima apresenta valor próximo a 30 °C para diferentes microrganismos. Por fim, foram discutidas as etapas empregadas na fase de *downstream*, sendo que, em geral, cromatografia iônica ou de permeação em gel são necessárias para obtenção de um produto com pureza adequada.

Palavras-chave: lactase, β -galactosidase, fungos filamentosos, lactose, *Aspergillus*.

ABSTRACT

GODOY, G. G. **Study of lactase production by filamentous fungi**. 2016. 37 f. Undergraduate thesis in Biochemical Engineering – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

A lot of people have lactose intolerance around the world. This problem develops throughout life and in many cases leads them to avoid foods containing this sugar. Alternatively, treated foods, wherein the lactose present in the medium is hydrolyzed by using the enzyme lactase, may be included in the diet. In this paper, a literature review of the production process of lactases (β -galactosidase) using filamentous fungi was made. Enzyme applications and immobilization methods were discussed, finding that the use of a suitable support can promote increased enzyme stability and allow reuse of the biocatalyst. The features of the enzymes produced by different species were reviewed and the importance of correctly choosing the microorganism to be used was discussed, in order to ensure that a suitable enzyme for the application is produced. Analysis of the studied papers showed that the features of the lactase produced, such as optimum pH and temperature, are directly influenced by the source of the enzyme. It also showed that different culture media are used for growth of fungus and lactase production, and that presence of lactose in the media is required, as nitrogen and amino acids sources also are. The optimal conditions for fungal growth and production of the enzyme were also reviewed, and the analysis showed that the production of extracellular lactase starts after the growth of the microorganism. The optimum temperature for fungal growth varies depending on the species, but the production of the enzyme presents a value close to 30 °C for different microorganisms. Finally, the steps required for the downstream stage were discussed, whereas, generally, ion or gel permeation chromatography are necessary to obtain a purified product.

Keywords: lactase, β -galactosidase, filamentous fungi, lactose, *Aspergillus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase	12
Figura 2 - Representação da síntese de galacto-oligossacarídeos catalisada pela β -galactosidase	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos produtores de lactase	18
Tabela 2 – Propriedades de lactases produzidas por diferentes microrganismos	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. LACTASE	12
2.1. Ação e aplicações	12
2.2. Imobilização de lactases	15
2.3. Microrganismos produtores	17
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LACTASES EMPREGANDO FUNGOS FILAMENTOSOS	20
3.1. Seleção do microrganismo	20
3.2. Meio de cultura	22
3.3. Planejamento e condução do processo	24
3.4. Recuperação e purificação do produto	27
3.5. Problemas com aumento de escala do processo	28
4. TENDÊNCIAS FUTURAS	30
5. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose, um dissacarídeo presente no leite dos mamíferos, é um problema que afeta muitas pessoas ao redor do mundo. Esta disfunção ocorre devido à não produção ou à baixa taxa de produção da enzima lactase por parte do indivíduo. A queda na produção da enzima é um processo natural no envelhecimento do ser humano, e pode ser acelerado de acordo por fatores genéticos. O consumo de lactose por pessoas que apresentam intolerância a este açúcar pode levar a náusea, dor e inchaço na região abdominal, diarreia, entre outros sintomas (SWAGERTY JR; WALLING; KLEIN, 2002; VRESE et al., 2015).

Uma das opções para contornar este problema é o tratamento do alimento com lactase produzida de forma industrial. Neste caso, a lactose não é removida do alimento, mas sim hidrolisada em glicose e galactose, que podem ser absorvidas pelo corpo humano. Além de beneficiar o público que apresenta intolerância ao dissacarídeo, o tratamento com lactase proporciona outros benefícios, já que a glicose e a galactose conferem uma característica mais doce ao alimento em comparação à lactose e, além disso, apresentam menor facilidade de cristalização que o dissacarídeo (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008).

A lactase obtida por meio industrial pode ser produzida por uma vasta gama de microrganismos, mas apresenta limitações de acordo com cada processo. Os processos mais comuns de produção são por via fúngica, utilizando leveduras ou fungos filamentosos. A escolha do método de obtenção depende da utilização da enzima. Enzimas obtidas a partir de fungos filamentosos apresentam melhor atividade em faixas de pH mais baixo, podendo assim ser utilizadas em processos que envolvam meios ácidos. Uma utilização mais recente é produção de cápsulas contendo a enzima (CUNHA et al., 2008). O indivíduo com intolerância deve ingerir a cápsula antes de ingerir leite ou derivados contendo lactose; assim, as enzimas presentes no medicamento irão realizar a hidrólise da lactose presente no alimento dentro do sistema digestivo da pessoa. Para isso é necessário que a enzima tenha boa atividade no pH ácido encontrado no sistema digestivo.

Com relação à produção industrial de lactase, surgem questões importantes a serem consideradas. No caso da produção por fungos filamentosos, por exemplo, há especificidades relacionadas a parâmetros como agitação, aeração e homogeneização do meio. Além disso,

deve-se atentar para o aumento de escala do processo, etapa na qual normalmente ocorre perda de produtividade.

Há também alternativas interessantes para a etapa de hidrólise do alimento, como a utilização de enzima imobilizada, que apresenta algumas vantagens em relação à utilização da enzima livre, como o potencial uso de maior densidade do agente biológico no sistema e a possibilidade de reutilização da enzima e uso em sistema contínuo. Entretanto, a imobilização apresenta alguns virtuais obstáculos, como a aderência de material orgânico nas partículas.

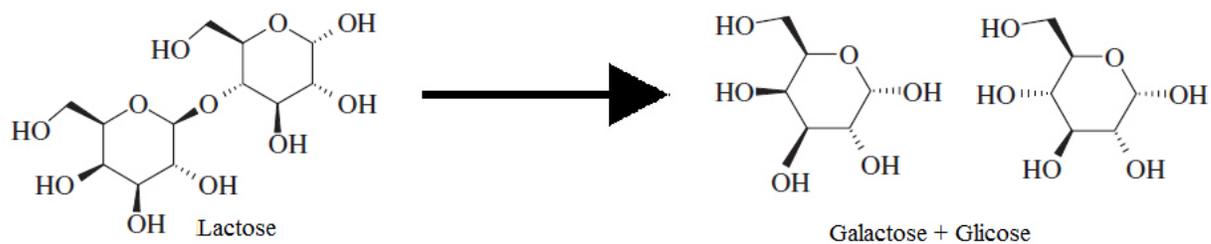
Neste contexto, no presente trabalho serão abordados aspectos referentes à produção industrial da lactase e particularidades da obtenção da enzima através da utilização de fungos filamentosos. Também serão discutidas inovações tecnológicas destes processos e desafios ainda a serem superados.

2. LACTASE

2.1. Ação e aplicações

A β -galactosidase é uma hidrolase, mais conhecida como lactase e representada pelo Enzyme Commission Number E.C. 3.2.1.23, sendo uma enzima que catalisa a hidrólise de terminais não redutores presentes em β -D-galactosídeos (OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011), convertendo assim o dissacarídeo lactose nos monossacarídeos glicose e galactose (Figura 1). Este último monossacarídeo age como um inibidor da reação de hidrólise, fazendo com que a velocidade de reação da conversão diminua conforme ocorre o aumento da concentração de produto no meio (FONTES et al., 2008).

Figura 1 – Representação da hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase.



Adaptado de Ganzle, Haase e Jelen (2008).

Presente em grandes quantidades no leite de mamíferos, a lactase é sintetizada pelas células presentes no intestino do ser humano. Estudos mostram que a atividade desta enzima, que é essencial para a ingestão de leite, decresce com o passar do tempo na vida dos mamíferos (DZIALANSKI et al., 2016). A condição de baixa atividade enzimática da lactase é chamada de “lactase não-persistente”. Estima-se que 75% da população mundial perde a habilidade de digerir lactose ao longo da vida (MATTAR et al., 2012). Com a diminuição da atividade da enzima, o indivíduo que ingerir alimentos contendo lactose pode apresentar sintomas como dores na região abdominal, inchaço, diarreia e outros incômodos. A intolerância à lactose é diagnosticada com o aparecimento destes sintomas. A intensidade com que estes sintomas aparecem depende da quantidade de lactose ingerida. O modo como a lactase não-persistente se desenvolve varia em cada caso, mas é fortemente influenciado por

fatores genéticos. Já a condição de manter os níveis de atividade enzimática da lactase aos níveis do período neonatal é chamada “lactase persistente”. Estima-se que esta condição surgiu a partir de mutações genéticas com o início da utilização do leite animal na alimentação humana. (SWAGERTY JR; WALLING; KLEIN, 2002; CUNHA et al., 2008; RANCIARO et al., 2014; VRESE et al., 2015).

A lactase tem diversas aplicações industriais, sendo considerada uma das mais importantes enzimas na indústria de processamento de alimentos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Um dos maiores usos é na hidrólise da lactose do leite. Além do benefício de se produzir um alimento digerível para a população que apresenta intolerância ao dissacarídeo, este processo também traz outras vantagens. O uso do leite hidrolisado na produção de queijos e iogurtes diminui o tempo gasto na etapa de acidificação, acelerando assim o processo de produção. Além disso, a hidrólise previne a cristalização da lactose no meio (PANESAR et al., 2006).

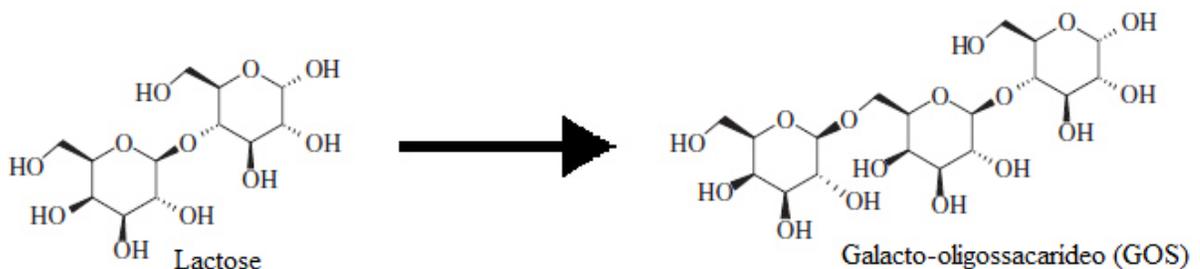
Outra utilização é na hidrólise do soro de leite, um subproduto da produção de queijos. Este processo elimina um composto químico com maior DBO no meio e assim soluciona um problema ambiental, tendo aplicação no tratamento de efluentes. Pode também ser utilizado para produção de alimentos. O hidrolisado concentrado pode, por exemplo, ser empregado como adoçante na produção de refrigerantes e xaropes (PANESAR et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009; GEIGER et al., 2016, no prelo). Para esta aplicação, a lactase utilizada deve apresentar boa atividade em meio ácido, o que vai depender da origem da enzima, conforme será discutido de forma mais detalhada adiante.

Uma nova utilização que também exige boa atividade da enzima em meio ácido é a síntese de cápsulas contendo a enzima, que podem ser ingeridas pela pessoa que apresenta intolerância à lactose. Neste caso, o indivíduo deve ingerir a cápsula imediatamente antes de se alimentar. A enzima atuará dentro do sistema digestivo da pessoa, hidrolisando a lactose do alimento e evitando a ocorrência dos sintomas relativos à intolerância. Através desta técnica, o indivíduo pode consumir alimentos sem se preocupar se estes foram processados para a remoção da lactose (PRAY, 2000; CUNHA et al., 2008).

Uma aplicação mais recente de interesse crescente é a produção de oligossacarídeos. Esta produção ocorre pela reação de transgalactosilação, que converte a lactose presente no

meio em galacto-oligossacarídeos (GOS), como mostrado na Figura 2. GOS são carboidratos com grau de polimerização normalmente entre 3 e 8 e que costumam conter unidades de galactose e um terminal glicose. Na estrutura molecular as unidades de galactose aparecem unidas por ligações β dos tipos (1-3), (1-4) e (1-6), enquanto a ligação galactose-glicose é do tipo β -(1-4). Os GOS possuem alto valor agregado e apresentam um efeito benéfico à microflora intestinal, podendo assim ser utilizados na produção de alimentos prebióticos. Este benefício nutricional está associado principalmente à presença de GOS trissacarídeos (GOS-3) e tetrassacarídeos (GOS-4). Estudos relacionam o consumo de GOS a reduções de distúrbios intestinais, maior absorção de minerais e diminuição de colesterol (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011; GEIGER et al., 2016, no prelo). O processo de produção de GOS vem sendo estudado e lactases de diferentes fontes vêm sendo empregadas. A enzima produzida por fungos do gênero *Aspergillus* desperta interesse pelo alto rendimento de produção de GOS-3 e GOS-4. A maior desvantagem do processo é o baixo rendimento da produção. Assim, torna-se necessária uma etapa eficiente de purificação, visando também separar os açúcares residuais lactose, glicose e galactose. Esta etapa, feita normalmente por cromatografia, é o que mais encarece o processo, e diversas alternativas têm sido estudadas (ALBURTO et al., 2016; LEEUWEN et al., 2016). A produção de GOS pela transgalactosilação enzimática pode ser favorecida, entre outros fatores, por altas concentrações de lactose no meio, gerando uma disponibilidade reduzida de água como acceptor do galactosil (GANZLE, 2012).

Figura 2 – Representação da síntese de galacto-oligossacarídeos catalisada pela β -galactosidase.



Adaptado de Ganzle, Haase e Jelen (2008).

2.2. Imobilização de lactases

Ao longo das últimas décadas, o uso da lactase imobilizada vem despertando grande interesse. Esta tecnologia permite certos benefícios ao sistema, como a possibilidade de reutilização da enzima e de aplicação de processo contínuo, uso de maior densidade do catalisador no reator, potencial aumento da estabilidade enzimática frente a valores mais drásticos de temperatura e pH, além de evitar a necessidade de uma fase de separação do agente biológico ao final do processo (MAI; TRAN; LE, 2013). No caso da enzima, existem três técnicas mais empregadas de imobilização: por adsorção física, aprisionamento em gel e por ligação covalente. A técnica e o suporte utilizado influenciam diferentemente nos parâmetros cinéticos da reação enzimática. (SHEN et al., 2016).

A técnica de imobilização por adsorção física consiste na ligação do catalisador ao suporte por força física, principalmente forças de van der Waals. Também podem ocorrer interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e até ligação iônica. A adsorção física, que é o método mais antigo e o mais simples de ser executado, tem como vantagens a facilidade de aplicação e a baixa interferência na conformação espacial do catalisador, comparado aos outros métodos. Todavia, este método apresenta como desvantagem a baixa força da ligação adsorptiva (SHEN et al., 2016). Diversos suportes são utilizados para a imobilização da β -galactosidase. A enzima obtida a partir de fungos filamentosos tem sido utilizada imobilizada em PVC e membrana de sílica gel, para a hidrólise de leite, em reatores tubulares. Em geral, as lactases obtidas a partir de leveduras apresentam maior atividade enzimática em relação às de fungo, quando na forma imobilizada; entretanto, apresentam menor estabilidade operacional (PANESAR et al., 2006).

Albuquerque et al. (2016) estudaram a imobilização de lactase proveniente de *Aspergillus oryzae* em um suporte de agarose aminado, sob diferentes valores de pH e de força iônica relativa ao tampão empregado, o acetato de sódio. Notou-se que, em valores maiores de força iônica no meio, o rendimento de imobilização foi menor, devido à competição dos íons do tampão e da enzima pelo suporte. Este efeito foi minimizado em valores de pH menores, próximos a 5,0. O estudo também mostrou que, em valores de pH mais altos, próximos a 9,0, a enzima imobilizada apresentou estabilidade menor até que a da enzima livre, mostrando uma limitação deste suporte em seu uso para imobilização.

A imobilização por aprisionamento em gel é um método que costuma ser mais utilizado para células inteiras do que propriamente para enzimas livres. Os materiais mais apropriados para matriz são polímeros naturais, como alginato, pectina e ágar, entre outros. A principal vantagem deste método é a facilidade da confecção das partículas, que ocorre por gotejamento da matriz polimérica junto ao catalisador em um meio contendo cargas iônicas positivas, além da possibilidade de confecção das partículas por via térmica. Além disso, as partículas formadas apresentam em geral boa estabilidade mecânica, principalmente as obtidas a partir de alginato. Outra alternativa é o uso de lactases imobilizadas em álcool polivinílico, resultando em maior resistência a temperatura e pH mais drásticos, em comparação à enzima livre (MAI; TRAN; LE, 2013; ZHANG et al., 2016).

Mai, Tran e Le (2013) estudaram os efeitos da utilização da enzima imobilizada em uma matriz de alginato-CMC. A lactase imobilizada, proveniente do fungo *Aspergillus oryzae*, apresentou melhora considerável na estabilidade térmica e estabilidade em relação ao pH, quando comparada à enzima livre. Em 55 °C, valor próximo do ideal para utilização desta enzima, a perda de atividade ao longo do tempo foi diminuída em cerca de 50%, após a imobilização. Efeito similar foi notado em valores de pH ácidos, como 4,5 e 5,5, nos quais a atividade da lactase obtida por esta fonte é considerada alta. No estudo notou-se que os resultados obtidos de estabilidade da enzima e rendimento da imobilização empregando a matriz alginato-CMC foram melhores que os obtidos com a matriz contendo apenas alginato.

A terceira técnica é a por ligação covalente. Esta técnica é muito utilizada para imobilização enzimática, mas é pouco apropriada para imobilização de células. A conexão entre o catalisador e o suporte ocorre pelo grupo funcional da enzima que não é essencial para a atividade enzimática desta. Para isso, é recomendável realizar a imobilização na presença de substrato ou de inibidor competitivo, para proteger o sítio ativo e evitar mudanças conformacionais prejudiciais na enzima (ALBUQUERQUE et al., 2016). Como vantagens, esta técnica apresenta forte interação entre o catalisador e o suporte, além da enzima poder interagir mais facilmente com o substrato, devido a esta estar na superfície do suporte. Entretanto, há desvantagens como custo elevado e a perda de atividade devido à maior exposição da enzima a reagentes tóxicos e condições severas de reação, muitas vezes empregados. Lactases fúngicas vem sido imobilizadas em mistura de nylon-6 triturado e

zeólitas. Em alguns suportes, como amino-epóxi, notou-se diminuição de inibição por produto da reação enzimática (KOSSEVA et al., 2009; TALBERT; HOTCHKISS, 2012).

2.3. Microrganismos produtores

A β -galactosidase pode ser obtida a partir de diferentes origens, que incluem fontes vegetais (como amêndoas e frutos), fontes animais (através de órgãos de animais) e microrganismos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). A fonte pela qual a enzima é obtida influencia diretamente em suas propriedades, como a atividade enzimática em diferentes faixas de pH e temperatura. A via de obtenção por microrganismos é a mais comum, principalmente pelo fácil manuseio, pela alta taxa de reprodução e pela alta taxa de rendimento apresentada, em comparação às outras fontes (RINGS et al., 1994).

Existe uma grande gama de espécies de microrganismos que sintetizam a lactase, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Tabela 1). Muitos destes microrganismos vêm sendo alvo de pesquisas, devido à procura por enzimas que melhor atendam às necessidades da posterior aplicação do biocatalizador. Pelo mesmo motivo, diversas destas espécies vem sendo estudadas com enfoque no melhoramento genético do produtor da enzima. Como a lactase é uma enzima que tem seu maior uso na indústria alimentícia, a sua fonte deve ser muito bem escolhida para garantir fatores higiênicos à produção. A bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, é o microrganismo que apresenta a lactase mais estudada, devido à presença do gene *lacZ*, entretanto não é considerada apropriada para a produção da enzima devido a problemas de toxicidade relacionados ao procarioto. Todavia, a enzima é encontrada comercialmente, principalmente para propósitos analíticos (PANESAR et al., 2006; ZHANG et al., 2016).

As lactases mais utilizadas na indústria são obtidas a partir de leveduras, principalmente as do gênero *Kluyveromyces*, e a partir de fungos filamentosos, com destaque para os do gênero *Aspergillus*. Este maior índice de utilização se deve a altos valores de produtividade e de rendimento no cultivo destes microrganismos. Além disso, estes microrganismos não geram produtos considerados tóxicos para o ser humano (OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011).

Tabela 1 – Microrganismos produtores de lactase

Classificação	Gêneros
Bactéria	<i>Arthrobacter, Bacillus, Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Propionibacterium, Pseudomonas, Pseudoalteromonas, Streptococcus, Sulfolobus, Thermoanaerobacter, Thermus, Vibrio, Xanthomonas</i>
Levedura	<i>Bullera, Candida, Saccharomyces, Kluyveromyces</i>
Fungo (filamentoso)	<i>Alternaria, Aspergillus, Auerobasidium, Beauveria, Curvularia, Fusarium, Mucor, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Rhizobium, Saccharopolyspora, Scopulariopsis, Streptomyces, Trichoderma</i>

Adaptado de Panesar et al. (2006).

A lactase produzida pelo gênero *Kluyveromyces* apresenta pH ótimo próximo ao neutro (6,0-7,0), o que a torna ideal para aplicações que demandam pH neutro, como tratamento do leite. A enzima produzida é intracelular, não sendo excretada pelo microrganismo. Neste caso, a lactose é transportada ao interior celular por uma permease e posteriormente hidrolisada. O fato da enzima produzida ser intracelular faz com que sejam necessários processos químicos ou mecânicos de extração da enzima (FONTES et al., 2008; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011).

Já a lactase proveniente do gênero *Aspergillus* apresenta pH ótimo em faixa ácida (2,5-5,4) e apresenta boa atividade em altos valores de temperatura, sendo utilizada em

processos com temperaturas acima de 50°C. Estas características a tornam excelentes para utilização em processos como tratamento do soro de leite e outras aplicações que exigem pH ácido. Este gênero também se destaca por excretar a enzima ao meio extracelular. Lactases produzidas por *Aspergillus niger* apresentam valores de K_m entre 85 e 125 mmol/L para lactose (PANESAR et al., 2006; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011; MAI; TRAN; LE, 2013).

Assim, o emprego de fungos filamentosos como produtores de lactase surge como grande potencial, devido à produção de enzimas com capacidade de utilização em meio ácido, à capacidade do fungo de excretar a enzima produzida para o meio – o que facilita o processo de recuperação da enzima – e à estabilidade da enzima produzida em temperaturas elevadas, possibilitando o emprego destas enzimas em processos que utilizem altos valores de temperatura.

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LACTASES EMPREGANDO FUNGOS FILAMENTOSOS

A produção de um composto por via fermentativa deve ser planejada de acordo com as necessidades do microrganismo produtor e de acordo com o produto de interesse envolvido. O êxito da produção depende de 4 etapas sequenciais. Primeiramente, deve-se selecionar o microrganismo a ser utilizado. Para isso, é importante levar em consideração fatores como a taxa de crescimento do microrganismo, a taxa de produção do composto de interesse e as condições que este microrganismo requer para produzi-lo, além das propriedades que o composto apresentar. A etapa seguinte envolve estabelecer o meio de cultura apropriado para o cultivo. Deve-se determinar os nutrientes requeridos para o crescimento do microrganismo e as substâncias necessárias para se maximizar a produção do composto de interesse. A terceira etapa compreende planejar a forma de condução do processo, sendo necessário definir o tipo de reator utilizado e o modo de agitação e aeração. Por fim, no que concerne à fase de downstream do processo, devem-se definir as estratégias de recuperação do produto e de possível reutilização do microrganismo (SCHMIDELL et al., 2001).

3.1. Seleção do microrganismo

No caso da produção de lactase, a correta seleção da espécie de microrganismo a ser empregada é importante principalmente para se obter o produto de interesse com as características e propriedades desejadas. As particularidades que a enzima apresentará, como a atividade enzimática e a estabilidade em diferentes valores de temperatura e pH irá variar de acordo com a escolha do microrganismo. Logo, esta escolha deve ser realizada segundo a utilização comercial pretendida para a enzima. Além das propriedades da enzima, outros fatores são utilizados na seleção da espécie, como a taxa de reprodução celular, a taxa de produção da enzima por parte do microrganismo e a excreção da enzima para o meio extracelular. Estes fatores são importantes principalmente tendo em vista o custo financeiro da produção (CRISAN et al., 1977; HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

Seyis e Aksoz (2004), por exemplo, realizaram o cultivo de 13 diferentes espécies de fungos, dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Fosarium*. Estes fungos foram escolhidos por produzirem lactases extracelulares de modo eficiente. Foram medidas as atividades enzimáticas e as estabilidades térmicas e de pH das enzimas produzidas, além da taxa de crescimento de cada fungo. Os fungos que apresentaram maiores valores de taxa de crescimento foram do gênero *Aspergillus*, seguidos dos do gênero *Rhizopus*. Apesar disso, os fungos do gênero *Rhizopus* produziram lactases com baixos valores de atividade enzimática, quando comparados aos outros, enquanto as produzidas pelo gênero *Aspergillus* apresentaram valores intermediários. Ainda neste estudo, as enzimas que apresentaram maiores valores de atividade enzimática foram as produzidas por fungos do gênero *Trichoderma*, ao mesmo tempo que estes fungos apresentaram os valores mais baixos de taxa de crescimento. As lactases produzidas por este gênero também apresentaram boa resistência em faixas mais largas de pH, mostrando o potencial destes para uso visando à produção comercial. O estudo também destacou a alta estabilidade térmica das enzimas produzidas pelos fungos filamentosos em comparação às produzidas por leveduras, um fator importante a se considerar na produção industrial, na qual os sistemas de resfriamento podem elevar o preço da produção e, além disso, trabalhar sob temperaturas mais altas pode aumentar as velocidades de conversão e diminuir problemas com contaminação.

Em outro estudo, Harju, Kallioinen e Tossavainen (2012) reuniram informações sobre propriedades das lactases provenientes de diferentes fontes microbianas (Tabela 2). As espécies de fungos filamentosos estudadas foram *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Mesmo dentro do mesmo gênero, as características apresentadas foram diferentes. A primeira espécie citada apresentou lactases com maior peso molecular e com pH ótimo na faixa 3,0-4,0, enquanto que as lactases provenientes da segunda espécie mostraram pH ótimo na faixa 5,0-6,2. As temperaturas de operação das duas espécies apresentaram valores similares, próximos a 55 °C, o que é elevado quando comparado ao empregado na produção de enzimas usando leveduras e bactérias.

Tabela 2 – Propriedades de lactases produzidas por diferentes microrganismos

Microrganismo produtor	Massa molecular (x 10 ³)	pH ótimo	Temperatura de operação (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	124	3,0-4,0	55-60
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5,0-6,2	50-55
<i>Kluveromyces lactis</i>	228	6,5-7,3	35
<i>Kluveromyces fragilis</i>	201	6,6	37
<i>Escherichia coli</i>	464	7,2	40
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	540	6,2-6,6	55
<i>Streptococcus thermophilus</i>	464	7,1	55

Adaptado de Harju, Kallioinen e Tossavainen (2012).

Após a devida escolha do microrganismo, o planejamento da produção segue para as etapas subsequentes, como determinar o meio de cultura com os componentes necessários à espécie selecionada, definir as condições requeridas durante o cultivo e produção enzimática, realizar o desenho de toda a engenharia necessária para se realizar a produção, e estabelecer as estratégias necessárias para as etapas de downstream.

3.2. Meio de cultura

O meio de cultura que será utilizado para o cultivo do microrganismo e a produção da enzima deve ser definido de acordo com as necessidades da espécie escolhida. Nele devem estar presentes todos os nutrientes necessários para a devida sobrevivência do microrganismo e para a produção do composto de interesse. Estes nutrientes variam de acordo com a espécie a ser cultivada. Deste modo, os compostos que constituem o meio de cultura devem ser determinados estudando-se o microrganismo a ser utilizado (GOURAMA, 1995).

O fungo produtor da enzima necessita de uma fonte de carbono, aminoácidos, sais minerais, e eventualmente ácidos graxos e vitaminas. Como fonte de carbono, visando a produção da β -galactosidase, a lactose é comumente empregada. A quantidade deste composto no meio pode ser variada, e esta alteração acarreta em diferentes quantidades de

enzima produzida. Oliveira et al. (2011) reuniram valores de rendimento de produção de lactase em diferentes quantidades de lactose no meio, variando de 1% a 15% (m/v), utilizando *Aspergillus niger*. O estudo apresentou resultado crescente, próximo ao linear, da produção da enzima em relação à concentração de lactose no meio.

Os outros compostos presentes podem variar. Asparagina e peptona podem ser utilizados pelo microrganismo como fonte de nitrogênio. Existe também a necessidade de se adicionar um tampão ao meio, de modo a garantir o pH ideal ao fungo. Fosfato de potássio e citrato de sódio vem sendo eficientemente empregados, de acordo com o valor de pH escolhido para o processo. O uso de uma solução ácida ou alcalina no meio também pode ser realizado para correção do pH ao longo do processo. Íons metálicos como ferro, zinco e manganês, além de sais como cloreto de potássio e sulfato de magnésio, podem ser necessários para regular as atividades microbianas e manter a pressão osmótica do meio (CRISAN et al., 1977; SEYIS; AKSOZ, 2004; SMITHEE et al., 2014).

Cavka e Jonsson (2014) estudaram o cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em hidrolisado proveniente de material lignocelulósico de uma conífera norueguesa. No estudo foram utilizadas diferentes diluições do hidrolisado, e os resultados foram comparados a dados presentes na literatura para monossacarídeos, a fim de se determinar parâmetros de consumo de nutrientes e inibição. Neste estudo, além dos nutrientes já citados anteriormente, foi adicionado ao meio extrato de levedura, visando fornecer vitamina B e uma fonte adicional de nitrogênio e carbono. Os fungos apresentaram bom consumo dos diversos sacarídeos presentes. O crescimento do *T. reesei* apresentou valores satisfatórios em concentrações baixas de hidrolisado, enquanto que os valores apresentados pelo *A. niger* foram mais elevados em concentrações maiores de hidrolisado, evidenciando que cada microrganismo reage de modo diferente, de acordo com o meio de cultura. Neste estudo o hidrolisado lignocelulósico surge como potencial para o processo, englobando também o conceito de biorrefinaria.

Um fator importante na determinação do meio de cultura é a viscosidade do meio. Meios mais viscosos dificultam a transferência de massa e a agitação (no caso de reatores), ocasionando dificuldades na aeração do sistema. Deste modo, o uso de compostos que possam

aumentar a viscosidade deve ser avaliado de modo a não gerar empecilhos ao desenvolvimento da produção (SMITHEE et al., 2014).

Certas espécies de fungos excretam a enzima produzida, ou seja, produzem a lactase extracelular. Outras espécies produzem a enzima de modo majoritariamente intracelular. Nestes casos pode ser feito o uso de um permeabilizador. Esta ferramenta facilita a recuperação do produto e diminui os custos da posterior etapa de purificação. Agentes detergentes tais como digitonina e CTAB e solventes como clorofórmio e etanol vem sendo empregados como agentes permeabilizantes em baixas concentrações. O uso de concentrações a partir de 30% (v/v) pode acarretar na perda do processo (PANESAR et al., 2006).

Fiedurek, Gromada e Jamroz (1996) estudaram a influência da presença de diferentes compostos no meio de cultura no cultivo do fungo *Penicillium notatum*, com foco na produção de lactase e no crescimento do microrganismo. Entre os fatores estudados, examinou-se a secreção da enzima produzida de acordo com cada meio proposto. Os resultados apresentados mostraram que a taxa de produção da enzima foi maior em valores ácidos de pH, sendo que o maior valor foi obtido em pH 2,5. No estudo foram propostos dois compostos salinos no meio: sulfato de magnésio e cloreto de cálcio. A presença de apenas um destes sais gerou resultados muito baixos, em contraponto aos resultados obtidos com a presença dos dois sais, mostrando uma dependência do fungo estudado por ambos os sais. A fonte de nitrogênio estudada que apresentou melhores resultados no estudo foi o fosfato de amônio monobásico, superando inclusive os resultados obtidos empregando-se fontes orgânicas como peptona e ureia. Quanto à secreção analisada no estudo, foram obtidos resultados satisfatórios. Apesar de o microrganismo do estudo ter produzido lactase extracelular numa concentração de cerca de quatro vezes o que foi produzido de lactase intracelular sem adição de nenhum composto, a adição de brometo de etídio e de 2,4-dinitrofenol em baixas concentrações aumentou em até 50% a secreção da enzima pelo fungo.

3.3. Planejamento e condução do processo

O processo de produção da lactase deve atender às necessidades de utilização do produto, do microrganismo utilizado e do interesse do produtor, sobretudo o financeiro. Para

isso, toda a engenharia do processo deve ser planejada de modo a garantir o sucesso da geração do produto e satisfazer aos objetivos da produção. Este sucesso depende de se conseguir estabelecer um sistema no qual o microrganismo possa apresentar alta taxa de crescimento e de produção da lactase e baixo tempo de fermentação necessário. Este último fator pode afetar os custos e lucros obtidos com a produção e é assim fundamental para o processo. É importante também avaliar a produção de outras enzimas por parte do fungo, que podem não ser do interesse inicial da produção, mas podem ser recuperadas e comercializadas, aumentando os lucros do processo. A espécie *Aspergillus niger*, por exemplo, pode excretar hemicelulases, celulases e proteases no meio (MUSTRANTA et al., 1981; PANESAR et al., 2006).

A engenharia que envolve a produção deve ser desenhada e projetada em torno das necessidades do microrganismo que será utilizado. O meio de cultura deve ser preparado, com as proporções já pré-estabelecidas e que contenham os compostos exigidos pela espécie utilizada, conforme anteriormente discutido. O meio deve ser esterilizado para atender a fatores assépticos exigidos pelo fungo. É importante salientar que, na escolha das fontes de nutrientes disponibilizadas ao microrganismo, é necessário considerar o preço deste nutriente e a possibilidade de se utilizar algum composto alternativo que tenha um custo menor. Como fonte de nitrogênio, por exemplo, compostos inorgânicos, como fosfato de amônio, podem substituir a peptona, que apresenta um elevado custo para utilização industrial. Substâncias mais baratas, como farelo de trigo ou o próprio soro do leite, também podem ser utilizados e seus usos são relatados em diversos trabalhos (MACRIS, 1981; MUSTRANTA et al., 1981; PANESAR et al., 2006).

A escolha do reator a ser utilizado é crucial para o desenvolvimento do processo. Ela influenciará em fatores complexos do sistema, como aeração e agitação. Por motivos logísticos e de acordo com resultados previamente obtidos, a melhor opção para se desenvolver o cultivo do fungo e a produção da enzima é por fermentação submersa. Nesta condição, fungos filamentosos podem apresentar crescimento em duas formas diferentes: em morfologia dispersa, com hifas livres e granulados microscópicos, ou agregados de hifas esféricas, nos quais as hifas aparecem conformadas em granulados macroscópicos, que podem apresentar diâmetro de até alguns milímetros. A forma de crescimento do fungo afeta a

produção de metabólitos primários e secundários; entretanto, a maneira como afeta a produção de lactase e como cada forma é gerada ainda não é bem determinada. (GONCIARZ; KOWALSKA; BIZUKOJC, 2016).

A questão da agitação é um problema pois o uso de sistemas convencionais pode provocar a ruptura das hifas do fungo e assim prejudicar o seu cultivo e a produção enzimática. Este fator limita o emprego da agitação mecânica do processo. Neste caso, além da opção de se utilizar um agitador mecânico sob baixas rotações, o que pode não ser muito eficiente, surge a alternativa de se utilizar um reator do tipo “airlift”, em que a aeração é realizada de modo mais vigoroso e a agitação é realizada pela própria aeração. Oliveira, Guimarães e Domingues (2011) estudaram a utilização deste reator em comparação ao reator descontínuo com baixa agitação e obtiveram resultados melhores no reator *airlift*, visando à produção enzimática. Já Castillo, Blanch e Wilke (1984) estudaram a produção de lactase extracelular por *Trichoderma reesei* em meio com lactose utilizando agitação mecânica com alta rotação (1000 rpm) em reator do tipo descontínuo, e obtiveram baixa produção enzimática; entretanto, a razão entre a produção de enzima extracelular em relação à enzima intracelular foi maior que o esperado, justificado pelos autores como consequência da agitação e do resultante rompimento das hifas.

O modo como o cultivo do microrganismo é realizado influencia a geração do produto. Estudo realizado por Mustranta et al. (1981) mostra que a produção da lactase extracelular pelos fungos do gênero *Aspergillus* se inicia após o máximo crescimento do microrganismo, no momento em que o pH atinge o ponto mínimo. Como as temperaturas ótimas de cultivo do microrganismo e de produção da enzima variam ligeiramente, é possível utilizar uma temperatura para cada etapa do processo. O pH ótimo para o crescimento do fungo estudado é em torno de 5,0, e temperatura ótima em torno de 34 °C. A temperatura pode aumentar a velocidade do processo, entretanto valores de temperatura mais altos podem prejudicar a produção da lactase (o cultivo do fungo em valores como 36 °C já gera diminuições na taxa de produção da enzima). Alguns estudos mostraram temperaturas ótimas de cultivo em torno de 30 °C para *Fusarium moniliforme* e para *Trichoderma reesei* (MACRIS, 1981; CASTILLO; BLANCH; WILKE, 1984; SEYIS; AKSOZ, 2004). A temperatura ótima para a etapa de

excreção da enzima é, em geral, 30 °C (MUSTRANTA et al., 1981; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011).

Para fins de mudança de temperatura, o início da produção da enzima extracelular pode ser medido pelo acompanhamento da atividade enzimática de amostras coletadas do meio, e a taxa de crescimento celular pode ser medida pelo acompanhamento da liberação de gás carbônico do meio. A duração de cada etapa depende do microrganismo utilizado, das temperaturas empregadas e das fontes de nutrientes utilizados. Assim, o processo pode levar de três a seis dias. Deve-se finalizar a produção quando a atividade enzimática do meio for alta e os materiais insolúveis do meio ainda puderem ser removidos por filtração. A partir de então, o resultante deve ser encaminhado para etapas de recuperação e purificação do produto. Durante todo o decorrer do processo deve ser feito o acompanhamento do pH e da temperatura do meio e das concentrações dos nutrientes requeridos pelo microrganismo, de modo a não faltar algo primordial à produção e não a prejudicar (MACRIS, 1981; MUSTRANTA et al., 1981; CASTILLO; BLANCH; WILKE, 1984; SEYIS; AKSOZ, 2004; GONCIARZ; KOWALSKA; BIZUKOJC, 2016).

3.4. Recuperação e purificação do produto

Após a finalização da etapa de cultivo do fungo e produção da enzima, o meio contendo as hifas, a lactase extracelular e outros compostos deve ser encaminhado para a fase de recuperação e purificação da enzima produzida. Esta etapa é uma das responsáveis pelo encarecimento do processo, devido à dificuldade de se separar a enzima de interesse do restante e à necessidade de se gerar um produto de qualidade com alto grau de pureza (PANESAR et al., 2006).

No caso da produção da enzima extracelular, o meio líquido deve ser separado das partículas sólidas, e então a enzima dissolvida no meio pode ser precipitada, utilizando um agente que aumente a força iônica e provoque a precipitação da proteína, como o sulfato de amônio. Entretanto, a lactase não é a única proteína que se precipita com esta técnica. Em seguida, utiliza-se filtração ou centrifugação para separar este precipitado. A lactase pode então ser purificada das outras proteínas presentes por etapas de cromatografia de troca iônica

ou de permeação em gel. Após a purificação, a enzima pode ser conservada em diferentes formas dependendo da aplicação desejada. Uma alternativa é realizar o processo de imobilização da enzima, garantindo assim a manutenção da atividade enzimática desta. As enzimas presentes no meio intracelular também podem ser recuperadas, empregando a quebra mecânica das hifas. Este processo dificulta as etapas de filtração, devido à maior quantidade de fragmentos celulares presentes (CRISAN et al., 1977; BOERIS et al., 2012).

Boeris et al. (2012) estudaram a utilização de adsorção em leite expandido como uma operação para separação e concentração da lactase do meio, de modo a simplificar o processo de downstream. Os resultados mostraram que esta técnica pode ser utilizada para gerar um produto concentrado, com grau de pureza intermediário, sendo necessária uma etapa posterior de cromatografia para alcançar um maior grau de pureza do produto.

3.5. Problemas com aumento de escala do processo

O aumento de escala na produção é interessante comercialmente, já que aumenta a quantidade de produto gerado e conseqüentemente os ganhos com a produção. Em geral, uma produção realizada em maior escala apresenta menores gastos por quantidade de produto gerado que uma produção realizada em menor escala. Entretanto, processos realizados em maior escala trazem agravantes ao controle do sistema. A medição de parâmetros como pH, temperatura e concentração de nutrientes tornam-se mais complicadas, ao mesmo tempo em que homogeneização do meio é mais difícil (COUTO et al., 2016).

No caso da produção de lactase por fungos, deve-se assegurar que o fungo empregado está tendo acesso a todos os nutrientes necessários, além de devida oxigenação. Estes fatores podem ser empecilhos devido à já discutida dificuldade com a agitação do meio. Frente a isto, surge outro obstáculo que é a transferência de massa e energia no meio. Se a agitação no meio for ineficiente podem ocorrer regiões no meio com diferentes temperaturas, pH's, ou concentrações de oxigênio e gás carbônico e nutrientes. Estes fenômenos podem levar a complicações com a produção e medições de dados incorretos durante o processo (TUFVESSON et al., 2010). Mustranta et al. (1981), em seu estudo envolvendo a produção de lactase por *Aspergillus niger*, realizaram experimentos em escala laboratorial, em reator de

bancada, e em escala industrial, em reator de 115 m³. As condições dos experimentos foram otimizadas, de modo a produzir o máximo possível de lactase. Ao fim, os resultados obtidos em escala industrial foram similares aos obtidos em escala laboratorial.

4. TENDÊNCIAS FUTURAS

O emprego de lactase como agente biológico para hidrólise da lactose em produtos alimentícios vem crescendo, visando suprir a necessidade dos consumidores que apresentam intolerância a este dissacarídeo. Conseqüentemente, a produção desta enzima vem apresentando cenário de crescimento, e o complexo processo de produção surge como potencial de estudo para melhoramento e aprimoramento em diferentes etapas.

A busca de novos microrganismos para produção da enzima é uma das maiores tendências para o processo. Apesar de poucos microrganismos serem utilizados comercialmente para produção da lactase, principalmente leveduras do gênero *Kluyveromyces* e fungos do gênero *Aspergillus*, diversas outras fontes microbiológicas vêm sendo estudadas para esta aplicação e surgem como potencial. Estudos que envolvam engenharia genética são necessários, visando mesclar características de microrganismos que apresentam altas taxas de crescimento e produção e facilidade no cultivo, com enzimas produzidas que apresentam boa atividade e estabilidade sob as condições físico-químicas às quais serão utilizadas.

Quanto ao desenvolvimento do processo, estudos do aperfeiçoamento das etapas de produção visam aumentar o rendimento das etapas e baratear a produção da enzima. O enfoque se dá na tentativa de utilizar meios de cultura mais baratos, mas que ainda assim atendam às necessidades do microrganismo e favoreçam a produção enzimática, e na busca por maneiras de se simplificar a fase de *downstream* do processo, minimizando as etapas de recuperação e purificação da lactase, mas garantindo um produto de qualidade e alto grau de pureza. A busca por técnicas aprimoradas de imobilização da enzima também aparece com interesse comercial.

Outra tendência é a utilização do soro de leite, um dos subprodutos da produção de queijos, para produção de alimentos com maior valor agregado, visto que boa parte do soro produzido é descartado ou utilizado como ração animal. Este subproduto, de pH ácido, necessita de uma enzima que apresente boa atividade em pH ácido e assim justifica a produção por fungos filamentosos.

Assim, a produção de lactase por fungos filamentosos apresenta contexto de crescimento para o futuro, com diferentes possibilidades de aplicação e utilização da enzima.

5. CONCLUSÕES

A intolerância à lactose é um problema que afeta muitas pessoas ao redor do mundo. A incidência deste problema é afetada por fatores genéticos, sendo que em certas civilizações, como na japonesa, é mais comum os indivíduos perderem a capacidade de digerir a lactose. Frente a isso, os alimentos tratados com lactase, visando a hidrólise da lactose em compostos que possam ser absorvidos, surge como alternativa.

A lactase é uma enzima que catalisa a hidrólise da lactose em galactose e glicose. A enzima pode ser obtida por várias fontes, incluindo microrganismos. A procedência da lactase influencia diretamente suas propriedades, como atividade enzimática, temperatura e pH ótimos, massa molecular e valor da constante de Michaelis-Menten. Lactases provenientes de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* despertam interesse pois apresentam boa atividade em valores de pH baixos e temperaturas elevadas, além de serem excretadas pelo fungo. Outros fungos filamentosos, como os do gênero *Trichoderma*, surgem como potencial para produção enzimática.

Diferentes técnicas são empregadas para imobilizar a lactase, dependendo da aplicação desejada. A enzima imobilizada apresenta maior estabilidade e resistência a condições de aplicação severas. Além disso, o emprego da enzima imobilizada permite a reutilização desta em novo processo.

O sistema de produção da lactase deve ser modelado de acordo com as necessidades do microrganismo empregado. O meio de cultura deve conter os nutrientes necessários para seu crescimento e produção da enzima de interesse. O fungo filamentoso empregado depende, dentre outros compostos, da presença de lactose para produção da enzima e de uma fonte de nitrogênio e aminoácidos. Podem ser utilizados substratos de baixo valor agregado, visando diminuir os custos da produção.

O desenvolvimento do cultivo e da produção enzimática devem ser acompanhados e aprimorados, de modo a contornar potenciais problemas gerados com a limitação de agitação mecânica no meio, devido à vulnerabilidade das hifas do fungo. Deve-se atentar para que haja a devida transferência de massa e energia no meio e o fungo tenha acesso aos nutrientes disponíveis. A produção da enzima extracelular se inicia após a fase de crescimento do fungo,

e pode ser realizada em temperatura diferente da fase de cultivo para maximizar a produção da lactase. O acompanhamento do processo pode ser realizado de acordo com as concentrações dos nutrientes e substratos presentes no meio e com a liberação de gás carbônico do sistema.

Diversas operações podem ser realizadas na fase de *downstream* do processo, envolvendo etapas de filtração, centrifugação e cromatografias. Esta fase é uma das encarecedoras do processo e pode ser aperfeiçoada visando diminuir o número de etapas necessário para recuperar e purificar a lactase produzida.

O uso de fungos filamentosos surge como grande possibilidade de produção comercial de lactases, uma vez que produz enzimas com estabilidade em altas temperaturas e propriedades específicas para aplicação em meio ácido, podendo ser utilizadas em soro de leite e outros meios que apresentem essa exigência. Além disso, o fato das lactases produzidas serem extracelulares desperta interesse por facilitar o processo de recuperação das enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCHELLA, A.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; LAFUENTE, R. F. Ion Exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 875-880, 2016.

ALBURTO, C.; GUERRERO, C.; VERA, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galacto-oligosaccharides in batch operation. **LWT – Food, Science and Technology**, v. 72, p. 81-89, 2016.

BOERIS, V.; BALCE, I.; VENNAPUSA, R. R.; RODRÍGUEZ, M. A.; PICÓ, G.; LAHORE, M. F. Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B**, v. 900, p. 32-37, 2012.

CASTILLO, F. J.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Lactase production in continuous culture by *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 9, p. 593-596, 1984.

CAVKA, A.; JONSSON, L. J. Comparison of the growth of filamentous fungi and yeasts in lignocellulose-derived media. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 197-204, 2014.

COUTO, N.; SILVA, V. B.; BISPO, C.; ROUBOA, A. From laboratorial to pilot fluidized bed reactors: Analysis of the scale-up phenomenon. **Energy Conversion and Management**, v. 119, p. 177-186, 2016.

CRISAN, E. V.; SORENSEN, S. G. **Production and utilization of lactase**. U.S. Pat. 4007283, 8 fev. 1977. 11 p.

CUNHA, M. E. T.; SUGUIMOTO, H. H.; OLIVEIRA, A. N.; SIVIERI, K.; COSTA, M. R. Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas. **Journal of Health Sciences**, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.

DZIALANSKI, Z.; BARANY, M.; ENGFELDT, P.; MAGNUSON, A.; OLSSON, L.; NILSSON, T. K. Lactase persistence versus lactose intolerance: Is there an intermediate phenotype? **Clinical Biochemistry**, v. 49, p. 248-252, 2016.

FIEDUREK, J.; GROMADA, A.; JAMROZ, J. Effect of medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, p. 27-32, 1996.

FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; FONTES, P. R. Cinética de inibição por galactose e glicose na hidrólise de lactose por β -galactosidase em massa de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 365, p. 19-25, 2008.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 685-694, 2008.

GANZLE, M. G. Enzymatic Synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 116-122, 2012.

GEIGER, B.; NGUYEN, H. M.; WENIG, S.; NGUYEN, H. A.; LORENZ, C.; KITTL, R.; MATHIESEN, G.; EIJSINK, V. G. H.; HALTRICH, D.; NGUYEN, H. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, 2016. No prelo.

GONCIARZ, J.; KOWALSKA, A.; BIZUKOJC, M. Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the access of oxygen to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 178-188, 2016.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi and concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**, v. 10, p. 1395-1404, 1995.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 104-109, 2012.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

LEEUWEN, S. S. V.; KUIPERS, B. J. H.; DIJKHUIZEN, L.; KAMERLING, J. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. **Carbohydrate Research**, v. 425, p. 48-58, 2016.

MACRIS, B. J. Production of extracellular lactase from *Fusarium moniliforme*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 161-164, 1981.

MAI, T. H. A.; TRAN, V. N.; LE, V. V. M. Biochemical studies on the immobilized lactase in the combined alginate-carboxymethyl cellulose gel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, p. 81-87, 2013.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 5, p. 113-121, 2012.

MUSTRANTA, A.; KARVONEN, E.; OJAMO, H.; LINKO, M. Production of mold lactase. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 7, p. 333-338, 1981.

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

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Review: Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 530-543, 2006.

PRAY, W. S. Lactose intolerance: The norm among the world's peoples. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 64, p. 205-207, 2000.

RANCIARO, A.; CAMPBELL, M. C.; HIRBO, J. B.; KO, W. Y.; FROMENT, A.; ANAGNOSTOU, P.; KOTZE, M. J.; IBRAHIM, M.; NYAMBO, T.; OMAR, S. A.; TISHKOFF, S. A. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. **The American Journal of Human Genetics**, v. 94, p. 496-510, 2014.

RINGS, E. H. H. M.; BEERS, E. H. V.; KRASINSKI, S. D.; VERHAVE, M.; MONTGOMERY, R. K.; GRAND, R. J.; DEKKER, J.; BULLER, H. A. Lactase: Origin, gene expression, localization, and function. **Nutrition Research**, v. 14, n. 5, p. 775-797, 1994.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: _____. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, cap. 2, v. 2, p. 5-18, 2001.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Production of lactase by *Trichoderma sp.* **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 121-124, 2004.

SHEN, L.; CHENG, K. C. K.; SCHROEDER, M.; YANG, P.; MARSH, E. N. G.; LAHANN, J.; CHEN, Z. Immobilization of enzyme on a polymer surface. **Surface Science**, v. 648, p. 53-59, 2016.

SMITHEE, S.; TRACY, S.; DRESCHER, K. M.; PITZ, L. A.; MCDONALD, T. A novel, broadly applicable approach to isolation of fungi in diverse growth media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 105, p. 155-161, 2014.

SWAGERTY JR, D. L.; WALLING, A. D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American Family Physician**, v. 65, n. 9, p. 1845-1850, 2002.

TALBERT, J. N.; HOTCHKISS, J. H. Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 78-84, 2012.

TUFVESSON, P.; FU, W.; JENSEN, J. S.; WOODLEY, J. M. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 3-11, 2010.

VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E.; REPENNING, F.; THOB, A.; SCHREZENMEIR, J. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. **Clinical Nutrition**, v. 34, p. 394-399, 2015.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; CHEN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food Chemistry**, v. 200, p. 69-75, 2016.