

Efeito do meio de cultivo no crescimento e na produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*

Effect of the growth medium on cell growth and the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*

DOI:10.34117/bjdv9n3-102

Recebimento dos originais: 17/02/2023

Aceitação para publicação: 13/03/2023

Victor Mateus Juchem Salerno

Graduando em Engenharia Química

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,
CEP: 90619-900

E-mail: victor.salerno@edu.pucrs.br

Arden Dias Satte

Graduanda em Engenharia Química

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,
CEP: 90619-900

E-mail: arden.satte@edu.pucrs.br

Bruna Coelho de Andrade

Mestra em Biotecnologia

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,
CEP: 90619-900

E-mail: bruna.coelho95@edu.pucrs.br

Claudio Luis Crescente Frankenberg

Doutor em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,
CEP: 90619-900

E-mail: claudio@pucrs.br

Gustavo Roth

Doutor em Ciências Naturais

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,
CEP: 90619-900

E-mail: gustavo.roth@pucrs.br

Allan Valcareggi Morcelli

Doutor em Engenharia Química

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 30, Bloco F, Sala 109, Porto Alegre – RS,

CEP: 90619-900

E-mail: allan.morcelli@pu.rs.br

RESUMO

A enzima β -galactosidase (lactase) é utilizada na produção de alimentos lácteos. Suas características funcionais e obtenção variam de acordo com os microrganismos de origem e condições de cultivo. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de diferentes meios de cultivo no crescimento e na produção de β -galactosidase pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. As células foram inoculadas em meios complexos e meios sintéticos contendo glicose ou lactose como fonte de carbono à temperatura constante, realizando-se acompanhamento do crescimento celular durante 12 horas. Os resultados foram avaliados pela densidade ótica dos cultivos, concentração residual da fonte de carbono, quantificação de proteínas totais e da atividade enzimática específica. As curvas de crescimento e o consumo de açúcares pela levedura *K. marxianus* foram semelhantes em todos os meios testados, observando-se uma estagnação do crescimento celular associada com a queda da concentração dos açúcares nos meios de cultivo. Ainda, obteve-se uma maior atividade enzimática específica ($3,19 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg/min}$) quando utilizado o meio sintético na presença de lactose. A utilização do meio sintético possibilitou a obtenção da enzima β -galactosidase com maior atividade, sendo considerado apropriado para o escalonamento do cultivo da levedura com o objetivo da produção da enzima de interesse.

Palavras-chave: β -galactosidase, fermentação, lactase.

ABSTRACT

The enzyme β -galactosidase (lactase) is used in the production of dairy foods. Its functional characteristics and obtainment vary according to the microorganisms of origin and culture conditions. The aim of this work was to analyze the effects of different culture media on the growth and production of β -galactosidase by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. The cells were inoculated in complex media and synthetic media containing glucose or lactose as carbon source at constant temperature, and cell growth was monitored for 12 hours. The results were evaluated by the optical density of the cultures, residual concentration of the carbon source, quantification of total proteins and of the specific enzymatic activity. The growth curves and the consumption of sugars by the yeast *K. marxianus* were similar in all the tested media, observing a stagnation of cell growth associated with the decrease of sugar concentration in the culture media. Furthermore, a higher specific enzymatic activity ($3.19 \pm 0.01 \mu\text{mol/mg/min}$) was obtained when the synthetic medium was used in the presence of lactose. The use of the synthetic medium allowed obtaining the β -galactosidase enzyme with higher activity, being considered appropriate for the scale-up of the yeast culture with the aim of producing the enzyme of interest.

Keywords: β -galactosidase, fermentation, lactase.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da OECD-FAO (2019), a produção mundial de leite foi estimada em 838 milhões de toneladas no ano de 2018, com o Brasil representando 3,9 % dessa produção. Ainda neste setor do mercado, no que se refere à produção de leite destinado a laticínios (derivados), a produção mundial em 2018 foi estimada em 413 milhões de toneladas, da qual o Brasil representou pouco mais de 3,53 %. A maior parte da produção de laticínios é consumida na forma de produtos lácteos frescos, dos quais, em 2018, a estimativa mundial de consumo médio foi de 55 kg por pessoa, com o Brasil possuindo um consumo acima da média mundial, representado pela estimativa de 70,3 kg por pessoa (OECD-FAO, 2019).

A lactose, popularmente conhecida como uma “proteína” do leite, é um dissacarídeo abundante no leite de mamíferos, sendo hidrolisada pela lactase, uma enzima da borda em escova intestinal, em açúcares absorvíveis, nomeadamente glicose e galactose (MATTAR E MAZO, 2010). Existem três genótipos que caracterizam a dificuldade de metabolização da lactose, também chamada de “intolerância”: lactase homozigótica persistente (LP), lactase homozigótica não persistente (LNP) e heterozigotos. Dentro dessa caracterização, estima-se que a lactase não persistente (LNP) afeta cerca de 70% da população adulta mundial; já no Brasil, a população afetada de alguma maneira pelo metabolismo da lactose seria a população caracterizada pela má absorção de lactose, estimada pelos autores em 80% (BAYLESS et al., 2017).

A intolerância à lactose foi descrita como sendo a incapacidade de digerir este dissacarídeo, o qual é fermentado quando chega ao cólon, gerando ácidos graxos e gases que podem gerar problemas gastrointestinais e desconfortos. Tais sintomas da má digestão da lactose variam para cada pessoa, possivelmente devido ao tempo de trânsito da proteína no organismo (MATTAR E MAZO, 2010). O tratamento da intolerância à lactose está atualmente limitado a suplementos preventivos e medicamentos para controle de sintomas. Os produtos mais comuns usados são pílulas contendo lactase (SOPHIA J. OAK & RAJESH JHA, 2019). No entanto, o uso de probióticos – em particular, cepas pertencentes a *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* – tem se mostrado uma alternativa interessante devido à sua capacidade de promover a digestão da lactose, aumentando a capacidade hidrolítica geral no intestino delgado e a fermentação da microbiota intestinal (DHAMA et al., 2016).

Lactase é o nome comum dado à enzima β -galactosidase. Tradicionalmente, as β -galactosidases mais utilizadas na indústria eram obtidas de *Aspergillus spp.* e

Kluyveromyces spp. (HUSAIN, QAYYUM, 2010). A produção de β -galactosidase ocorre de maneira intracelular, com a lactose sendo primeiro transportada para o interior da célula da levedura por uma permease e depois hidrolisada intracelularmente em glicose e galactose, que seguem a via glicolítica ou a via de *Leloir*, respectivamente. Devido à produção intracelular, a enzima precisa ser extraída das células de levedura por ruptura, tratamento mecânico, ou permeabilização das células usando tratamentos químicos (PANESAR et al., 2006).

β -galactosidases provenientes de leveduras apresentam pH e temperaturas ótimos quando estão entre 6,0–7,0 e abaixo de 40 °C (Tavares, 2017). Estudos mostraram a importância da otimização da composição do meio de cultivo para a produção de β -galactosidase utilizando *Kluyveromyces marxianus* por meio da avaliação de diferentes concentrações de lactose, além de fontes de nitrogênio e de outros nutrientes (MANERA et al., 2008; PANESAR et al., 2006). De forma geral, verifica-se que a utilização de meios sintéticos para o crescimento da levedura pode levar à otimização de custos do processo de produção da enzima β -galactosidase.

Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de cultivo no crescimento de *K. marxianus* e analisar a produção de β -galactosidase pela levedura. Cultivos em batelada foram conduzidos empregando YPD e YPL como meios simples, além de ter-se testado a suplementação destes meios de modo a formular meios sintéticos (MSD e MSL), de modo a avaliar a influência da composição do meio de cultivo no crescimento celular, consumo de substrato, produção de proteínas totais e atividade enzimática.

2 METODOLOGIA

2.1 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULOS

Culturas da levedura *Kluyveromyces marxianus* foram mantidas entre o acervo de Culturas Microbiológicas do Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS - Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brasil). As culturas foram armazenadas em placas com meio Luria-Bertani a 4 °C e renovadas a cada quatro semanas de modo a manter sua integridade fisiológica. Meio de cultivo YPD (extrato de levedura, peptona e glicose) foi utilizado em cultivos em batelada de 24 h de duração para produzir pré-inóculos para os experimentos descritos neste trabalho.

Para o preparo de inóculos foram utilizadas diluições de soluções-estoque de extrato de levedura com peptona (YP) e glicose (D) previamente esterilizadas em frascos individuais em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Foram utilizados meios de cultivo contendo 1 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de peptona e 2 g/L de glicose. Uma colônia isolada de *Kluyveromyces marxianus* foi transferida a partir da placa de meio sólido para 200 mL de meio de cultivo fresco para produção de um pré-inóculo. Esta solução foi cultivada em agitador orbital a 23 ± 2 °C e 150 rpm pela duração de 16 h (NOVATECNICA, modelo NT 155). Um inóculo foi produzido a partir deste cultivo através da transferência de volume suficiente para produzir densidade ótica $DO = 0,1$ a 600 nm em meio YPD (GEHAKA, modelo UV-330G). Este cultivo foi incubado nas mesmas condições até alcançar $DO = 1,0$ (fase de crescimento exponencial) e foi utilizado para iniciar os experimentos avaliados neste trabalho.

2.2 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Cultivos em batelada foram conduzidos em duplicatas empregando 200 mL de meios simples e complexos, de modo a avaliar a influência da composição do meio de cultivo no crescimento celular, consumo de substrato, produção de proteínas totais e atividade enzimática.

Meio de cultivos YPD (idêntico ao meio utilizado para inóculos) e YPL (substituindo glicose por lactose na formulação) foram constituídos a partir de soluções-estoque. Em adição, meios sintéticos foram formulados, tomando YPD e YPL como composição-base e adicionando à sua formulação: 15,0 mg/L de EDTA, 4,50 mg/L de $ZnSO_4$, 0,30 mg/L de $CoCl_2$, 0,30 mg/L de $CuSO_4$, 0,40 mg/L Na_2MoO_4 , 4,50 mg/L de $CaCl_2$, 3,0 mg/L de $FeSO_4$, 1,0 mg/L de H_3BO_3 , 0,10 mg/L de KI, 0,05 mg/L de biotina, 0,50 g/L de $MgSO_4$, 5,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 3,0 g/L de KH_2PO_4 . Quando suplementados da forma descrita, os meios sintéticos contendo dextrose e lactose passaram a ser denominados, respectivamente, MSD e MSL.

Os cultivos destes experimentos foram iniciados ao transferir o inóculo ($DO = 1,0$) para 200 mL dos meios YPD, YPL, MSD ou MSL de modo a alcançar $DO = 0,1$ e foram incubados a 23 ± 2 °C e 150 rpm pela duração de 12 h (NOVATECNICA, modelo NT 155).

2.3 PROCEDIMENTO DE RUPTURA CELULAR

O extrato bruto celular contendo β -galactosidase foi obtido por rompimento celular com esferas de vidro em agitador vórtex (Kasvi modelo K45-2820), seguindo metodologia adaptada da literatura (DE MEDEIROS et al., 2008). A solução com células rompidas foi centrifugada a 6000 rpm, o sobrenadante foi segregado para a análise de açúcares redutores, e o decantado foi ressuspendido com solução tampão de fosfato salino (PBS). 500 μ L foram transferidos para um micro tubo contendo 1,0 g de pérolas de vidro, o qual foi submetido a banho termostático seco, sob agitação de 1.400 rpm a -4 °C e por 1 h. O conteúdo líquido do micro tubo foi recuperado e transferido para um novo micro tubo, ao qual foram adicionados 500 μ L de PBS. Realizou-se nova centrifugação (2 min, a 13.000 rpm), de modo a garantir que a amostra se apresentasse livre do resíduo sólido da ruptura celular. O sobrenadante produzido foi utilizado na análise de atividade enzimática e na análise de proteínas totais.

2.4 ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ONPG)

A atividade enzimática foi determinada por metodologia espectrofotométrica empregando orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) com modificações (RECH et al., 1999). 100 μ L do sobrenadante gerado no procedimento de ruptura celular foram adicionados a micro tubos contendo 1,0 mL de ONPG mantidos à 30 °C por banho termostático (DeLeo, modelo BMBE 4P). Transcorrido 1 min de reação (ONPG + amostra), foram adicionados 200 μ L de uma solução de Na_2CO_3 1 M para interromper a reação.

Após esse procedimento, a solução dentro do micro tubo foi homogeneizada por agitação manual e mediu-se a absorbância da amostra a 405 nm (GEHAKA, modelo UV-330G). Utilizou-se como branco água destilada submetida ao mesmo procedimento. A concentração de ONPG foi determinada através da Lei de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon_{ONPG} \cdot L \cdot C_{ONPG}$$

onde A é a absorbância da amostra lida a 405 nm, ε_{ONPG} é o coeficiente de extinção molar do ONPG ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), L é o caminho ótico (1 cm), e C_{ONPG} é a concentração de ONPG ($\mu\text{mol}/\text{mL}$). Considerando que na metodologia ocorre diluição da amostra que contém a enzima pela adição de reagentes, deve-se multiplicar esta concentração pela razão V_f/V_a em que V_a = volume de amostra e V_f = volume após adição dos reagentes. Caso a amostra dependa ainda de diluição, o fator de diluição F deverá ser aplicado, conforme:

$$C_{\text{ONPG}} = \frac{A * V_f * F}{\epsilon_{\text{ONPG}} * L * V^{\circ}}$$

Então, a atividade enzimática pode ser calculada através de:

$$A_v = \frac{C_{\text{ONPG}}}{t}$$

onde t é o tempo de reação (min) e A_v é a atividade enzimática volumétrica ($U_{\text{ONPG}}/\text{mL}$).

Por sua vez, a atividade enzimática específica foi calculada pela equação:

$$A_e = \frac{A_v}{X}$$

onde A_e é a atividade específica da enzima em $U_{\text{ONPG}}/\text{mg}$ e X é a concentração de proteína em mg/mL .

2.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS

A análise de proteínas totais foi realizada sobre amostras de caldo fermentado submetidas a ruptura celular empregando metodologia espectrofotométrico com uso do Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma curva de calibração foi preparada a partir de uma amostra padrão de 2 mg/L de albumina de soro bovino (BSA), utilizando água ultrapura, e variando a concentração de BSA em 2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,125 mg/L, 0,0625 mg/L e 0,03125 mg/L. Amostras foram submetidas à reação com Reagente de Bradford e submetidas a agitação em vórtex (Kasvi, modelo K45-2820), mantendo-as abrigadas da luz por 15 min para reação. Realizou-se a leitura de absorbância das amostras a $\lambda = 595 \text{ nm}$, realizando diluições, quando necessário (GEHAKA, modelo UV-330G).

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

A quantificação de açúcares redutores residuais no caldo fermentado foi determinada de acordo com metodologia espectrofotométrica baseada no emprego de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com modificações (VASCONCELOS et al., 2013). Uma amostra de caldo fermentado foi centrifugada a 6000 rpm (FANEM excelsa, modelo 206-R), e a 1 mL do sobrenadante adicionou-se um volume igual do reagente DNS em tubos

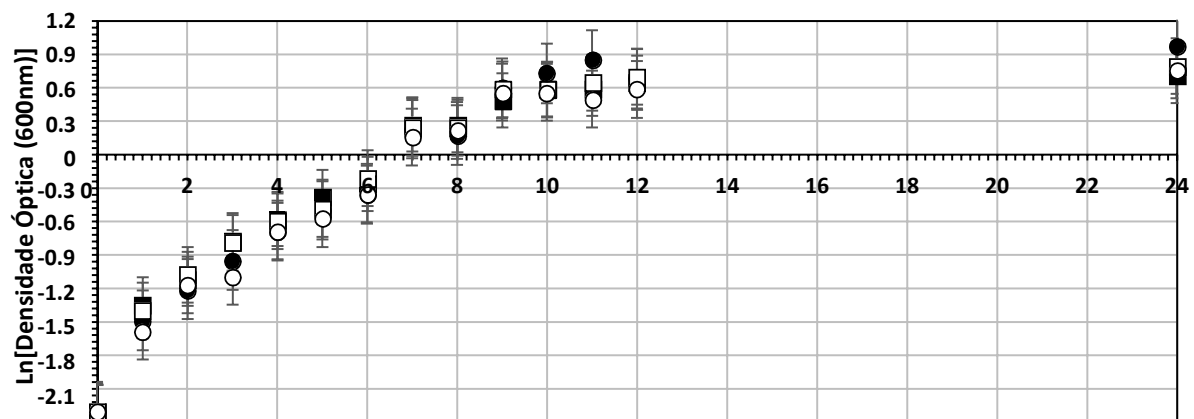
de ensaio, com agitação vigorosa. Os tubos foram levados a banho de água fervente (100 °C, DeLeo modelo BMBE 4P) por 15 min, após os quais a reação foi interrompida imergindo os tubos em banho de água fria. Após homogeneização, foi realizada a leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro a 540 nm (GEHAKA modelo UV-330G), utilizando um branco composto por água destilada submetida ao mesmo método.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO CELULAR

A curva de crescimento da levedura *K. marxianus* nos meios complexos (YPD e YPL) e sintéticos (MSD e MSL) na presença de glicose e lactose foi analisada ao longo do tempo. A Figura 1 demonstra que a curva de crescimento das células em diferentes meios de cultivo foi semelhante ao longo do tempo, demonstrada pelo baixo desvio da média das velocidades específicas máximas de crescimento dos meios contendo glicose e lactose, sendo seus valores calculados de $0,190 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ e $0,220 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Figura 1- Curva de crescimento da levedura em diferentes meios de cultivo YPD (■), YPL (●), MSD (□) e MSL (○). As barras verticais representam o desvio padrão de experimentos em duplicata.



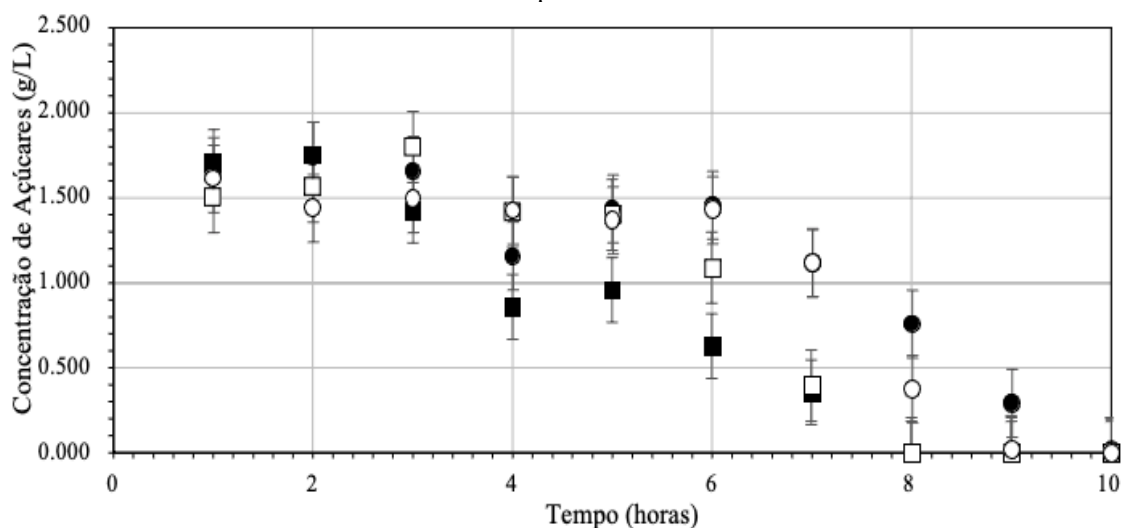
Destaca-se que as células de *K. marxianus* em meio YPL apresentaram a maior densidade óptica ao final das 24 horas de cultivo, possivelmente pela preferência do microrganismo pelo substrato lactose. Levando em consideração os custos de obtenção do meio de cultivo complexo e o crescimento satisfatório das células em todos meios, considerou-se que os meios de cultivo mais simples foram suficientes para o propósito de produção de biomassa da levedura *K. marxianus*, reduzindo o custo de processo. Adicionalmente, é perceptível nas curvas da Figura 1 a existência de comportamento linear até aproximadamente 9 h de crescimento, representando uma extensa fase de

crescimento exponencial, seguida de uma fase estacionária até 12 h, em um comportamento tipicamente representativo de curvas de crescimento microbiano em batelada.

4 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração residual de açúcares redutores foi analisada ao longo do tempo nos meios de cultivo complexos e sintéticos contendo glicose e lactose. A Figura 2 demonstra que, após 10 h de crescimento da levedura, foi verificada a ausência de açúcares em todos os meios de cultivo. Adicionalmente, é possível verificar que o perfil de consumo dos açúcares foi muito semelhante entre os meios contendo lactose ou glicose na sua composição. De forma distinta, os meios com glicose tiveram seus teores de açúcares reduzidos a zero após 9 h de cultivo, enquanto isso só foi alcançado para meios que continham lactose em 10 h de cultivo. Esta diferença é atribuída ao fato de que a glicose é um açúcar simples mais facilmente assimilado pelo microorganismo, enquanto a lactose é um dissacarídeo que depende da sua quebra em monossacarídeos que serão utilizados pelas suas rotas metabólicas. Atribui-se ainda a depleção dos açúcares redutores no meio de cultivo à estagnação do crescimento celular previamente apresentada (Figura 1), havendo esta limitado a duração dos cultivos em batelada.

Figura 2 - Curvas de concentração residual de glicose e lactose nos diferentes meios de cultivo YPD (■), YPL (●), MSD (□) e MSL (○). As barras verticais representam o desvio padrão de experimentos em duplicata.



4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A β -galactosidase é uma enzima que catalisa a hidrólise de β -galactosídeos, como a lactose, em monossacarídeos, como a glicose e galactose, pela quebra de ligações glicosídicas. A atividade enzimática da β -galactosidase foi verificada nos meios contendo lactose, pois somente nestes a levedura produz a enzima consumindo a fonte de carbono disponível. No meio complexo YPL foi verificada a atividade enzimática volumétrica de $0,48 \pm 0,28 \mu\text{mol/mL/min}$ pareada com uma concentração de proteínas totais no extrato celular bruto de $0,32 \pm 0,01 \text{ g/L}$. Estes resultados correspondem a uma atividade enzimática específica de $1,49 \pm 0,86 \mu\text{mol/mg/min}$. Já no meio sintético MSL foram alcançadas uma atividade enzimática volumétrica de $1,67 \pm 0,00 \mu\text{mol/mL/min}$, uma concentração de proteínas totais de $0,52 \pm 0,21 \text{ g/L}$ no extrato bruto, correspondendo a uma atividade enzimática específica de $3,19 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg/min}$. Pode-se perceber que o meio MSL proporcionou uma maior atividade enzimática específica, demonstrando ser a melhor opção entre os meios estudados para produção da enzima β -galactosidase de *K. marxianus*. Considera-se, portanto, que a formulação de um meio complexo é importante para atender às demandas nutricionais do microrganismo, de modo a possibilitar as rotas metabólicas que conduzem à produção da enzima.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, estudou-se a influência de diferentes meios de cultivo no crescimento da levedura *K. marxianus* e analisou-se a produção de β -galactosidase pela levedura nos mesmos. No período de 10 horas de cultivo houve estabilização da curva de crescimento, confirmada pelo consumo total das fontes de carbono. Ainda, verificou-se que no meio de cultivo sintético MSL, a β -galactosidase produzida apresentou maior atividade enzimática específica. Ademais, pode-se concluir que o meio sintético MSL apresentou resultados satisfatórios tanto para o crescimento da levedura quanto para a produção da enzima de interesse, sendo assim recomendado para esta aplicação. Tem-se como perspectiva de estudos futuros a realização de cultivos em biorreatores empregando uma estratégia de cultivo de batelada alimentada sob condições controladas, utilizando o meio sintético deste trabalho e uma alimentação rica em lactose.

REFERÊNCIAS

- BAYLESS, Theodore M., Elizabeth Brown, and David M. Paige. "Lactase non-persistence and lactose intolerance." *Current gastroenterology reports* 19.5 (2017): 1-11.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.7, p.248-254, 1976.
- DHAMA, K., S. K. Latheef, and A. K. Munjal. 2016. Probiotics in Curing Allergic and Inflammatory Conditions – Research Progress and Futuristic Vision. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 10 (1):21–33
- FONSECA GG, CARVALHO NMB, GOMBERT AK. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.97, p.5055–5067, 2013.
- HEIDTMANN R, et al. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 41-49, 2012.
- HUSAIN, QAYYUM. " β Galactosidases and their potential applications: a review." *Critical reviews in biotechnology* 30.1 (2010): 41-62.
- MANERA, A. P et al. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology And Biotechnology*, Rio Grande - Rio Grande do Sul, v. 1, n. 46, 13 jul. 2008.
- MATTAR R, MAZO DFC. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Rev Assoc Med Bras.* v.56, p.230-236, 2010.
- MEDEIROS FO, et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β - galactosidase para uso em laboratório. *Química nova*, v.31, p.336-339, 2008.
- RECH R, CASSINI CF, SECCHI A, AYUB MAZ. Utilization of protein hydrolyzed cheese-whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. And Biotech.* v.23, p.91-96, 1999.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028: Special Focus: Latin America. OECD Publishing, 2019.
- PANESAR PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H. Microbial production, immobilization and applications of beta-D-galactosidase. *J Chem Technol Biotechnol* 2006; 81:530–43.
- SOPHIA J. OAK & RAJESH JHA (2019) The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59:11, 1675-1683, DOI: 10.1080/10408398.2018.1425977

TAVARES, B. Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica. *UNIOESTE*. p.1-78, 2017.

VASCONCELOS NM, PINTO GAS, ARAGÃO FAS. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. *Embrapa*. p.1-22, 2013.