

APROVEITAMENTO DO SORO DE RICOTA PARA PRODUÇÃO DE DIFERENTES BIOMOLÉCULAS UTILIZANDO A *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

Adriana Regina Bitello¹, Angélica Vincenzi¹, Chistiane Faccin¹, Cláudia Andréia Gräff¹, Cláudia Schlabit¹, Élvio Leandro Burlani¹, Greici Raquel Wildner¹, Luís Alberto Pereira Machado¹, Mariano Rodrigues¹, Mônica Jachetti Maciel¹, Ruan da Silva Rafael¹, Ruthineia da Luz Funke¹, Cláudia Fernanda Volken de Souza²

Resumo: A fabricação da ricota é uma forma empregada pelas indústrias de laticínios para aproveitamento do soro de queijo. No entanto, nesse processo é gerado o soro de ricota, resíduo ainda não aproveitado por essas indústrias da região do Vale do Taquari. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da levedura *Kluyveromyces marxianus* na biotransformação do soro de ricota em diferentes bioprodutos. O soro de ricota foi enriquecido com extrato de levedura, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de amônio. Os bioprocessos foram desenvolvidos durante 40 horas nas temperaturas de 25 e 35 °C. Os pHs iniciais dos meios de cultivo foram ajustados em 4,5 e 6,5 e foram realizadas as seguintes determinações ao longo dos cultivos: biomassa, pH, etanol, proteína, protease e lactose. Apesar do crescimento celular da levedura, não foi verificada a produção de etanol, provavelmente devido à baixa concentração de lactose no meio de cultivo.

Palavras-chave: Laticínios. Resíduos. Biotecnologia.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em proteínas e muito utilizado na alimentação humana, sendo considerado uma das principais fontes proteicas da população brasileira. A produção de leite no Brasil cresceu 4,5% em 2011 em relação a 2010, atingindo o volume total de 32 milhões de litros (EMBRAPA, 2013).

O queijo é obtido por meio da coagulação ácida ou enzimática da caseína presente no leite e tem como subproduto do seu processamento o soro de queijo. Aproximadamente 90% do volume do leite destinado à fabricação de queijos são convertidos em soro, que contém metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais. Considerando que a produção de queijos no Brasil está em torno de 450 mil toneladas por ano, tem-se o equivalente a 4,05 bilhões de litros de soro de queijo sendo produzidos no país. Desse volume, somente 10% é aproveitado industrialmente (BARBOSA et al., 2010). O soro, subproduto que, embora possua considerável valor nutritivo, não é totalmente utilizado, é muitas vezes descartado em cursos hídricos. Seu despejo inadequado em cursos hídricos gera sérios problemas ambientais causados pela sua alta demanda bioquímica de oxigênio – DBO e demanda química de oxigênio – DQO (RICHARDS, 2002; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

1 Discente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES.

2 Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil(2008). Professora do Centro Universitário UNIVATES.

Em razão da grande disponibilidade do soro de queijo *in natura* e de seu oferecimento gratuito ou a baixo preço, muitos produtores o empregam na alimentação animal. Porém, além desta utilização, o soro de queijo pode ser empregado na fabricação de doces, pudins, ricota, entre outros alimentos. Para obtenção da ricota, as proteínas do soro de queijo são precipitadas pelo emprego de calor e de ácidos orgânicos. Porém, a produção da ricota gera o soro de ricota, que necessita ser tratado para posterior descarte. A necessidade de tratamento desse resíduo torna a sua geração onerosa, principalmente para empresas de pequeno porte (GRBA et al., 2002). Segundo Sansonetti et al. (2009), o soro de ricota é composto basicamente de proteínas, lactose, sais e ácidos orgânicos. Aproveitar o soro de ricota para produção de diferentes biomoléculas, como etanol, lactase, protease, pode ser de grande interesse para as indústrias lácteas, uma vez que consiste em uma alternativa para aumentar o valor econômico desse subproduto (BARILE et al., 2009).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é o principal biocatalisador para o soro de ricota e o soro de queijo. Ozmihci e Kargi (2007) utilizaram soro de queijo concentrado (12,5% de lactose) como substrato para produção de etanol a partir de *K. marxianus* em sistema de batelada alimentada, atingindo produtividade de 5,3 g/1/h de etanol a 6,3% (m/v). Em estudo publicado por Christensen et al. (2011), foi observado alto rendimento de etanol (0,50 g de etanol/g de lactose) obtido a partir de *K. marxianus* cultivada em diferentes condições de temperatura e pH, em sistema contínuo e em batelada, empregando o soro de queijo como meio de cultura. Sansonetti et al. (2009) relataram que o soro de ricota fermentado por *K. marxianus* apresentou maior rendimento de etanol (97%) quando comparado com soro de queijo e permeado de soro de queijo nas mesmas condições de processo.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, sob diferentes condições de cultivo, o potencial fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* na biotransformação da lactose presente no soro de ricota em diferentes bioprodutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação do meio de cultivo e do inóculo

Inicialmente foram preparados 48 frascos *erlenmeyers* contendo soro de ricota tipo lanche enriquecido com extrato de levedura, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de amônio. Dentre eles 24 frascos tiveram o pH do meio de cultivo ajustado em 4,5 e nos outros 24 o pH foi ajustado em 6,5.

Para a preparação do pré-inóculo, uma alçada da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foi transferida para Caldo Sabouraud Maltose e incubada *over night* em banho-maria de agitação contínua (Marconi, MA093) a 30 °C.

A padronização do número de células do inóculo foi realizada por meio da densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Tecnal, SP 2000 UV) até $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$. Os frascos *erlenmeyer* de 250 ml com 50 ml do meio de fermentação foram inoculados com 10% (v/v) do inóculo com $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$.

Os frascos com pH inicial de 4,5 e 6,5 foram incubados sob agitação orbital a 25 e a 35 °C por 40 horas. Dessa forma, 12 frascos com pH ajustado em 4,5 foram incubados a 25 °C e 12 frascos foram incubados a 35 °C. O mesmo ocorreu para os meios de cultura com pH inicial de 6,5.

As determinações de biomassa, pH, etanol, proteína, protease e lactose foram realizadas em quatro condições de cultivo (pH 4,5 a 25 e 35 °C e pH 6,5 a 25 e 35 °C) ao longo das 40 horas de incubação.

2.2 Coleta das amostras de cultivo

Amostras dos meios fermentados com pH inicial de 4,5 e 6,5 incubados a 25 e 35 °C foram coletadas periodicamente ao longo das 40 horas de cultivo.

Três alíquotas de 10 ml de meio de cultura fermentado foram transferidas para tubos *falcon*, previamente pesados, sendo centrifugadas (Excelsa, 206 BL) a 3.500 rpm por 15 minutos, e o decantado foi utilizado para a determinação de biomassa. Já os sobrenadantes de todas as centrifugações foram misturados e utilizados para as determinações de pH, etanol, proteína, protease e lactose.

2.3 Determinações analíticas

2.3.1 Determinação de biomassa

No decantado foram adicionados 10 ml de água destilada gelada. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos tipo vortex (Phoenix Lufenco, AP 56) e novamente centrifugada. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Os tubos com biomassa foram submetidos à secagem em estufa (De Leo, A3SED) a 60 °C por 48 horas e após foram novamente pesados. A quantidade de biomassa corresponde à diferença de massa entre o tubo com biomassa seca e o tubo vazio.

2.3.2 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada em alíquotas do sobrenadante do meio de cultivo fermentado. Realizou-se a leitura em pHmetro (Digimed, DM 20).

2.3.3 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais do sobrenadante do meio de cultivo fermentado foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), expressando a concentração de proteínas como mg de albumina, por meio de leitura da absorvância a 750 nm. Para isso, foi necessária a preparação de uma curva padrão de albumina.

2.3.4 Determinação de proteases

A determinação da atividade proteolítica do sobrenadante do meio de cultivo fermentado foi determinada usando azocaseína 2% (p/v) como substrato, seguindo o método adaptado de Sangorrín, Folco e Martone (2001). A 250 µL de substrato em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 adicionaram-se 150 µL de substrato enzimático. A mistura foi incubada a 40 °C por 40 minutos. A reação foi interrompida adicionando 1000 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Os tubos foram centrifugados (13.000 rpm/5 min), e, no sobrenadante, foram adicionados 1000 µL de NaOH 1,0 M e mediu-se a absorvância a 440 nm. Para preparação do branco adicionou-se TCA 10% antes da adição da amostra. A atividade total foi calculada pela equação: $U = (Aa - Ab)/150$; onde Aa = absorvância da amostra, Ab = absorvância do branco.

2.3.5 Determinação de lactose

A determinação do teor de lactose do sobrenadante do meio de cultivo fermentado foi realizada por espectrofotometria seguindo o método de quantificação de açúcares redutores (MILLER, 1959). Para o preparo do reagente de cor foram pesados em balança analítica 0,25 g de ácido dinitrosalicílico e 75 g de tartarato de sódio e potássio. A seguir foram adicionados 50 ml de

NaOH 2 M e água até o volume de 250 ml, ajustado em balão volumétrico. Para facilitar a solubilidade do ácido o reagente foi preparado sob chapa aquecedora com agitação. Para a curva padrão (de zero a 5 g/l de lactose) foi preparada uma solução-mãe de lactose 5 g/l. A uma alíquota de 100 μ L da amostra de sobrenadante do meio de cultivo fermentado ou da curva padrão adicionaram-se 1000 μ L do reagente de cor. A mistura foi aquecida em banho-maria (Marconi, MA 156) fervente por 10 minutos. Após atingir temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Tecnal, SP 2000 UV) a 570 nm.

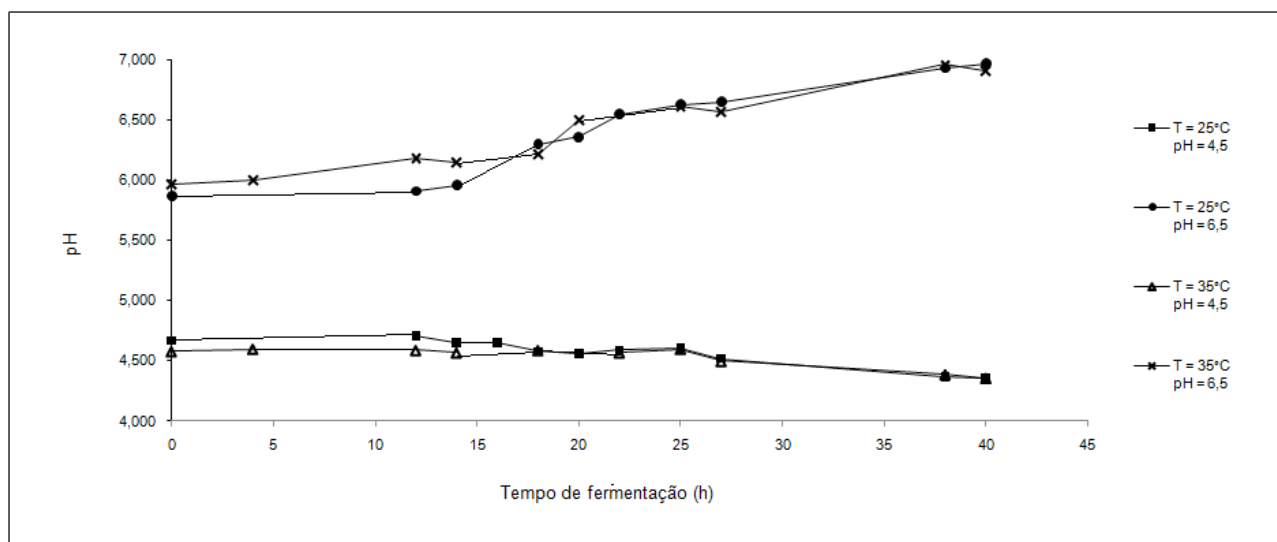
2.3.6 Determinação de etanol

Determinou-se o teor de etanol do sobrenadante do meio de cultivo fermentado por meio de cromatografia gasosa com detector FID utilizando coluna cromatográfica DB-1 com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A temperatura constante de 40 °C, temperatura da injeção e corrida a 250 °C. A quantificação foi realizada com curva de calibração com padrão interno de *n*-propanol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados de pH das diferentes condições de crescimento de *K. marxianus* ao longo do período de cultivo. Verificou-se que o pH inicial do meio de cultura utilizado determinou a tendência de aumento ou redução do pH ao longo do tempo de cultivo. Aparentemente a temperatura não influenciou na variação desse parâmetro, visto que, em pH inicial 6,5, nas duas temperaturas utilizadas (25 e 35 °C), a tendência é de elevação do pH até o tempo de 40 horas, enquanto em meio de cultura com pH inicial 4,5 a tendência é de redução.

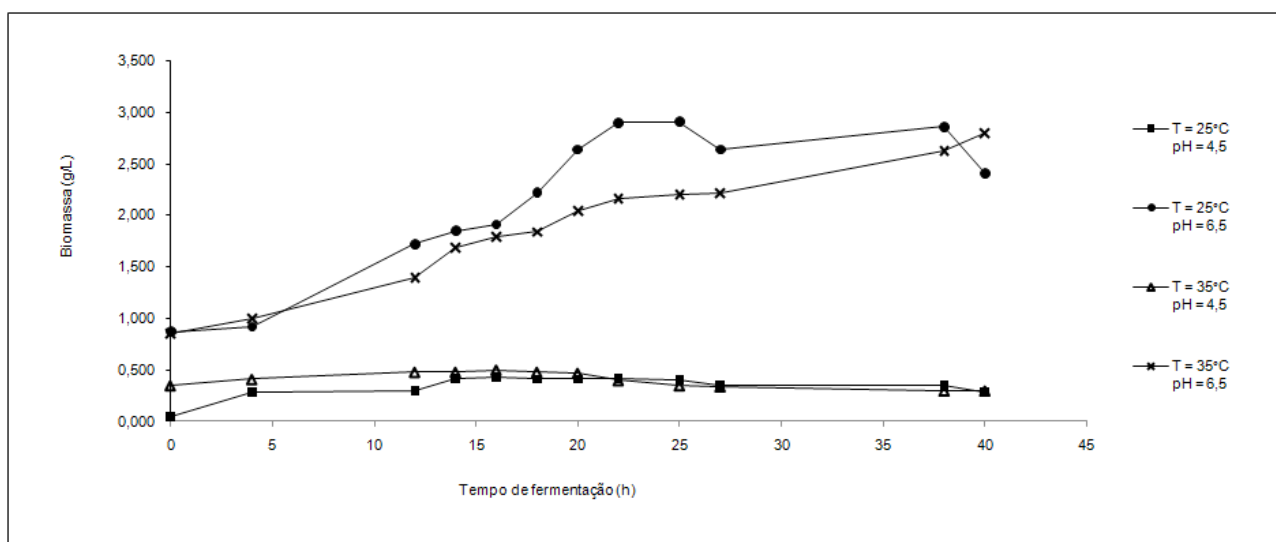
Figura 1 – Variação de pH ao longo do período de cultivo



Em relação à formação de biomassa pela levedura *K. marxianus*, o comportamento é apresentado na Figura 2. Em pH 6,5 e temperatura de 35 °C verificou-se aumento de massa de 1,95 g/l em 40 horas. Já em 25 °C e pH 6,5 observou-se que o pico de crescimento é atingido mais rapidamente, em 25 horas, ponto no qual o acréscimo de biomassa chegou a 2,04 g/l. Após esse

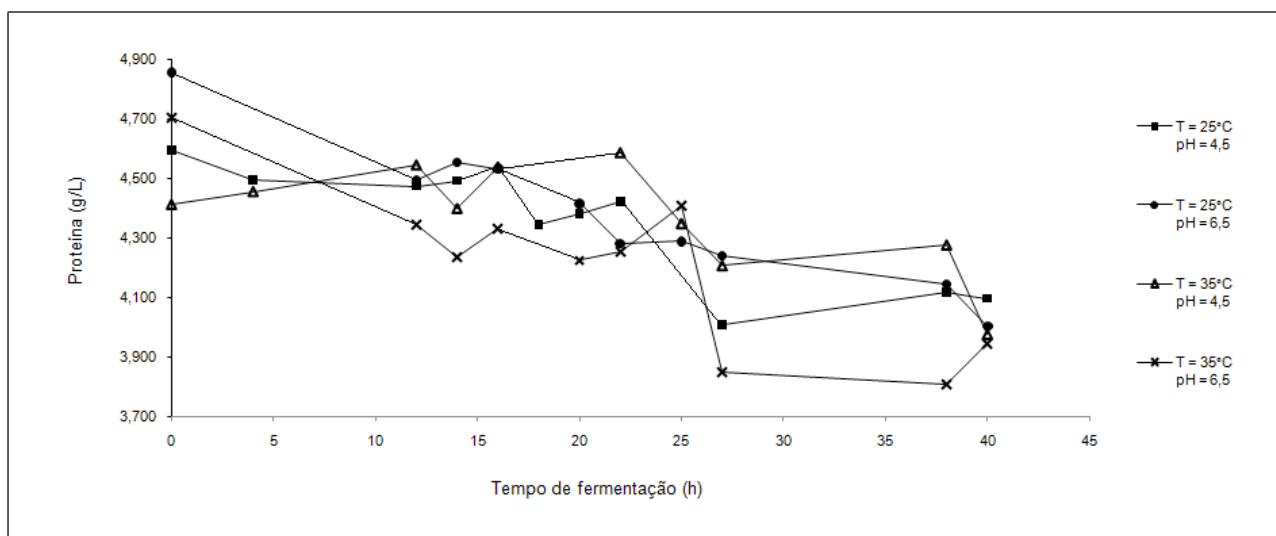
período, a concentração de biomassa começou a diminuir, sinalizando que o microrganismo iniciou a fase de morte ou de declínio. Em pH 4,5 e temperatura de 25 °C a biomassa apresentou pico em 22 horas de cultivo, apresentando acréscimo de 0,37 g/l até esse período. Em pH 4,5 e temperatura de 35 °C o pico de biomassa ocorreu em 16 horas de cultivo, com incremento de 0,15 g/l.

Figura 2 – Variação da biomassa ao longo do período de cultivo



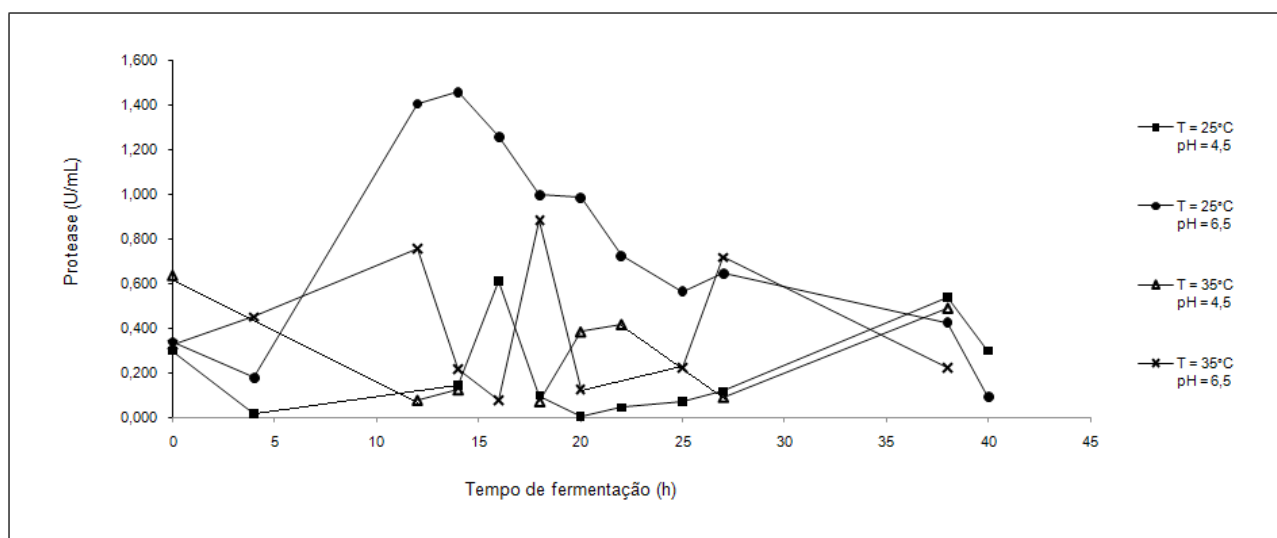
A Figura 3 apresenta a variação da concentração de proteína durante o experimento. Em todas as condições a concentração de proteínas decresceu, sendo o decréscimo menos acentuado em pH 4,5 em ambas as temperaturas do que em pH 6,5. A diminuição da concentração de proteína do meio de cultivo deve-se ao aumento de biomassa, visto que ocorre o consumo de proteínas presentes no meio para aumento do número de células do microrganismo.

Figura 3 – Variação da concentração de proteínas ao longo do período de cultivo



A atividade proteolítica (FIGURA 4) variou durante os cultivos, apresentando um valor menor ao final dos bioprocessos. Provavelmente esse fato pode ser explicado pela maior necessidade de proteases pela levedura *K. marxianus* no período de multiplicação celular. Assim, após a fase estacionária, a concentração de protease reduziu.

Figura 4 – Atividade de protease ao longo do período de cultivo



Em relação aos resultados de variação da concentração de lactose ao longo dos cultivos, verificou-se aumento da concentração em condições fermentativas de pH 4,5 e decréscimo em pH 6,5, e a temperatura não foi fator determinante no aumento ou diminuição desse açúcar.

No pH de 6,5 verificou-se que a concentração de lactose diminuiu de forma acentuada após 30 horas de fermentação, quando comparada ao pH 4,5. Revillion, Brandelli e Ayub (2003), estudando a produção de extrato de levedura a partir de soro de queijo utilizando *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, obtiveram o consumo total da lactose em 20 horas de cultivo, com aeração.

Em relação à produção de etanol, não foi verificada a formação dessa biomolécula nas quatro condições de cultivo avaliadas. Neste trabalho, a redução da lactose do meio não foi expressiva, o que provavelmente deve ter influenciado na ausência de produção de álcool etílico. Assim, observa-se que o meio de cultura e/ou as condições utilizadas não são adequadas à produção de etanol. Provavelmente um dos motivos para a não produção de álcool pode ser a baixa concentração de lactose no meio, cuja fonte foi somente o açúcar já presente no soro de ricota, em torno de 50 g/l. Além disso, trabalhos citados na literatura indicam que a aeração do sistema também auxilia na formação de etanol.

A ausência de formação de etanol foi explicada por Bellaver (2004) como consequência da falta de capacidade de *K. marxianus* CBS 6556 em manter o fluxo glicolítico constante, devido à dispersão do fluxo de carbono para a biossíntese de carboidratos ou para a rota metabólica da pentose fosfato.

Grba et al. (2002), em seu estudo sobre produção de biomassa e álcool por cinco diferentes cepas de *K. marxianus*, obtiveram entre 7 - 9 g/l de biomassa e 2,5 - 7% de álcool para a estirpe VST44; 6 - 8 g/l de biomassa e 3 - 7% de álcool para a estirpe ZIM75. Comparando a cinética entre as estirpes estudadas de *K. marxianus*, ZIM75 e VST44, apresentaram melhores resultados para

produção de álcool e de biomassa, porém as cinco estirpes não apresentaram diferença significativa entre as diferentes temperaturas de cultivo em 24 horas de fermentação.

Em relação à produção de etanol em diferentes pHs, Ozmihci e Kargi (2007), testando o efeito de diferentes parâmetros para fermentação alcoólica por *K. marxianus* NRRL-1195, obtiveram em pH inicial 5,0 a maior produção de etanol, aproximadamente 1,28%.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de biomassa e de proteínas totais indicam a multiplicação celular da levedura *K. marxianus* em soro de ricota tipo lanche enriquecido com extrato de levedura, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de amônio, com pH inicial ajustado em 4,5 e 6,5, nas temperaturas de 25 e 35 °C. Porém, não foi verificada a produção de álcool etílico e a lactose presente no soro de ricota não foi consumida pela levedura. Provavelmente o meio de cultivo e/ou as condições utilizadas não são adequados à produção de álcool etílico.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: Estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**. v. 5, n. 1, p. 7-25, 2010.

BARILE, D. et al. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v. 19, p. 524-530, 2009.

BELLAVER, L. H. et al. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**. v. 4, p. 691-698, 2004.

CHRISTENSEN, A. D. et al. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 283-289, 2011.

EMBRAPA. Gado de Leite. **Informações técnicas**: estatísticas do leite. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0244.php>>. Acesso em: 5 nov. 2013.

GRBA, S. et al. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. **Chem. Biochem. Eng. Q**. v. 16, n.1, p. 13-16, 2002.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biol. Chem.** p. 265-275, 1951.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

OZMIHICI, S.; KARGI, F. Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese whey powder solution. **Letters in Applied Microbiology**. v. 44, p. 602-606, 2007.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**. v. 110, p. 48-68, 2012.

REVILLION, J. P. D.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, p. 121-127, 2003.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro Lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**. v. 17, p. 20-27, 2002.

SANSONETTI, S. et al. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **biomass and Bioenergy**. v. 33, p. 1687 – 1692, 2009.

SANGORRÍN, M. P.; FOLCO, E. J.; MARTONE, C. M. Purification and characterization of proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle *Micropogon opercularis*. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 33, p. 691-699, 2001.