

Avaliação da produção de lactase e etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a partir do permeado de soro de leite

Evaluation of lactase and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 yeast from whey permeate

RESUMO

O permeado de soro de leite é um resíduo laticínio resultante da ultrafiltração, com alta taxa DBO e DQO. A partir da fermentação sua carga poluidora pode ser reduzida e constitui matéria-prima para a produção de enzimas e biocombustível. Dessa forma, avaliou-se a viabilidade de produção de lactase e etanol a partir da fermentação do permeado pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. Propôs-se um delineamento composto central para verificar o efeito das variáveis temperatura (30 - 50 °C), pH (6,0 - 8,0), concentração celular (1,0 - 3,0 gL⁻¹) e suplementação com extrato de levedura (0 a 20 gL⁻¹), em regime descontínuo. Verificou-se que a suplementação com extrato de levedura influencia diretamente no metabolismo do microorganismo, sendo essencial para a síntese enzimática. Os melhores resultados foram obtidos nos pontos centrais: 40 °C, pH 7,0, 2,0 g_{cél}L⁻¹ e 10 gL⁻¹ de extrato de levedura, alcançando valores da atividade enzimática de 817,0 U_{onpg}g_{cél}⁻¹, 20,9 gL⁻¹ de etanol e produtividade de 0,84 gL⁻¹h⁻¹. Assim, verificou-se que a utilização do permeado de soro de leite pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907 se torna uma alternativa viável na produção de lactase e etanol.

PALAVRAS-CHAVE: β-galactosidase. Bioetanol. Indústria de laticínios.

Luciana Maria Rachow
lucianarachow@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Gracinda Marina Castelo da Silva
gracindamarina@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Lais Eduarda Deina
lais.eduarda@inab.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Whey permeate is a dairy residue resulting from high rate BOD and COD ultrafiltration. From the fermentation its polluting load can be reduced and constitutes raw material for the production of enzymes and biofuel. Thus, the viability of lactase and ethanol production from the fermentation of the permeate by the yeast *Kluyveromyces marxianus* was evaluated. A central composite design was proposed to verify the effect of the variables temperature (30 - 50 °C), pH (6.0 - 8.0), cell concentration (1.0 - 3.0 gL⁻¹) and supplementation with yeast extract (0 to 20 gL⁻¹) in batch mode. Supplementation with yeast extract was found to directly influence the metabolism of the microorganism, being essential for enzymatic synthesis. The best results were obtained at the central points: 40 °C, pH 7.0, 2.0 g_{cél}L⁻¹ and 10 gL⁻¹ yeast extract, reaching enzymatic activity values of 817.0 U_{onpg}g_{cél}⁻¹, 20.9 gL⁻¹ of ethanol and yield of 0.84 gL⁻¹h⁻¹. Thus, it has been found that the use

of whey permeate by yeast *K. marxianus* ATCC 36907 becomes a viable alternative in the production of lactase and ethanol.

KEYWORDS: *β-galactosidase. Bioethanol. Dairy Industry.*

INTRODUÇÃO

O permeado é um resíduo rico em lactose, resultante do processo de concentração do soro de leite por ultrafiltração (BALDASSO, et al., 2011; GABARDO, et al., 2014). Essas moléculas podem ser fermentadas pela *Kluyveromyces marxianus*, uma levedura capaz de produzir β -galactosidase – para a conversão da molécula de lactose, e etanol, resultado do metabolismo de glicólise (SANTIAGO, 2004).

A *K. marxianus* é uma levedura que atua em uma ampla faixa de temperatura (30 – 50 °C) (MANERA, et al., 2008; AL-JAZAIRI, et al., 2015) e pH neutro, pode metabolizar substratos à base de glicose e lactose, produz diversas enzimas (β -glicosidase, poligacturonases e inulinase) (MENA, 2015; TAVARES, 2017) e é do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (SANTIAGO, et al., 2004), o que viabiliza seu uso na indústria de alimentos e farmacêutica.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a viabilidade de produção de etanol pela levedura *K. marxianus*. Para tanto, elaborou-se um delineamento composto central para temperatura, pH, concentração celular e de extrato de levedura e aplicou-se ao processo fermentativo do permeado de soro de leite.

MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Toledo/PR e nos laboratórios da Indústria Nacional de Bebidas – Toledo/PR, utilizando amostras de permeado de soro de leite cedidas pela empresa Sooro – Marechal Cândido Rondon/PR e a levedura *K. marxianus* ATCC 36907, fornecida pela Universidade do Oeste do Paraná – Campus Cascavel/PR.

O microrganismo foi mantido em meio de manutenção “Malt Extract Ágar Base” a 4 °C, com repiques a cada 2 meses. A propagação do microrganismo foi realizada em meio sintético YPD, a 200 rpm, 30°C, por 16 horas (CAMARGO, 2016).

Os ensaios preliminares foram conduzidos em sistema descontínuo. Para esta etapa foram estudadas quatro combinações: 30°C, 1,2 g_{cél}L⁻¹ e pH 5,5; a 40°C, 2,0 g_{cél}L⁻¹ e pH 6,0; 40 °C, 2,0 g_{cél}L⁻¹, pH 7,0 e 10 gL⁻¹ de extrato de levedura e o quarto ensaio com as mesmas condições do terceiro mais agitação de 150 RPM. A partir dos resultados obtidos, restabeleceram-se as condições do processo por meio de um delineamento composto central (19 ensaios) obtido com o software STATISTICA versão 10.0, a partir das variáveis da Tabela 1.

Tabela 1 - Variações de temperatura, pH, concentração celular e suplementação com extrato de levedura, utilizadas nos ensaios de fermentação

Pontos codificados	Temperatura °C	pH	Concentração celular gL ⁻¹	Extrato de levedura gL ⁻¹
-1,68	30	6	1	0
-1	34	6,4	1,4	4
0	40	7	2	10
1	46	7,6	2,6	16
1,68	50	8	3	20

Fonte: Autores (2019).

Após o cultivo, a viabilidade celular foi avaliada pela técnica de contagem em câmara de Neubauer (MOLINARO, CAPUTO, AMENDOEIRA, 2010), a atividade enzimática pelo método do substrato ONPG (RECH, 1998) e a concentração de etanol determinada com o equipamento Beer Analyser, para amostras com um teor alcoólico entre 0-12%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios realizados a 30°C, 1,2 g_{cel}L⁻¹ e pH 5,5 estenderam-se por 120 horas e constatou-se que não houve boa adaptação da levedura, visto que a atividade enzimática (AE) não excedeu 383 U_{ONPG}g_{cel}⁻¹. Alguns autores verificaram que a realização da hidrólise anterior à adição do inóculo propicia melhores resultados (DINIZ, 2013; GABARDO, et al., 2015), bem como a adição de cofatores que estimulem a produção de lactase, como o extrato de levedura (SCHNEIDER, et al., 2001).

A 2ª fermentação (40 °C, 2,0 g_{cel}L⁻¹ e pH 6,0) também se estendeu por 120 horas. Houve o consumo de 29,6% dos carboidratos (25,7 gL⁻¹), com produção de 3,64 gL⁻¹ de álcool e rendimento $Y_{P/S} = 0,31 \text{ gg}^{-1}$. A AE máxima correspondeu a 476,4 U_{onpg}g_{cel}⁻¹ com produção de 3,64g_{cel}L⁻¹ etanol após 96 horas.

Observou-se que como a hidrólise não ocorre de forma imediata, é necessário manter o pH do cultivo controlado. Assim, a lactose presente no permeado hidrolisa e fermenta. Com a fermentação o pH diminui e caso não seja ajustado, a fermentação cessa. Com o ajuste do pH, a atividade enzimática é ativada, a lactose hidrolisa e o meio é novamente fermentado

Santiago et. al (2004), estudando a produção de β-galactosidase por *K. marxianus* ATCC 46537 no soro de leite, em pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm e 1x10⁷ célulasmL⁻¹, verificaram que a suplementação do meio com extrato de levedura propiciou maior crescimento celular e maior produção enzimática, por se tratar de uma fonte de nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com extrato de levedura de 6,0 a 12,0 gL⁻¹ e as maiores AE foram obtidas (apx. 29,0UGImL⁻¹) na maior concentração de extrato de levedura estudada.

No terceiro ensaio fermentativo (40 °C, pH 7,0, 10 gL⁻¹ de extrato de levedura e 2,0 g_{cel}L⁻¹) observou-se que o crescimento celular ocorreu de forma gradativa durante 96 horas de fermentação e estabilizou-se. Houve aumento de biomassa de 1,95 para 5,80 gL⁻¹ até o fim do processo. Com relação à viabilidade celular, o aparecimento de células mortas ocorreu após 48 horas e não excedeu a 2% após

120 horas de fermentação. Os maiores valores de AE, respectivamente iguais a 781,9 e 706,8 $U_{ONPG/g_{cél}^{-1}}$, foram obtidos entre 24 e 48 horas de fermentação. Os maiores consumos de carboidratos ocorreram entre 48 e 72 horas, em consequência de uma maior hidrólise, respectivamente, 40,6% e 71,5%. A partir de 72 horas a atividade enzimática diminuiu até cerca de 490,0 $U_{ONPG/g_{cél}^{-1}}$, e a hidrólise estabilizou em 85,3%.

No quarto ensaio (adição de agitação de 150 RPM) verificou-se após 24 horas um rendimento $Y_{P/S}$ de 0,51 gg^{-1} e uma concentração de etanol de 19,96 gL^{-1} . A AE máxima foi registrada com 3 horas de fermentação, o que mostrou que o processo foi otimizado a partir da inserção de agitação e estabeleceu as condições de realização dos demais experimentos.

A partir dos resultados preliminares realizou-se os ensaios propostos pelo planejamento, com agitação de 150 RPM. Avaliou-se após 3 horas de fermentação a AE (tempo necessário para atingir a maior AE) e os demais parâmetros após 24 horas, tempo necessário para a obtenção do maior rendimento e produtividade de etanol. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos após a realização dos experimentos do planejamento delineamento composto central.

Teste	Temp. °C	pH	Conc. Celular (gL^{-1})	Sup. (gL^{-1})	AE (3h) ($U_{ONPG/g_{cél}^{-1}}$)	Viab. Celular (24h) (%)	P (24h) (gL^{-1})	Prod. Etanol ($gL^{-1}h^{-1}$)
1	46	7,6	2,6	4	508	98,8	5,49	0,23
2	46	7,6	1,4	4	509	99,1	5,34	0,22
3	46	6,4	2,6	16	666	98,3	15,77	0,66
4	34	7,6	1,4	16	601	98,4	11,8	0,49
5	46	6,4	1,4	16	641	98,3	13,13	0,55
6	34	6,4	2,6	4	477	99	4,07	0,17
7	34	7,6	2,6	16	620	98,2	12	0,5
8	34	6,4	1,4	4	462	98,8	3,77	0,16
9	30	7	2	10	636	98,7	12,72	0,53
10	50	7	2	10	692	98,3	16,34	0,68
11	40	6	2	10	589	98,5	10,25	0,43
12	40	8	2	10	575	98,5	9,1	0,38
13	40	7	1	10	717	98	17,12	0,71
14	40	7	3	10	709	98	19,41	0,81
15	40	7	2	0	433	98,9	3,47	0,014
16	40	7	2	20	561	98,1	8,33	0,35
17	40	7	2	10	803	97,9	19,79	0,82
(C)								
18	40	7	2	10	815	98,5	19,98	0,83
(C)								
19	40	7	2	10	817	98,4	20,12	0,84
(C)								

Fonte: Autores (2019).

A partir da Tabela 2, verificou-se que além das condições centrais, os maiores rendimentos e produtividades de etanol foram verificados no ensaio 14 (40 °C, pH 7,0, concentração celular 3,0 g_{cél}L⁻¹ e suplementação com extrato de levedura 10 gL⁻¹) e no ensaio 13 (40 °C, pH 7,0, concentração celular 1,0 g_{cél}L⁻¹ e suplementação com extrato de levedura 10 gL⁻¹), gerando concentrações finais de etanol e produtividades, respectivamente iguais a 19,41 gL⁻¹ e 0,81 gL⁻¹h⁻¹ (ensaio 14) e 17,12 gL⁻¹ e 0,71 gL⁻¹h⁻¹ (ensaio 13).

A partir de uma análise de variância que incluiu os efeitos principais lineares e quadráticos obteve-se os valores críticos para a obtenção da maior enzimática, descritos pelo modelo como temperatura: 41,3 °C, pH = 6,95, concentração celular: 2,04 gL⁻¹ e suplementação com extrato de levedura = 11,10 gL⁻¹ e para a obtenção da maior concentração de etanol gL⁻¹ são: temperatura = 43,4 °C, pH = 6,8, concentração celular = 2,4 gL⁻¹ e suplementação com extrato de levedura = 10,9 gL⁻¹.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se que a suplementação influencia diretamente no metabolismo de *K. marxianus* ATCC 36907. Um bom rendimento foi obtido nas condições do ponto central e comprovou-se a viabilidade do estudo das possíveis combinações entre as variáveis avaliadas. O estudo realizado possui condições de contribuir significativamente com o setor de pesquisa e desenvolvimento de energias renováveis do país, no âmbito das melhores condições a serem empregadas para obtenção de uma maior produtividade, a partir da prática em questão; bem como viabiliza melhorias nos processos da agroindústria leiteira, e dos setores econômico e ambiental. Sugere-se também a inserção da agitação do caldo em fermentação, com o intuito de aumentar a produtividade e a realização de uma análise da composição centesimal final do melhor ensaio, a fim de verificar o consumo de nutrientes pela levedura.

AGRADECIMENTOS

À ORIENTADORA PROF. DRA. GRACINDA MARINA CASTELO DA SILVA, PELA MOTIVAÇÃO E AUXÍLIO DURANTE A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO, À LAÍS PELO ESFORÇO E DEDICAÇÃO E ÀS EMPRESAS SOORO E INDÚSTRIA NACIONAL DE BEBIDAS PELA PARCERIA NO DESENVOLVIMENTO DESTA PESQUISA.

REFERÊNCIAS

- AL-JAZAIRI, M. et al. Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. **International Food Research Journal**. Damascus - Siria, v. 22, n. 4, p.1361-1367, jan. 2015.
- ALVES, E. de P. **Avaliação da produção de etanol e β -galactosidase por diferentes cepas de levedura cultivada em soro de queijo**. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade do Oeste do Paraná, Londrina, Paraná, 2018.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, set. 2011.

- CAMARGO, D. **Produção biotecnológica de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino.** 133 f. Tese (Doutorado) – Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – Paraná, 2016.
- DINIZ, R. H. S. **Otimização do processo fermentativo e análise do secretoma de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em meios contendo lactose em diferentes condições de cultivo.** Tese, Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2013.
- SCHNEIDER, FURLAN, S.A., A.L.S., MERKLE, R., CARVALHO-JONAS, M.F.; JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D - galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium. **Acta Biotechnological**, vol. 21, no. 1, p. 57-64, fev. 2001.
- GABARDO, S. **Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol.** 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2015.
- GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Dynamics of ethanol production from whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** p. 1020, São Paulo, 4 ed. 2008.
- 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.
- MENA, L. P. **Obtenção e conservação da enzima β -galactosidase a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.** 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pampa, Bagé - Rio Grande do Sul, 2015.
- MOLINARO, E. C.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Volume 2. Editora EPSJV, IOC, Rio de Janeiro 2010.
- RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*.** 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, 1998.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 567-572, out-dez. 2004.
- TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica.** 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, 2017.