

## Produção de lipídeos e carotenoides por levedura oleaginosa utilizando permeado de lactossoro

## Production of lipids and carotenoids by oleaginous yeast using whey permeate

### RESUMO

**Rafael Uliam Marttão**  
[rafaelmarttao@alunos.utfpr.edu.br](mailto:rafaelmarttao@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Andréia Anschau**  
[andrejaanschau@utfpr.edu.br](mailto:andrejaanschau@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Laticínios possuem dificuldades no descarte de resíduos por produzirem resíduos altamente poluentes, como o soro do leite proveniente da produção de queijo. Porém, o lactossoro também possui grande quantidade de lactose, sendo um potencial substrato para o cultivo de microrganismos. Um método para a obtenção de bioprodutos através de resíduos é a utilização de leveduras do gênero *Rhodotorula* que possuem a capacidade de produzir bioprodutos como os carotenoides, utilizados em indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica, e lipídeos, com alta expectativa na utilização em indústrias de biocombustíveis. Neste trabalho foi avaliado o crescimento da levedura *R. mucilaginosa* em meios de cultivo YPD com três distintas fontes de carbono: glicose, lactose e permeado de lactossoro. O crescimento celular foi analisado por peso seco e densidade óptica e o consumo de açúcares por DNS. O cultivo contendo permeado de lactossoro resultou no maior rendimento de substrato em células, 0,301 g/g, resultando em 10,5 g/L de biomassa. Assim, verifica-se que o lactossoro possui nutrientes necessários para o cultivo da levedura para a geração de bioprodutos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioprodutos. Lactossoro. *Rhodotorula mucilaginosa*.

**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

Dairy products have difficulty disposing of waste because they produce highly polluting waste, such as whey from cheese production. However, the whey also has a large amount of lactose, being potential substrate for the cultivation of microorganisms. A method for obtaining bioprodutos through residues is the use *Rhodotorula* yeasts that have the ability to produce bioprodutos such as carotenoids, used in the cosmetics, food and pharmaceutical industries, and lipids, with high expectation for use in biofuel industries. In this work we evaluated the growth of *R. mucilaginosa* yeast in YPD culture media with three distinct carbon sources: glucose, lactose and whey permeate. Cell growth was analyzed by dry weight, optical density and sugar consumption by DNS. Cultivation containing whey permeate resulted in the highest substrate yield in cells, 0.301 g/g, result in 10.5 g/L biomass. Thus, it appears that the whey has nutrients necessary for the cultivation of yeast for the generation of bioprodutos.

**KEYWORDS:** Bioprodutos. Whey. *Rhodotorula mucilaginosa*.

## INTRODUÇÃO

A expansão do setor agroindustrial no Brasil tem proporcionado um aumento na concentração de resíduos produzidos que, ao serem descartados de maneira incorreta, resultam em impactos ambientais, afetando negativamente a região. Dentre essas indústrias, destacam-se os laticínios.

Do total de leite destinado à produção de queijo, 80 a 90% representam o volume de lactossoro gerado, sendo este um subproduto abundante. Porém, o valor nutricional encontrado neste resíduo compara-se a aproximadamente 55% dos nutrientes encontrado no leite, podendo ser reutilizado como substrato para cultivo de organismos (Rech, 2003).

A utilização de óleos provenientes de microrganismos para produção de biocombustíveis tem recebido atenção no mercado para suprir a demanda sem a necessidade de utilizar grandes áreas cultiváveis, diminuindo a concorrência com a indústria alimentícia. O óleo microbiano apresenta uma estrutura semelhante à dos óleos vegetais, apresentando cadeias de 14 a 20 carbonos e possui potencial para a indústria de biocombustível e oleoquímica.

Além disso, a utilização de subprodutos para o cultivo de microrganismos, pode resultar na produção de moléculas de interesse, por meio de excreção do microrganismo ou armazenamento no meio intracelular, podendo produzir fármacos, corantes, cosméticos, entre outros.

Alguns microrganismos também possuem a capacidade de produzir carotenoides. Este tem sua utilidade relacionada a indústria alimentícia, farmacêutica, tendo potencial para síntese de vitamina A, corante natural, antioxidante, fotoprotetor e atividades imunomoduladoras.

A produção de bioprodutos por microrganismos tem sido de grande interesse por facilitar e aumentar a produção, reduzindo custos do processo e devido a matéria-prima ter baixo valor econômico.

Dentre os microrganismos oleaginosos e produtores de carotenoides, destaca-se o gênero *Rhodotorula sp.* devido a sua eficácia em sintetizar lipídeos e carotenoides. As espécies *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula graminis* possuem um grande potencial para a produção de carotenoides e lipídeos em escala industrial por terem a capacidade de se desenvolver em substratos de resíduo industrial ricos em açúcar, diminuindo o valor econômico voltado a produção do mesmo.

Este estudo tem como objetivo a utilização do permeado de lactossoro como matéria prima para a obtenção de carotenoides, lipídeos e biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de lactossoro foram cedidas pelo Laticínio Cruzeiro Ltda, localizado no Cruzeiro do Iguaçu, Paraná. Para a obtenção do permeado de lactossoro, a amostra de soro do leite foi exposta a temperatura de 121 °C e pressão de aproximadamente 1,2 atm por 15 minutos, e suas proteínas removidas por centrifugação.

Para caracterização físico-química, foram feitas análises de pH, lactose, gordura e densidade de acordo com Zenebon, Pascuet e Tiglia (2008).

Os cultivos foram feitos empregando a levedura oleaginosa *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 58901. A linhagem foi mantida a 4°C com repiques mensais em ágar inclinado YPD (3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar, com pH ajustado a 5,5). Para o inóculo, foi usado o meio YPD sem adição de ágar. Nos cultivos, foram utilizadas diferentes fontes de carbono: glicose (50 g/L), lactose (47,5 g/L) e permeado de lactossoro (51 g/L), mantendo a razão C/N 20, que favorece o crescimento celular. Nos ensaios contendo glicose ou lactose, foram adicionados ainda (g/L): 0,1 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,04 de CaCl<sub>2</sub> e 1,87 de extrato de levedura. No ensaio contendo permeado de lactossoro não foi feita suplementação dos minerais, somente a adição de extrato de levedura, em função do permeado de lactossoro ser constituído naturalmente por minerais. O pH dos meios foi ajustado para 6,3 em todos os cultivos. Os cultivos foram feitos de duplicata em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de volume útil.

Os cultivos foram feitos em Shaker a 29°C, 150 rpm durante 414 horas. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados para análise do crescimento celular e consumo dos açúcares. Ao final do cultivo, a biomassa foi separada do meio de cultivo por centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos, lavando a biomassa duas vezes com água destilada.

A determinação da massa celular seca foi feita mediante liofilização através do método adaptado de Martins, Costa; Prentice-Hernández (2009). Também foi feita a quantificação indireta da massa celular, mediante leitura espectrofotométrica em 600 nm. Foi feita uma curva padrão para o microrganismo usando a massa celular obtida no cultivo. Foram retiradas amostras, feitas diferentes diluições e para cada uma delas foi determinada a densidade ótica e respectiva massa seca para obtenção da curva de calibração.

A viabilidade das culturas e morfologia celular foram verificadas por microscopia óptica, em lâminas preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas pela adição de igual volume de solução azul de metileno (0,01%, p/v) dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (Odumeru, D'Amore, Russell, & Stewart, 1992).

O consumo de açúcares redutores totais (ART) foi determinado pelo método de DNS, a partir de curva de calibração de glicose e de lactose (VASCONCELOS, 2013).

Para a análise de lipídeos totais, a massa celular seca foi previamente tratada com ácido clorídrico (2M), incubada a 80°C por 1h e centrifugada a 6.000G a 4°C por 15 min. Após a extração, os lipídeos foram quantificados gravimetricamente utilizando o método de extração de Bligh & Dyer (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (2001).

Para a extração e quantificação dos carotenoides totais, foi adicionado 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo na biomassa previamente tratada para o rompimento celular. Após a formação de duas fases, os extratos carotenogênicos foram separados e sua concentração foi determinada por espectrometria a 448nm (CABRAL et al, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados da caracterização físico-química do lactossoro (L) e permeado de lactossoro (P).

Tabela 1 - Caracterização físico-química de lactossoro (L) e permeado de lactossoro (P)

	pH	Turbidez (NTU)	Lactose (g/L)	Acidez (g/ácido láctico)	Gordura (%)	Densidade (g/mL)
L	6,19	893	50,1	0,13	0	1026,0
P	5,70	869	60,9	0,10	0	1026,2

Fonte: Autoria própria (2019).

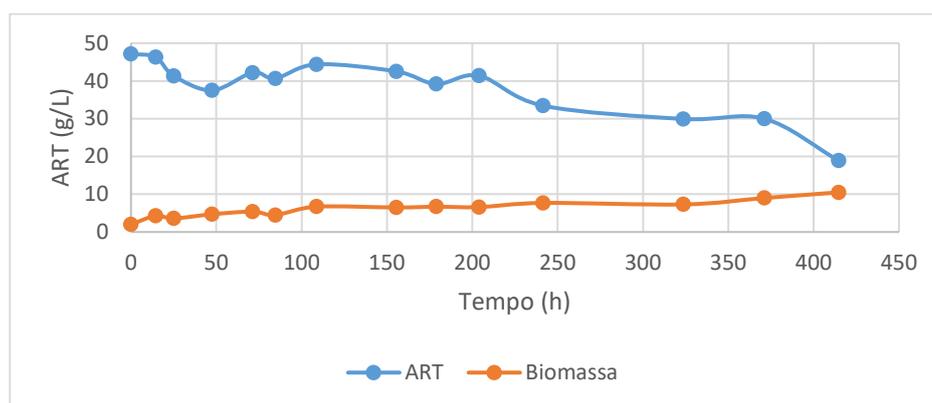
Os valores obtidos se enquadram com a literatura, confirmando que o soro de leite obtido é ácido (Zacarchenco, 2013).

Pode-se observar o valor nutricional presente no lactossoro e permeado, principalmente pela alta concentração de lactose, sendo indicados como fontes de carbono para cultivos de microrganismos.

No cultivo do permeado de lactossoro (Figura 2), observa-se que a *R. mucilaginosa* apresentou capacidade de consumir a lactose presente no permeado e a concentração celular ao final do cultivo foi de 10,5 g/L, resultando em rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) de 0,301 g/g.

Estes valores são comparáveis com os presentes na literatura, segundo Cazetta (2005), a levedura *R. mucilaginosa* apresenta a capacidade de se desenvolver em meio alternativos com fonte de carbono, como a vinhaça bruta, e assim produzir metabólitos secundários.

Figura 2 – Concentração celular e de ART em cultivo contendo permeado de lactossoro

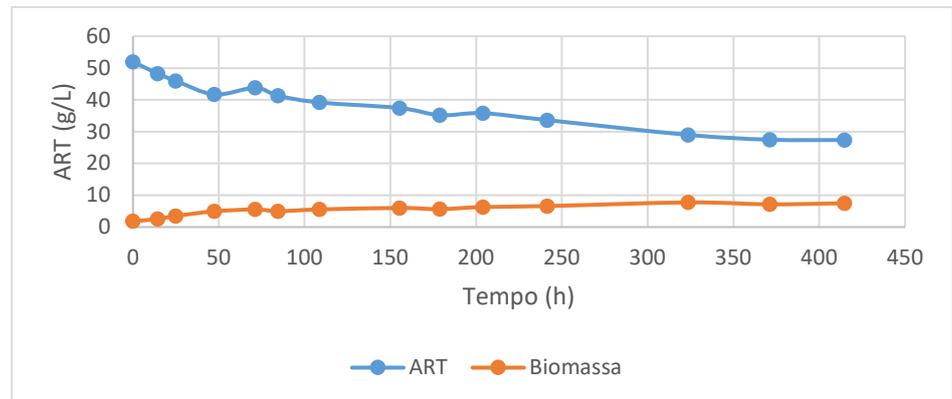


Fonte: Autoria própria (2019).

O cultivo contendo glicose apresentou rápido crescimento celular já no início da fermentação (Figura 3), comparado ao cultivo contendo permeado, com a concentração celular de 7,5 g/L e apresentando rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) de 0,230 g/g.

Verificou-se ainda, que a partir da fase estacionária de crescimento celular, o consumo de glicose até o final da fermentação foi baixo.

Figura 3 – Concentração celular e de ART em cultivo contendo glicose

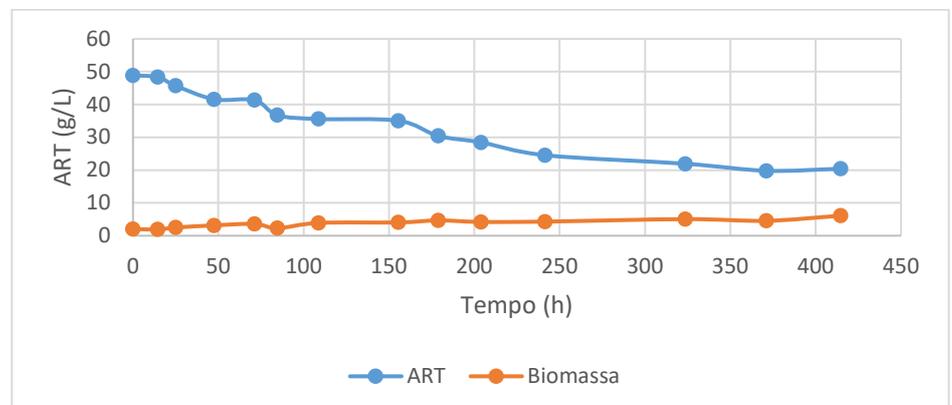


Fonte: Autoria própria (2019).

O crescimento celular em meio contendo lactose foi mais lento (Figura 4) e resultou na mais baixa concentração celular ao final do cultivo, de 6,1 g/L. O rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) também foi o mais baixo entre os cultivos (0,142 g/g).

Esses resultados mostram que a levedura apresentou dificuldades para crescer neste meio, mesmo tendo consumido grande parte da lactose. Parte da lactose consumida pela levedura pode ter sido usado para a produção de metabólitos secundários não quantificados nesse estudo.

Figura 4 – Concentração celular e de ART em cultivo contendo lactose



Fonte: Autoria própria (2019).

## CONCLUSÕES

A utilização de um meio de cultivo composto de permeado de lactosoro proporcionou a mais elevada concentração celular e o melhor coeficiente de conversão da fonte de carbono em células, dentre as três fontes de substrato estudadas. O permeado de lactosoro configura-se como um substrato potencial para o cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, bem como para a produção de lipídeos e carotenoides que ainda necessitam ser quantificados para posterior otimização do processo.

## REFERÊNCIAS

CABRAL, Maria Marina Serrão et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 233, n. 1, p.159-166, 4 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/257373040\\_Carotenoids\\_production\\_from\\_a\\_newly\\_isolated\\_Sporidiobolus pararoseus\\_strain\\_by\\_submerged\\_fermentation](https://www.researchgate.net/publication/257373040_Carotenoids_production_from_a_newly_isolated_Sporidiobolus pararoseus_strain_by_submerged_fermentation)>. Acesso em: 18 ago. 2019.

CAZETTA, Marcia Luciana et al. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.105-112, 15 dez. 2005. UEL. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2005v26n2p105>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

Odumeru, J. A., D'Amore, T., Russell, I., & Stewart, G. G. (1992). Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. *Journal of industrial*.

RECH, R. Estudo da produção de beta-galactosidase por leveduras a partir do sode queijo. 2003. 86 f. Tese (Doutorado) – Curso de Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2003. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/77969/000383226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. Disponível em: [www.cnpat.embrapa.br%2Fdownload\\_publicacao.php%3Fid%3D463&usg=AOvVaw3wSlqUrzGKe7mclS3lqnoE](http://www.cnpat.embrapa.br%2Fdownload_publicacao.php%3Fid%3D463&usg=AOvVaw3wSlqUrzGKe7mclS3lqnoE). Acesso em: 14 ago. 2019.

ZACARCHENCO, P. B. *et al.* Aplicações de soro de queijo em bebidas. **Indústria de laticínios: Tratamento de efluentes a natureza agradece**, Industria de laticínios, 1 ago. 2013. Disponível em: [http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/Aplicacoes\\_de\\_soro\\_de\\_queijo\\_em\\_bebidas\\_Revista\\_Industria\\_de\\_Laticinios.pdf](http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/Aplicacoes_de_soro_de_queijo_em_bebidas_Revista_Industria_de_Laticinios.pdf). Acesso em: 14 ago. 2019.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.