

Obtenção de substrato para fermentação a partir de hidrólise ácida de lactosoro

Production of lipids and carotenoids by oleaginous yeast using whey permeate

RESUMO

Rafael Uliam Martão
rafael.uliam98@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Andréia Anschau
andreianschau@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 lactosoro também possui grande quantidade de lactose, sendo um potencial substrato para o cultivo de microrganismos para a obtenção de bioprodutos. Leveduras do gênero *Rhodotorula* possuem a capacidade de produzir carotenoides, utilizados em indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica, e lipídeos, com potencial aplicação em indústrias de biocombustíveis. Nesse trabalho, foi avaliada a cinética de hidrólise ácida da lactose para a utilização como fonte de carbono para cultivos com a levedura, assim como a seleção de linhagens produtoras com maior produção de lipídeos por mutagênese aleatória. A hidrólise apresentou maior velocidade com pH de 0,5 no qual também apresentou maior concentração de glicose final (2,2 g/L). A mutagênese não foi concluída por conta do cenário de pandemia atual, necessitando de mais estudos para a sua conclusão. Assim, verifica-se que a hidrólise da lactose pode ser utilizada para o pré-tratamento para posterior aplicação em meios de cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprodutos. Hidrólise ácida. *Rhodotorula mucilaginosa*. Permeado de soro.

ABSTRACT

Dairy industries have difficulties in waste disposal because they produce highly pollutants, such as whey from cheese production. However, whey also has a large amount of lactose, being a potential substrate for cultivation of microorganisms to obtain bioproducts. *Rhodotorula* yeasts have the capacity to produce carotenoids, used in cosmetic, food and pharmaceutical industries, and lipids, with potential application in biofuel industries. In this work, the kinetics of acid hydrolysis of lactose was evaluated for use as a carbon source for yeast cultivation, as well as the selection of strain with high production of lipids by random mutagenesis. The hydrolysis presented greater velocity with a pH of 0,5 in which also presented greater concentration of final glucose (2,2 g/L). The mutagenesis was not concluded because of the current pandemic scenario, requiring more studies for its conclusion. Thus, it is verified that the hydrolysis of lactose can be used for pre-treatment for later application in culture media.

KEYWORDS: Bioproducts. Acid hydrolysis. *Rhodotorula mucilaginosa*. Whey permeate.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

De acordo com o IBGE, o estado do Paraná se encontra em segunda posição dos estados com maior produção de leite, tendo um crescimento de 55% em um período de dez anos. A região sudoeste do estado se destaca por ser a maior produtora de volume de leite do estado e pelo seu crescimento na produção de leite de aproximadamente 98% entre 2007 e 2017.

A expansão deste setor resulta no aumento da concentração de resíduos agroindustriais e agropecuários produzidos que podem ser descartados no meio ambiente de maneira incorreta ou sem tratamento. Conseqüentemente, elevam-se os impactos ambientais gerados na região, sendo a busca pelo descarte correto ou reutilização desses resíduos um desafio no meio do agronegócio.

A reutilização desses resíduos gira, basicamente, em torno da produção de bioprodutos, como os insumos agrícolas, fonte de energia renovável ou uma fonte de renda para o produtor utilizando agrotecnologias ou biotecnologias sustentáveis. Tendo em vista um bioproduto proveniente desses resíduos que gere um impacto econômico e ambiental positivo.

Dentre essas indústrias, destacam-se os laticínios. No primeiro trimestre de 2020, a quantidade de leite cru industrializado no território nacional, resfriado ou não, atingiu aproximadamente mais de seis milhões de litros, de acordo com o IBGE, sendo mais de 827 mil litros no Paraná, e mais de 3 milhões de toneladas de queijo foram produzidas com inspeção federal no Brasil em 2016.

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.

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. 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.

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.

A lactose é um dissacarídeo, sendo complexo a utilização direta dela, seja na indústria ou em microrganismos, visando isto, a lactose pode ser hidrolisada em glicose e galactose, moléculas mais simples e com mais aplicações.

A hidrólise da lactose pode ser feita por métodos químicos ou enzimáticos. O método enzimático ocorre em condições específicas para cada enzima e requer uma etapa final de separação das enzimas do produto, além de representar um

método com custo elevado. O método químico necessita de temperaturas elevadas e pH ácido, tendo o produto final com aparência escura e odor característico, porém possui menor custo comparado com a hidrólise enzimática.

Este estudo teve como objetivo a hidrólise ácida da lactose e do permeado de lactossoro para a utilização como substratos para a obtenção de carotenoides, lipídeos e biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, e a seleção de linhagens produtoras com maior produção de lipídeos por mutagênese aleatória.

METODOLOGIA

Caracterização do lactossoro e permeado do lactossoro. As amostras de leite e lactossoro foram cedidas pelo Laticínio Cruzeiro Ltda, localizado no Cruzeiro do Iguçu, Paraná. As análises físico-químicas foram executadas nas localidades da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e no Laticínio Cruzeiro Ltda. 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 filtração a vácuo.

Para caracterização físico-química, foram feitas análises de pH, lactose, gordura e densidade de acordo com Zenebon, Pascuet e Tiglia (2020). Para a análise da lactose, foi utilizado o método colorimétrico para a determinação de açúcares redutores totais (ART) utilizando o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como oxidante, preparado e analisado de acordo com Miller (1959). Na determinação da gordura nas amostras, foi utilizado o método de Gerber, que consiste no tratamento das amostras utilizando ácido sulfúrico e álcool amílico no butirometro de Gerber.

Manutenção. Os cultivos foram feitos empregando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 58901. A linhagem foi mantida a 4°C com repiques mensais em ágar inclinado YMA (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar) com pH ajustado a 5,5.

Hidrólise da lactose. A hidrólise química da lactose foi feita em duplicata, sendo utilizados frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de permeado de lactossoro. As amostras tiveram o pH ajustado em 0,5; 1,0 e 1,5 com HCl 2N e foram submetidas à banho maria a 100°C com agitação. Alíquotas de 1mL foram retiradas de cada frasco em 0, 5, 10, 30, 45, 60 minutos, seguidas de congelamento. A concentração de glicose presente na amostra após a hidrólise foi determinada por kit enzimático-colorimétrico de glicose-oxidase.

Mutagênese aleatória. A irradiação ultravioleta (UV) foi feita em uma caixa com diâmetros de 53cm de comprimento, 28,7cm de largura e 25cm de altura, contendo duas lâmpadas de 15 W cada. A emissão de energia foi estimada em 27 mJ.s⁻¹.cm⁻¹. Para a mutagênese foi utilizado um inóculo preparado em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose e 20 g/L de peptona) sem adição de ágar. Após 48 horas, o inóculo foi passado para uma placa de petri esterilizada, e submetido à luz ultravioleta da caixa, por 20, 30 e 45 minutos. Em cada tempo, foram retiradas amostras de 1mL, diluídas para 10³ células/mL e transferidas para placas de petri com meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose e 20 g/L de peptona e 20 g/L de ágar). A seguir, as placas foram incubadas em incubadora BOD para posterior contagem de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados da caracterização físico-química do lactossoro (L) e permeado de lactossoro (P). Os valores obtidos se enquadram com a literatura, confirmando que o soro de leite obtido é ácido.

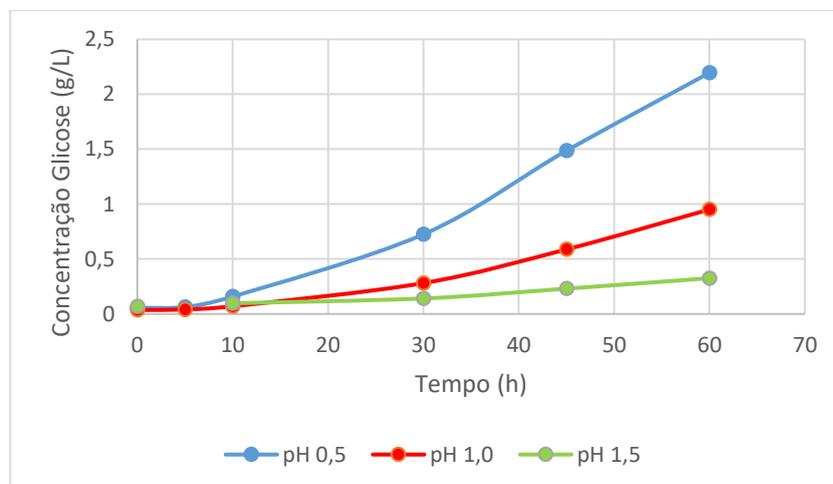
Tabela 1 - Caracterização físico-química de lactossoro (L) e permeado de lactossoro (P)

Amostra	pH	Turbidez (NTU)	ART (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

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

A cinética da hidrólise da lactose está apresentada na Figura 1, em que é possível observar o aumento da concentração de glicose ao longo do tempo sendo o pH de 0,5 o mais eficiente para o processo.

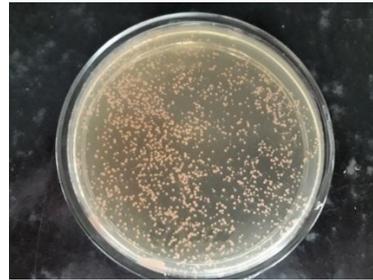
Figura 1: Concentração de glicose em função do tempo de hidrólise, para os diferentes pH.



A hidrólise ácida utilizada neste estudo, tem a característica de ser mais rápida e de menor custo se comparada com a hidrólise enzimática. Porém, a hidrólise ácida necessita de altas temperaturas e seu produto final apresenta coloração escura e odor não característico, impossibilitando o seu uso direto nas indústrias alimentícias, mas com alto potencial como fonte de carbono para microrganismos.

Os estudos de mutagênese aleatória apresentaram resultados inconclusivos, pois mesmo para as placas com inóculo exposto a 60 min de irradiação UV, observou-se alto crescimento celular nas diluições utilizadas, impossibilitando a contagem celular e posterior isolamento de colônias.

Figura 2: Placa de petri com inóculo exposto a irradiação UV por 60 minutos.



CONCLUSÕES

A hidrólise química da lactose pode ser utilizada para disponibilização de monossacarídeos para posterior utilização como fontes de carbono em meios de cultivo. Sugere-se estudos futuros com diferentes métodos, períodos e pHs para obtenção de maiores concentrações de glicose resultantes da hidrólise. Em relação à mutagênese, em função da pandemia do Covid-19, esse estudo foi paralisado, mas será retomado posteriormente, estudando-se períodos de tempo de irradiação UV mais prolongados.

REFERÊNCIAS

AGROINDÚSTRIA. EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/agroindustria>. Acesso em: 10 de agosto 2020.

ASSUNÇÃO, G. M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. 2014. Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo (Mestre em Engenharia Química) - Mestrado, Toledo - PR, 2014.

CARMINATTI, C. A.. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/81434>. Acesso em: 30 ago. 2020.

ESTADO DO PARANÁ; SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (SEAB); DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (DERAL). **Sericultura no estado do Paraná. Pecuária de Leite**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-01/leite_2020_0.pdf . Acesso em: 29 ago. 2020.

IBGE. **Quantidade de leite cru adquirido e industrializado no mês e no trimestre (mil litros), 1º trimestre 2020**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=destaques> Acesso em: 10 de agosto 2020.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbial Technology*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n.8, p.583-592. 2000.

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

PIB do agronegócio brasileiro. Cepea. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 10 de agosto 2020.

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>

SANTOS, A. A. et al . Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas , v. 20, e2015113, 2017 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232017000100402&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Aug. 2019. Epub Jan 26, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.11315>.

SILVA, R. O. P.; BUENO, C. R. F.; SÁ, P. B. Z. R. ASPECTOS RELATIVOS À PRODUÇÃO DE SORO DE LEITE NO BRASIL, 2007-2016. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 1, n. 12, p. 5-49, jun. 2017. Trimestral. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/ie/2017/ie-0417.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2020.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FÚRIGO, A. Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

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. Acesso em: 14 ago. 2019.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coord.). **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 1. ed. atual. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2019.