

SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

Aproveitamento do soro de leite para a produção concomitante de β -galactosidase e proteína microbiana utilizando *Kluyveromyces lactis*

Gabriela F. Alvarenga^{*1}; Bianca M. P. e Silveira¹; Bruna G. S. Souza¹; Julia S. Pinheiro¹; Tiago J. Guedes²; Nísia A.V. D. Pinto³; Janaína T. de Faria⁴; Fábio C. Sampaio⁵

¹Discentes, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFVJM, Diamantina, Brasil

²Técnico, Instituto Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFVJM, Diamantina, Brasil

³Docente, Departamento de Nutrição, UFVJM, Diamantina, Brasil

⁴Docente, Instituto de Ciências Agrárias, UFMG, Montes Claros, Brasil

⁵Docente, Departamento de Farmácia, UFVJM, Diamantina, Brasil

*Autor para correspondência: gabrielafalvarenga@gmail.com

RESUMO: O soro de leite (SL), um coproduto da indústria de laticínios, foi avaliado como meio alternativo para a produção de biomassa celular de *Kluyveromyces lactis*. Após o cultivo da levedura em batelada a 35 °C e 150 rpm, por 23 h, foi determinada a atividade de β -galactosidase (β -gal) a partir das células permeabilizadas e a composição proteica da biomassa íntegra. A atividade específica de β -gal determinada foi igual a 27.363,5 U g⁻¹, enquanto a biomassa apresentou um teor de proteína igual a 5,73% (p/p). Estes resultados confirmaram a possibilidade de utilização do SL como meio alternativo e das células de *K. lactis* cultivadas nesse meio como fonte de β -galactosidase. Além disso, é possível a utilização da biomassa remanescente do processo de recuperação da enzima como *single cell protein*.

Palavras-chave: Biomassa íntegra. Composição centesimal. *Single Cell Protein*.

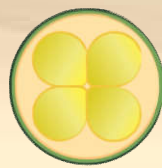
INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil ocupa o sexto lugar no *ranking* de produção de leite mundial (USDA, 2016), sendo responsável pela produção de 35 bilhões de litros de leite no ano de 2016 (CARVALHO e CARNEIRO, 2016). Grande parte desse leite é utilizada para produção de diferentes produtos lácteos e estima-se que as indústrias desse setor produzam aproximadamente 4 bilhões de litros de soro de leite (SL) como coproduto (CARVALHO e CARNEIRO, 2016).

A levedura *Kluyveromyces lactis* é um dos micro-organismos capazes de utilizar a lactose residual presente no SL como fonte de carbono e energia, uma vez que possui as enzimas lactose permease e β -galactosidase, necessárias para o metabolismo da lactose (RUBIO-TEIXEIRA, 2006). A partir das células de *K. lactis* cultivadas em SL pode-se extrair e purificar a β -galactosidase, uma enzima de interesse industrial que, além de ser utilizada na obtenção de leite hidrolisado, é estudada para processos de conversão de lactose em diferentes produtos de interesse comercial, como por exemplo, os prebióticos galacto-oligossacarídeos (RICHARDS, 1997). Além disso, a própria biomassa celular de *K. lactis*, como *single cell protein*, pode ser utilizada como alternativa para fontes proteicas convencionais (RAVINDRA, 2000).

Por possuir o status de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), é possível a utilização dessa levedura e de seus produtos em alimentos para consumo humano (VAN OUYEN et al., 2006). Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar





SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

a produção de biomassa de *K. lactis* e a atividade de β -galactosidase das células, utilizando, como meio alternativo, o soro de leite.

MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Kluyveromyces lactis* (CBS 2359) foi repicada semanalmente em ágar YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de dextrose e 20 g L⁻¹ de ágar) e incubada à temperatura ambiente por 48-72 horas para a realização dos experimentos.

Para a obtenção do soro, o pH de 400 mL de leite desnatado UHT (Figura 1A), a 15-18 °C e sob agitação, foi modificado para aproximadamente 4,7 utilizando uma solução de HCl (33% v/v). O leite foi, então, (i) deixado em repouso (30 minutos) à temperatura ambiente, (ii) aquecido em forno micro-ondas até temperatura de fervura e (iii) novamente deixado em repouso por 30 minutos em caixa térmica (Figura 1B). Após esse período, todo volume foi centrifugado a 2500 rpm, por 5 minutos (Figura 1C). O soro de leite sobrenadante (SL) foi autoclavado (Figura 1C) e posteriormente centrifugado assepticamente a 2000 rpm por 5 min para separação do precipitado (Figura 1D).

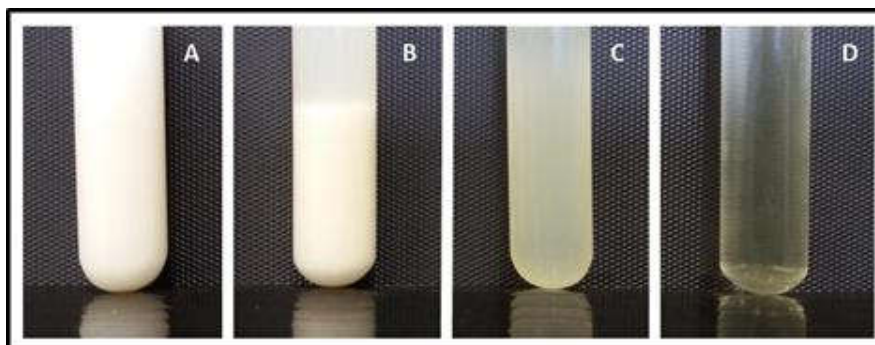


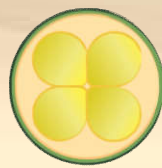
Figura 1 - Preparo do soro de leite: A - Leite UHT desnatado a 15-18 °C, B - Precipitado após acidificação (pH 4,7) e aquecimento do leite, C - Soro de leite após esterilização e D - Soro de leite após esterilização e centrifugação estéril.

Para preparação do inóculo, uma alçada de células novas (48-72 h de incubação) de *K. lactis* foi transferida para um frasco Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de SL. O frasco foi incubado em agitador rotacional a 150 rpm e 35 °C por 14-18 h. Após esse período o SL foi centrifugado assepticamente a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi então lavado duas vezes, assepticamente, com água estéril e ressuspensionado em 6 mL de água estéril. A padronização do inóculo inicial foi realizada aferindo a densidade óptica (DO) da suspensão anterior a 600 nm (DO_{600nm}) e inoculando 0,036-0,18 g L⁻¹ de biomassa seca de *K. lactis* em SL (1 DO_{600nm} = 0,60 g L⁻¹ de biomassa seca).

As células de *K. lactis* inoculadas em 25 mL de SL (quadruplicata) foram incubadas a 35 °C por 24 h. Aliquotas de 1 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para determinação da DO_{600nm} e, posteriormente, foram centrifugadas (2500 rpm, 3 min). Os *pellets* resultantes foram congelados imediatamente em tubos Eppendorfs a -20 °C.

A atividade de β -galactosidase para as células de *K. lactis* após 24 h de cultivo (triplicata) foi determinada de acordo com a metodologia de Gietz et al. (1977), com modificações. Os *pellets* de 1 mL das amostras coletadas foram ressuspensionados em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1





SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

M (pH 7,2) contendo 0,1 mM de $MgSO_4$. Foi utilizado apenas clorofórmio como agente permeabilizante e 8 minutos para a reação realizada à temperatura ambiente. O *pellet* residual, após o término da reação, foi removido por centrifugação (2000 rpm, 2 min) e a absorvância a 420 nm aferida em espectrofotômetro. Uma unidade de β -gal (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de *o*-nitrofenol (*o*-NP) por minuto. A concentração de *o*-NP liberada foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 4,53 L mol⁻¹cm⁻¹ para esse composto. A atividade específica de β -gal foi calculada dividindo a quantidade de Unidade de enzima (U) pela quantidade em grama de biomassa em 500 μ L. A composição centesimal do soro de leite e a composição proteica da biomassa microbiana íntegra (sem rompimento celular) foram determinadas segundo as metodologias descritas pelo Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS (BRASIL, 2003). Para determinação do teor de proteína foi utilizado fator de conversão da relação nitrogênio/proteína igual a 6,38, enquanto a acidez foi determinada em ácido láctico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do soro de leite (SL), obtido segundo a metodologia de preparo descrita, foi determinada e é apresentada na Tabela 1. Para o cultivo da levedura *Kluyveromyces lactis* em SL, a curva de crescimento correspondente é apresentada na Figura 2. Nela foram detectadas as três fases características do crescimento dos micro-organismos (*lag*, Exponencial e estacionária). Estudos ainda não publicados determinaram que, para esse cultivo, a velocidade específica de crescimento (μ), a produtividade volumétrica de biomassa (Q_X) e o rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) foram iguais a $0,58 \pm 0,08$ h⁻¹, $0,34 \pm 0,0$ g L⁻¹h⁻¹ (23 h de cultivo) e $0,16 \pm 0,01$ g g⁻¹ (23 h de cultivo), respectivamente.

Tabela 1 - Composição centesimal do soro de leite utilizado como meio de cultivo

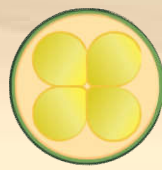
Componentes	Soro de Leite
Proteína (% p/p)	0,65 \pm 0,00
Cinzas (% p/p)	0,87 \pm 0,00
Extrato Seco (% p/p)	6,98 \pm 0,00
Acidez (% p/p)	0,28 \pm 0,00
pH	4,82 \pm 0,04

Para o ponto correspondente a 23 h na Figura 2 foi observado um acúmulo máximo de biomassa seca de aproximadamente 11,2 g L⁻¹. Semelhantemente, Moeini et al. (2004) observaram acúmulo de biomassa de *K. lactis* variando entre 11,09 e 11,79 g L⁻¹ em SL. Já Hun et al. (2013), em meio sintético com lactose e outras suplementações, simulando a composição do SL, observaram acúmulo de 6,32 g L⁻¹ de biomassa de *K. lactis*, um valor menor que o observado no presente trabalho.

Para as células de *K. lactis* acumuladas após 23 h de cultivo foi determinada a atividade de β -galactosidase (β -gal) após permeabilização com clorofórmio (dados não apresentados). A permeabilização permitiu a liberação de 1,68 μ mol *o*-NP min⁻¹ na mistura de reação como resultado da atividade de β -gal, o que corresponde a 1,68 Unidades (U) da enzima. Para um grama de biomassa seca de *K. lactis* foram detectadas 27363,5 U de β -gal, ou seja, uma atividade específica igual a 27.363,5 U g⁻¹.

Para a possível utilização da biomassa de *K. lactis* para a produção de *single cell protein*, foi





SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

determinada a composição proteica da biomassa íntegra (CPBI) acumulada após 23 h de cultivo (dados não apresentados). A CPBI de *K. lactis* cultivada em SL (5,73%, p/p) foi aproximadamente 9 vezes maior que a composição proteica do SL utilizado, apresentada na Tabela 1 (0,65%, p/p). Assim, a utilização do SL permitiu a obtenção de um produto com maior valor proteico e pode-se concluir que a produção de biomassa pode agregar valor à utilização desse coproduto.

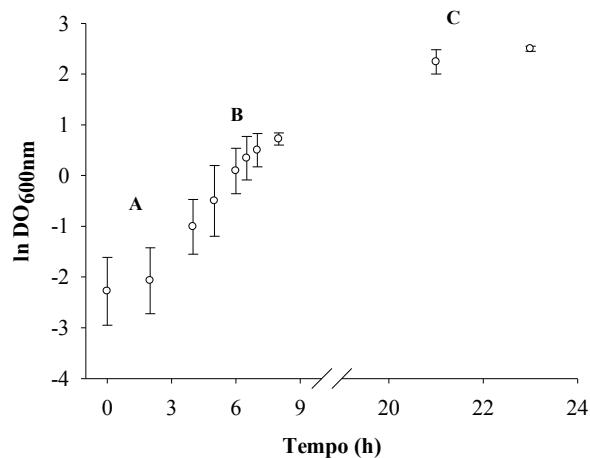


Figura 2 - Curva de crescimento para o cultivo de *K. lactis* em soro de leite: A - Fase de crescimento lag, B - Exponencial e C - Estacionária.

CONCLUSÃO

O soro de leite mostrou-se uma boa alternativa para produção de biomassa de *Kluyveromyces lactis*. A biomassa íntegra de *K. lactis* apresentou teor de proteína maior que o encontrado no soro de leite desproteínizado, associado também a uma alta atividade de β -galactosidase. Estes resultados estimulam novos estudos para, concomitantemente, utilizar a biomassa para extração da enzima β -galactosidase e a biomassa remanescente como *single cell protein*. Posteriormente será necessário definir a composição de aminoácidos das proteínas, de ácidos graxos dos lipídios e de minerais, bem como realizar os testes biológicos necessários para avaliar o aproveitamento nutricional das proteínas da biomassa de *K. lactis*.

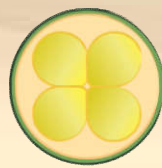
AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Farmácia (Laboratório de Bioprocessos) e ao Departamento de Nutrição (Laboratório de Café e Biomassa do Cerrado), ambos da FCBS/UFVJM, pela disponibilidade dos ambientes e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-ia/met-poa-11-02-proteinas.pdf>>. Acesso em: 04 junho de 2017.





SIMEALI

II Simpósio de Engenharia
de Alimentos da UFMG

Sustentabilidade



Uma nova perspectiva na
produção de alimentos

CARVALHO, G. R.; CARNEIRO, A. V. Indicadores: Leite E Derivados. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, v. 7, n. 55, jun. 2016.

GIETZ, R. D. et al. Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 172, p. 67-79, 1997.

HUN, C. H. et al. Bioprocess development for high biomass production of the probiotic yeast *Kluyveromyces lactis*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 59, p. 49-59, 2013.

MOEINI, H.; NAHVI, I.; TAVASSOLI, M. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 252-258, 2004.

RAVINDRA, P. VALUE-ADDED FOOD: Single Cell Protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459-479, 2000.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de Laticínios**, mai/jun, p. 67-69, 1997.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT AGRICULTURE – USDA. **World Agricultural Projections**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/regions/brazil>>. Acesso em: 10 maio de 2017.

VAN OUYEN, A. J et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 381-392, 2006.

