



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

## USO DO SORO DE LEITE SUPLEMENTADO PARA O CULTIVO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *KLUYVEROMYCES*

**Autores:** HANDRAY FERNANDES DE SOUZA, LARA AGUIAR BORGES, SANDRO BRAGA SOARES, IGOR VIANA BRANDI

### Introdução

O soro de leite, coproduto da indústria de laticínios, é composto por lactose (4,5-5% p/v), proteínas (0,6-0,8% p/v), lipídios (0,4-0,5% p/v) e sais minerais (8-10% de extrato seco) (DRAGONE et al., 2011). A lactose do soro é responsável pela alta demanda biológica de oxigênio (DBO = 30-50 g/L), bem como demanda química de oxigênio (DQO = 60-80 g/L) desse co-produto (GUIMARÃES et al., 2010). Assim, sua utilização como fonte de carbono em diferentes bioprocessos pode minimizar os problemas ambientais relacionados com parte do soro que ainda é descartado ao meio ambiente (ALVARENGA et al., 2017).

Visando facilitar a sua manipulação, armazenamento e transporte, uma grande fração de soro é submetida ao processo de secagem para a produção de soro em pó (YANG; SILVA, 1995), o qual se apresenta vantajoso, devido à alta concentração de nutrientes. Assim, o uso do soro pode se tornar um substrato atrativo para leveduras em processos fermentativos e para a produção de compostos de interesse biotecnológico.

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são as principais biocatalizadoras do soro. As espécies *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, especialmente, tornaram-se importante na pesquisa e na indústria por serem consideradas como organismos GRAS (*Generally Recognised As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (SPOHNER et al., 2016) e por possuírem capacidade de assimilar a lactose como fonte de carbono (BENIWAŁ et al., 2018), possibilitando o uso do soro como matéria-prima para produção de biomassa e produtos de alto valor agregado.

Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho utilizar o soro de leite em pó como substrato para cultivo de leveduras do gênero *Kluyveromyces* e determinar seus parâmetros cinéticos.

### Material e métodos

#### A. Microrganismos

Foram utilizadas as leveduras *K. lactis* ATCC 56498 e *K. marxianus* UCD 61-293, da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, mantidas a -20 °C em meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), composto por extrato de levedura (1%), peptona (2%) e dextrose (2%).

#### B. Meio de cultura para a fermentação

O meio utilizado para a fermentação foi composto por soro de leite em pó suplementado com 2% de sulfato de amônio, com concentração final de lactose de 6%. O soro foi esterilizado por filtração, utilizando uma membrana semipermeável de 0,22 µm.

#### C. Cultivo

As leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de soro de leite. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória com agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C, por 12 h. Aliquotas de 1 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para determinação da densidade óptica (DO) através de um leitor de microplacas a 620 nm. Aliquotas de 1 mL também foram retiradas para a determinação da biomassa, sendo que as células foram separadas por centrifugação (2000 rpm, 5 min) e levadas à estufa (80 °C) até atingir peso constante.

#### D. Consumo de lactose

A determinação de lactose consumida durante o cultivo foi aferida a 570 nm, conforme o método de DNS (MILER, 1959), a partir de uma curva padrão com concentrações de lactose variando de 0,1 a 1 g/L.

#### E. Determinação de parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi determinada graficamente como a inclinação da curva na fase de crescimento exponencial em um gráfico  $\ln(DO_{620nm}) \times \text{tempo}$ . O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi calculado através da razão entre a variação da biomassa e a variação da concentração de lactose. A produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_X$ ) foi determinada por meio da razão entre a variação de biomassa pela variação do tempo de cultivo.

### Resultados e discussão



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

A curva de crescimento das leveduras está apresentada na Figura 1. Percebe-se que foram identificadas as quatro fases de crescimento (*lag*, *log*, estacionária e morte) para a *K. marxianus*, sendo que na fase estacionária (III) observou-se o maior valor de DO. Em relação a *K. lactis*, apenas foram detectadas as fases *lag*, *log* e morte.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios da velocidade específica de crescimento, produtividade volumétrica de biomassa e fator de conversão de lactose em células. De acordo com a Tabela 1, verifica-se que o maior valor para a velocidade específica de crescimento (0,32 h<sup>-1</sup>) foi observado para a *K. lactis*. Entretanto, a levedura *K. marxianus* apresentou a maior produtividade volumétrica, cujo valor foi de 0,26 g/L.h. Segundo Saini, Beniwal e Vij (2017), *K. marxianus* apresenta características fisiológicas mais atrativas do ponto de vista industrial, justificando a maior produção de biomassa. No presente estudo, diversas variáveis podem ter influenciado no processo fermentativo das leveduras, como temperatura, concentração inicial de inóculo e lactose, pH, bem como agitação.

Alvarenga et al. (2017), utilizando soro de leite não suplementado para produção de biomassa de *K. lactis*, observaram valores para velocidade específica variando de 0,58 ± 0,08 a 0,32 ± 0,09 h<sup>-1</sup>, produtividade de 0,34 ± 0,0 a 0,47 ± 0,13 g/L.h e fator de conversão de lactose em células variando de 0,16 ± 0,01 a 0,23 ± 0,06 g/g, para soro de leite e soro de leite concentrado, respectivamente. Tais resultados se divergem em alguns pontos do presente estudo provavelmente devido à temperatura empregada (35° C) para o crescimento da levedura. Segundo Dragone et al. (2011), o aumento da temperatura favorece o consumo do substrato pelo microrganismo.

Yadav et al. (2014) ao realizarem a fermentação de *K. marxianus* utilizando soro como substrato, constataram valores de 0,20 h<sup>-1</sup>, 0,16 g/L.h e 0,12 g/g para  $\mu$ , QX e YX/s, respectivamente. Segundo os mesmos autores, as condições extremas empregadas no cultivo (pH igual a 3,5 e temperatura de 40° C) e a falta de suplementação de nitrogênio são fatores que podem ter influenciado nos baixos valores dos parâmetros cinéticos.

## Conclusão

A espécie *K. lactis* apresentou uma maior velocidade específica de crescimento (0,32 h<sup>-1</sup>), em contrapartida a *K. marxianus* teve uma maior produtividade volumétrica (0,26 g/L.h). Conclui-se, portanto, que soro de leite se mostrou como uma alternativa viável para a produção de biomassa de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, as quais podem ser utilizadas para produção de biocompostos de alto valor agregado. Ressalta-se, no entanto, a necessidade de avaliar o processo fermentativo em outras condições de cultivo.

## Agradecimentos

À Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, FAPEMIG e CNPq.

## Referências bibliográficas

- ALVARENGA, G. F. et al. Utilização do soro de leite não suplementado para a produção de  $\beta$ -galactosidase e proteína microbiana de *Kluyveromyces lactis*. *Cad. Ciênc. Agrá.*, v. 9, n.3, p. 67-73, 2017.
- BENIWAL, A. et al. Use of silicon dioxide nanoparticles for  $\beta$ -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. *LWT - Food Science and Technology*, v. 87, p. 553-561, 2018.
- DRAGONE, G. et al. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenerg.*, v. 35, p. 1977-1982, 2011.
- GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- SAINI, P.; BENIWAL, A.; VIJ, S. Physiological response of *Kluyveromyces marxianus* during oxidative and osmotic stress. *Process Biochem.*, v. 56, p. 21-29, 2017.
- SPOHNER, S. C.; SCHAUMA, V.; QUITMANNA, H.; CZERMAKA, P. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 222, p. 104-116, 2016.
- YADAV, J. S. et al. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 37, p. 1017-1029, 2014.
- YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *J. Dairy Sci.*, v. 78, p. 2541-62, 1995.

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos para o cultivo de leveduras em soro de leite

Microrganismo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	QX (g/L.h)	YX/s (g/g)
<i>K. marxianus</i>	0,15	0,26	0,12
<i>K. lactis</i>	0,32	0,13	0,10

Legenda:  $\mu$  = velocidade específica de crescimento, QX = produtividade volumétrica de biomassa e YX/s = fator de conversão de substrato em células



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

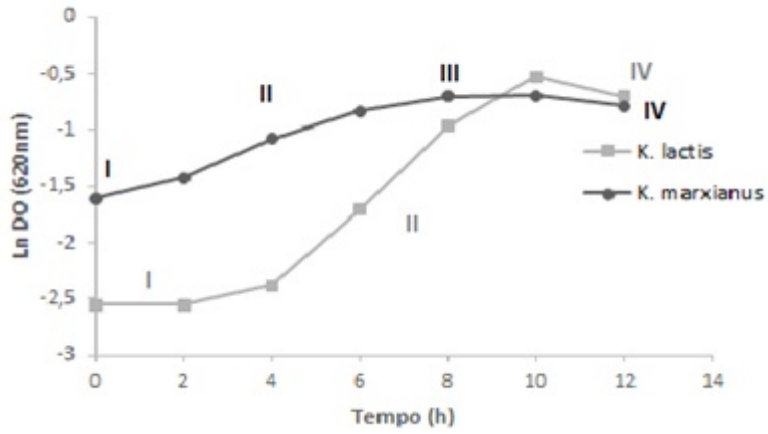


Figura 1. Curva de crescimento para o cultivo de *K. lactis* e *K. marxianus* em soro de leite: I – Fase de crescimento lag, II – log, III- estacionária e IV - morte

