

Produção de glutatona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando soro de leite como substrato

Fátiele Bonow¹, Bruna Barcelos Cardias¹, Lucielen Oliveira dos Santos¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474 – CEP 96203-900 Rio Grande – RS - E-mail: (fatiele_bonow@hotmail.com)

RESUMO

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo produzido por fermentação de Saccharomyces cerevisiae. Em virtude do custo do processo, o uso de subprodutos agroindustriais como substrato, torna-se interessante. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de extrato de levedura e soro de leite líquido para produção de GSH a partir desta levedura. Para tal, foi realizado um Delineamento Composto Central, tendo-se como resposta a concentração de GSH produzida. As fermentações foram realizadas em agitador a 20 °C, 300 rpm, 5 % de inóculo (v/v), pH_{inicial} 5, durante 96 h. Com isso foi obtido um modelo linear e os dados tratados estatisticamente por análise de variância. A maior concentração de GSH e biomassa obtido foi 352,03 mg/L e 17,29 g/L respectivamente quando utilizado 44 g/L de extrato de levedura e 18% de soro de leite líquido, o que torna viável o uso de soro de leite líquido como substrato em bioprocessos.

Palavras-chave: Antioxidante; Processo fermentativo; Resíduo agroindustrial.

INTRODUÇÃO

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina. Sua principal função é evitar a oxidação celular, além de outras diversas funções, como na desintoxicação de uma variedade de xenobióticos, transporte de aminoácidos e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (LIN et al., 2009). Com a descoberta de mais funções e propriedades, tem sido amplamente utilizada em fármacos e tem potencial para ser utilizada como aditivo alimentar e nas indústrias de cosméticos (ROLLINI; MUSATI; MANZONI, 2010).

A GSH é produzida por processo fermentativo sendo a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* as leveduras mais utilizadas para produção em escala industrial (SANTOS et al., 2010). Em processos fermentativos, a composição do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes para a produção de produtos em grande escala, visto que 30-40 % do custo do processo ocorre em função da composição do meio de crescimento (GOUD; CHAITANYA; REDDY, 2013). Sendo assim, entre as possíveis alternativas de reduzir o custo de processo de fermentação, o uso de produtos agrícolas, subprodutos lácteos e resíduos industriais como fonte de carbono e nitrogênio tem demonstrado grande interesse (AGARWAL et al., 2006).

Dentre estes subprodutos, o soro de leite é economicamente e ecologicamente muito interessante como substrato para processos fermentativos, sendo o principal subproduto líquido das indústrias leiteiras (SOUPIONI et al., 2013). O soro de leite retém 55% dos nutrientes do leite (AGARWAL et al., 2006), sendo seus principais componentes depois da água, lactose (70-72 % do total de sólidos), proteínas (8-10 %) e minerais 12-15 % (JELEN et al., 2003).



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor concentração de extrato de levedura e soro de leite no meio de cultivo que promova a máxima produção de GSH por *S. cerevisiae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e meio de cultivo

A *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 foi utilizada, sendo obtida junto a Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas – SP). As culturas foram mantidas a 4 °C em ágar YM.

O meio utilizado para a produção de GSH continha: glicose 54 g/L e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12 g/L, com $pH_{inicial}$ 5,0 (SANTOS, 2008). O extrato de levedura (16-44 g/L) e o soro de leite líquido (7-18 %) foram adicionados de acordo com os níveis de planejamento experimental (Tabela 1). Após 32 h de incubação, foram adicionados 4 mM de cisteína, ácido glutâmico e glicina (ANSCHAU, 2010).

A glicose e o soro de leite líquido foram esterilizados separadamente e antes da inoculação com 5 % de inóculo (v/v), foram misturados aos outros componentes do meio.

Preparação do inóculo

A obtenção do inóculo foi realizada em agitador rotativo (New Brunswick, mod. INNOVA 44) em frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de caldo YM, durante 24 h, 30°C e 150 rpm.

Condições de fermentação

As fermentações foram realizadas em agitador rotativo (New Brunswick, mod. INNOVA 44), utilizando frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de fermentação (meio + inóculo). O processo foi desenvolvido a 20 °C 300 rpm, por 96 h com amostragem nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.

Planejamento experimental

Para avaliação das melhores concentrações de extrato de levedura e soro de leite foi feito delineamento composto central (DCC) com dois pontos centrais, totalizando seis ensaios. A matriz do planejamento com os níveis codificados e reais (entre parênteses) está apresentada na Tabela 1, sendo os resultados analisados utilizando o software *Statistica* 5.0.

Método analítico

A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método descrito por Owens e Belcher (1965) e a concentração de biomassa também foi determinada por análise espectrofotométrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 1 que após 96 h de fermentação, a concentração de GSH e biomassa variou de 205,02 a 352,03 mg/L e 10,25 a 17,29 g/L, respectivamente. Sendo em ambas respostas, a maior concentração obtida no ensaio 4, utilizando-se 44 g/L de extrato de levedura e 18 % de soro de leite líquido. Referente a concentração de GSH, este resultado foi superior comparado com outros trabalhos reportados na literatura, de modo que Anschau (2010) obteve 236,02 mg/L, Santos et al. (2010) 340 mg/L, Santos et al. (2012) 271,9 mg/L e Zhao et al.

(2013) 278,9 mg/L. Em relação a concentração de biomassa, este resultado foi superior comparado com Santos et al. (2010), que obteve 16,26 g/L.

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental com níveis codificados e reais (entre parênteses) e os valores de concentração de GSH e biomassa após 96 h.

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	Soro de leite (%)	Concentração de GSH (mg/L)	Concentração de biomassa (g/L)
1	-1 (16)	-1 (7)	214,92	10,25
2	1 (44)	-1 (7)	272,49	15,87
3	-1 (16)	1 (18)	205,02	10,58
4	1 (44)	1 (18)	352,03	17,29
5	0 (30)	0 (12,5)	278,21	14,35
6	0 (30)	0 (12,5)	245,43	12,95

Os dados de 96 h foram submetidos a análise estatística, utilizando 90 % de confiança, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da análise de regressão da concentração de GSH

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	p-valor
Média*	261,35	6,69	39,03	0,0006
Extrato de levedura*	51,14	8,20	6,23	0,0247
Soro de leite	17,41	8,20	2,12	0,1677
Interação	22,36	8,20	2,72	0,1122

*Fatores significativos ($p < 0,1$).

A análise de variância foi realizada, sendo o valor de $F_{\text{calculado}}$ (11,16) maior que F_{tabelado} (4,54) e o valor de R^2 de 0,96. Desta forma foi possível obter o gráfico de contorno, conforme demonstrado na Figura 2. A Equação 1 mostra o modelo, onde X_1 (extrato de levedura) e X_2 (soro de leite).

$$\text{Conc. de GSH (mg/L)} = 261,35 + 51,14 \cdot X_1 + 17,41 \cdot X_2 + 22,36 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

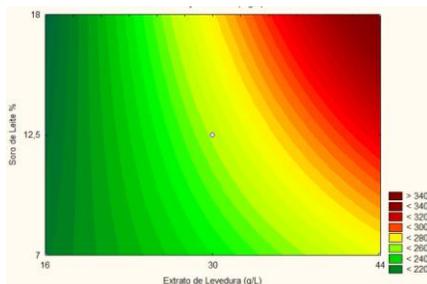


Figura 2 – Gráfico de contorno da concentração de GSH (96 h de incubação) em relação a concentração de extrato de levedura e soro de leite.

Através do gráfico de contorno (Figura 2) gerado pelo modelo, é possível observar que maiores concentrações de extrato de levedura e soro de leite no meio de cultivo, resultam em concentração de GSH mais elevada.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que maiores concentrações de extrato de levedura e soro de leite, promoveram a maior concentração de GSH em *S. cerevisiae*, tornando viável o uso de soro de leite líquido como substrato para produção de GSH, diminuindo o impacto ambiental causado por esse subproduto de indústrias leiteiras, além de reduzir o custo de produção de GSH por processo fermentativo.

Agências de Fomento: CNPq.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, L.; ISAR, J.; MEGHWANSHI, G. K.; SAXENA, R. K. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1348-1354, 2006.
- ANSCHAU, A.; SANTOS, L. O.; COELHO, R.; MONTE-ALEGRE, R. Effect of amino acids addition and fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 for glutathione production. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 392, 2010.
- GOUD, K. G.; CHAITANYA, K.; REDDY, G. Enhanced production of β -D-fructofuranosidase by *Saccharomyces cerevisiae* using agro-industrial wastes as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 385-392, 2013.
- JELÉN, P.; ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. Whey processing. **Encyclopedia of dairy sciences**, v. 4. London: Academic Press, p. 2739-2751, 2003.
- LIN, J.; LIAO, X.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of glutathione production in a coupled system of adenosine deaminase-deficient recombinant *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 269-273, 2009.
- OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 705-711, 1965.
- ROLLINI, M.; MUSATTI, A.; MANZONI, M. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 441-445, 2010.
- SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutathione a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2008.
- SANTOS, L. O.; ALEGRE, R. M.; GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1362-1367, 2010.
- SANTOS, L. O.; GANZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 921-926, 2012.
- SOUPIONI, M.; GOLFINOPOULOS, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Study of whey fermentation by kefir immobilized on low cost supports using ¹⁴C-labelled lactose. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 326-330, 2013.
- ZHAO, Y.; BIAN, X.; YOU, X.; SHAO, F.; XIANG, X.; DENG, X.; ZHAO, G.; XU, J. Nystatin-enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* depends on γ -glutamylcysteine synthase activity and K⁺. **Engineering In Life Sciences**, v. 13, p. 156-162, 2013.