



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO

J. P. Sandri¹; M. V. Prado¹; K. de Andrade¹; M. da S. Lucas¹; I. Miotto¹; L. Pavan¹; G. M. Assunção²; S. D. M. Hasan³ e M. L. Fiorese³

¹ Aluno - EQ/ Unioeste; ² Mestranda - EQ/Unioeste; ³ Docente - EQ/UNIOESTE
Engenharia Química - Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Endereço – Unioeste, Rua da Faculdade- 645, CEP. 85903-000, Toledo-PR
E-mail: mlfiorese@gmail.com

RESUMO - O soro de leite é um resíduo agroindustrial remanescente do processo de fabricação de queijos e um poluente em potencial, pois possui alta carga de matéria orgânica. Atualmente, processos com uso de membranas vêm sendo utilizados visando reaproveitar este soro. Durante o processo de separação do mesmo por membrana, obtém-se o permeado, que é rico em lactose e sais minerais e pode ser utilizado em processos biotecnológicos (fermentações), juntamente com leveduras, para a redução da carga orgânica e obtenção de produtos de valor agregado. Porém, algumas leveduras não metabolizam o dissacarídeo lactose, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae*, logo, é necessário que esse permeado seja hidrolisado para obtenção de monossacarídeos. Visando obter a melhor condição para a hidrólise deste permeado, avaliou-se as condições de temperatura, pH e concentração de enzima empregadas no processo. O permeado utilizado neste estudo é proveniente da indústria SOORO^(*). O estudo foi realizado através de um planejamento experimental 2³, com quadruplicata no ponto central. Os resultados obtidos demonstraram que o pH, a interação entre temperatura e pH e entre temperatura e concentração de enzima são significativos, entretanto, não foram satisfatórios, evidenciando a necessidade de realizar novos experimentos com diferentes condições.

Palavras chave: fermentação, leveduras, produtos.

INTRODUÇÃO

O soro de queijo ou soro de leite é um efluente da indústria láctea obtido após a precipitação da caseína na produção de queijo (Baldasso, 2008). Quando descartado no meio ambiente, se torna um potencial poluidor, devido ao seu alto teor de carga orgânica comparado à carga de um esgoto doméstico (Baldasso, 2009). Porém a sua composição

favorece a sua utilização em processos biotecnológicos, pois é composto por 93% de água e 7% de matéria seca, da qual 71% são lactose, 10% são proteína bruta, 12% são gorduras e 11% são sais minerais (Liziere e Campos, 2006).

O interesse pela utilização de resíduos industriais como substrato para a obtenção de produtos com maior valor agregado vem aumentando, e, neste sentido encontra-se a

* SOORO - Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda.

produção de proteína microbiana, que é um produto com alto valor nutricional (Cazetta, e Celligoi, 2005).

Para a separação dos componentes do soro, uma das mais promissoras técnicas é a ultrafiltração com membranas poliméricas. A ultrafiltração vem sendo utilizada nas indústrias alimentícias, principalmente na clarificação de sucos de frutas, cerveja e vinhos e na concentração de produtos lácteos, onde vem sendo bastante utilizada na recuperação das proteínas do soro, que, depois de concentradas, são utilizadas em dezenas de produtos alimentícios na forma líquida ou desidratada (Carminatti, 2001).

A obtenção do concentrado proteico, por si só, não se apresenta economicamente viável uma vez que apenas 1/6 do volume de soro serve para a produção de proteína, restando ainda um considerável volume de permeado de soro de queijo a manusear. O permeado de soro de queijo contém alto teor de lactose e sais minerais (Smith, 2008), podendo assim ser utilizado para diversos fins, como alimentação de animais, produção de lactose, galactose, glicose, álcool, ácido láctico, substrato de fermentações entre outros (Domingues *et al.*, 1999).

As leveduras são excelentes processadores de proteínas e outros produtos, devido a sua eficiência na conversão (Araújo *et al.*, 2009). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é aceita e considerada segura pelo FDA (*Food Drugs Administration*) para uso em humanos, tendo em vista que não é patogênica (Anupama e Ravindra, 2000).

Por se propagar facilmente, pode ser utilizada para a produção de proteína celular (Araújo *et al.*, 2009).

Para processos fermentativos com polissacarídeos, o micro-organismo mais utilizado é a levedura do gênero *Kluyveromyces*, pela sua capacidade de metabolizar a lactose, no entanto, a sua utilização para a produção de etanol não é indicada, pois o crescimento desta levedura é inibido na presença deste composto. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são largamente utilizadas na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, representando os micro-organismos de eleição para

fermentação alcoólica (Domingues *et al.*, 1999).

Para o seu metabolismo, a levedura *S. cerevisiae* necessita de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio e outros elementos, além de vitaminas como tiamina e ácido pantotênico (Casadei, 2012) e segundo Smith (2008), alguns destes compostos estão presentes no permeado de soro de queijo, tornando-o um potencial substrato em processo fermentativo.

Apesar de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentar uma grande variedade de açúcares, ela não é capaz de metabolizar a lactose, devido a ausência da enzima β -galactosidase (que hidrolisa este açúcar em glicose e galactose) e da permease da lactose, que permite a entrada da lactose para o interior das células (Domingues *et al.*, 1999).

Na hidrólise enzimática da lactose, utiliza-se a enzima lactase (β -galactosidase). Esta enzima pode ser extraída de diversas fontes, como animais, fungos, bactérias, leveduras e vegetais, como broto de alfafa, pêssago e rosas selvagens. As enzimas extraídas de *Aspergillus Niger*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*) são as mais utilizadas por serem consideradas seguras (Gekas e López-Leiva, 1985).

Para a realização de experimentos, é sempre importante fazer um planejamento experimental. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Box, *et al.*, 1978).

É fato bem conhecido que o desenvolvimento de um novo produto e/ou processo é, em geral, dependente de um grande número de variáveis. O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (Costa e Almeida, 2011).

O objetivo desse estudo foi avaliar as condições de temperatura, tempo, pH e concentração de enzima empregadas no

processo de hidrólise da lactose presente no permeado, visando obter a melhor condição e a mais economicamente viável, ou seja, que utiliza menor quantidade de enzima para a hidrólise, um fator que encarece o processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Hidrólise enzimática: A lactose presente no permeado, é um dissacarídeo, que como já foi mencionado, não é metabolizado por algumas leveduras, por exemplo a *S. cerevisiae*, logo, é necessária a sua lise em glicose e galactose, para que estes açúcares sejam utilizados em seu metabolismo como fonte de energia.

Neste estudo, optou-se pela hidrólise enzimática, uma vez que o produto final de interesse é um alimento ou suplemento alimentar. A hidrólise foi realizada utilizando 150 g L⁻¹ do permeado em pó, esta concentração deve-se ao fato do permeado em sua forma líquida (*in natura*) conter essa quantidade de lactose em sua composição.

A enzima utilizada foi a β -galactosidase, da marca LactozymPure2600 L, cedida pela empresa Novozymes.

A hidrólise consistiu em adicionar a enzima ao permeado, mantendo-o na temperatura e pH selecionados (planejamento experimental) por um determinado período de tempo em incubadora de agitação orbital, a 100 rpm. Após esse período, o permeado foi aquecido a 100°C em banho-maria por 5 minutos, para desativar a enzima, e em seguida, resfriado a temperatura ambiente.

Durante todo o período de hidrólise foram realizadas análises de glicose para avaliar o tempo necessário para que toda a lactose fosse convertida em glicose e galactose. Utilizou-se como base nos cálculos de conversão da lactose em glicose+galactose o estudo de Mahoney (1998), no qual o autor relata que a quantidade de glicose+galactose hidrolisadas no meio reacional segue a razão de aproximadamente 1 mol de lactose libera 1 mol de glicose e 1 mol de galactose, por isso a análise de glicose é suficiente para o acompanhamento do processo de hidrólise. A quantificação da glicose foi realizada por kit enzimático colorimétrico (trinder) para glicose da marca Gold Analisa, seguindo instruções do

fabricante referente à quantidade mínima para leitura em espectrofotômetro.

Os testes preliminares foram realizados utilizando 0,006%, 0,0125%, 0,025%, 0,05% e 0,1% da enzima LactozymPure2600 L, pH 6,5, a 30°C por 180 minutos.

O tempo de reação da hidrólise foi fixado em 180 minutos, tendo como base o estudo realizado por Mahoney (1998), no qual o autor cita que a hidrólise da lactose por β -galactosidase obtida a partir de *Streptococcus thermophilus*, num tempo de 3 horas já estava estável e com níveis baixos, assim como a obtenção de glicose nesse mesmo tempo.

A concentração de enzima foi baseada em estudos realizados por Bach (2012) e Carminatti (2001). A partir dos resultados obtidos, foi feito um planejamento experimental visando a obtenção da melhor condição para a hidrólise do permeado de soro de queijo.

O planejamento experimental elaborado foi um fatorial 2³, com uma quadruplicata no ponto central, com um total de 12 ensaios. A Tabela 1 apresenta as variáveis estudadas e seus respectivos níveis.

Tabela 1- Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento 2³

Variáveis	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Temperatura (°C)	30,0	35,0	40,0
pH	4,50	6,50	8,50
Concentração de enzima (%)	0,100	0,125	0,150

A análise estatística foi realizada por meio do programa computacional STATISTICA (versão 8.0) da StatSoft.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos pela aplicação das condições determinadas no planejamento experimental encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Matriz Atividade Enzimática 2³

	Temperatura (°C)	pH	[enzima] (%)	Lactose hidrolisada (g L ⁻¹) 180 min
1	-1	-1	-1	14,76
2	1	-1	-1	1,70
3	-1	1	-1	54,56
4	1	1	-1	59,00
5	-1	-1	1	3,86
6	1	-1	1	1,70
7	-1	1	1	48,26
8	1	1	1	73,50
9	0	0	0	102,22
10	0	0	0	95,72
11	0	0	0	99,66
12	0	0	0	100,94

Observa-se na Tabela 2 que a condição que possui os maiores valores de produto da hidrólise da lactose são os pontos centrais do planejamento, em que obteve-se aproximadamente 100 g L⁻¹ de lactose hidrolisada.

Segundo Gekas & Lopez-Leiva (1985) a condição ótima da enzima se dá a uma temperatura entre 35 e 37°C, e em um pH

entre 6 e 7 para enzimas produzidas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*, utilizada neste estudo, o que comprova que a condição testada no ponto central é propícia a atividade da enzima na quebra da lactose presente no permeado de soro.

A influência das variáveis estudadas é apresentada na Tabela 3. Onde valores significativos encontram-se destacados em vermelho.

Tabela 3- Tabela de efeitos Pure-error, 95%.

	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coef.	Erro padrão
Média/Interc.	54,66	0,8116	67,34	0,000007	54,66	0,811602
T(°C)	3,615	1,988	1,818	0,1665	1,808	0,994005
pH	53,33	1,988	26,82	0,000114	26,66	0,994005
[enzima](%)	-0,675	1,988	-0,3395	0,7565	-0,3375	0,994005
T(°C) x pH	11,23	1,988	5,646	0,0109	5,612	0,994005
T(°C) x [enzima](%)	7,925	1,988	3,986	0,0282	3,963	0,994005
pH x [enzima](%)	4,775	1,988	2,402	0,0957	2,38750	0,994005

R² = 33,52%

Em que:

t(3)= valor da estatística t de Student com 3 graus de liberdade;

p= nível descritivo;

Coef= quociente do coeficiente estimado.

Analisando a Tabela 3 pode-se observar pela coluna de efeito, que as interações mais significativas no processo de lise da lactose foram, entre Temperatura e pH e entre Temperatura e Concentração de Enzima, e que o pH, por si só, também demonstrou grande interferência sobre o processo. Porém, esses resultados obtiveram um coeficiente de regressão quadrático de 33,52%, valor este considerado muito baixo, o que demonstra que nas condições testadas neste estudo não é possível ter uma conclusão definitiva sobre o

que influencia o processo de hidrólise da lactose, logo, há necessidade da realização de novos testes, com diferentes condições.

REFERÊNCIAS

ANUPAMA; RAVINDRA, P. "Value-added food: single-cell protein". Biotechnology Advances, v. 18, n. 6, p. 459-479, 2000.

ARAÚJO, L. de F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A. de; OLIVEIRA Jr, S.

- “Enriquecimento proteico de alimentos por leveduras em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal”. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 3, n. 3, p. 47-53, 2009.
- BACH, F. Avaliação da condições de produção e fermentado acético de soro de leite, 2012. (Mestrado em Engenharia Química, UNIOESTE, Toledo - PR)
- BALDASSO, C. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. 2008. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. & RUVER, G. S. “Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise”. In: Seminário do programa de pós-graduação em Engenharia Química, 2009, Porto Alegre. Anais. VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. e HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York, Wiley, 1978.
- CARMINATTI, C. A. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- CASADEI, M. E. Processos fermentativos a partir de cana-de-açúcar. 2012. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Biocombustíveis)–Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2012.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. “Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria”. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.
- COSTA, M. C. B.; ALMEIDA, C. R. R. “A importância do ensino da ferramenta de planejamento fatorial para estudantes de engenharia”. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia, 2011, Blumenau, SC. Disponível em: <<http://www.abenge.org.br/CobengeAnteriores/2011/sextoestec/art1903.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2013.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. “Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo”. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6, Lisboa, 1999 - "Actas da 6.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente". Lisboa : Universidade Nova de Lisboa, 1999. vol. 3, p. 271-280. Disponível em: <[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNOA-C15-30\[2\].PDF](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNOA-C15-30[2].PDF)> Acesso em: 03 nov. 2013.
- GEKAS, V. e LÓPEZ-LEIVA, M.H. “Hydrolysis of Lactose – a Literature Review”. *Process Biochemistry*, p.2-12. 1985.
- LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. de. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. *Instrução Técnica 44 para o Produtor de Leite*, ISSN nº 1518-3254, 2006.
- MAHONEY, R. R. “Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review”. *Food chemistry*, v.63, nº2, p.147-154, 1998.
- PADUA, D. M. C. Utilização da levedura alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte proteica na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, *Pisces*, *Teleostei*): aspectos metabólicos e de desempenho produtivo. 1996. 133 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)–Universidade Estadual Paulista, 1996.
- SMITH, K. *Dried dairy ingredients*. Madison, 2008. 60 p.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento em especial à professora Mônica Lady Fiorese, pela criação da pesquisa e por toda a colaboração na realização da mesma. À empresa SOORO, de Marechal Cândido Rondon – Paraná, que foi parceira e financiadora do projeto, e fornecedora de material para a execução do mesmo.