
ESTUDO DE UM PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO SORO DE LEITE E A LEVEDURA
*Kluyveromyces fragilis*¹

CAIO ABÉRCIO DA SILVA²
RAUL J. H. CASTRO-GOMEZ³

SILVA, Caio Abércio; CASTRO-GOMEZ, Raul J.H. Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.16, n. 1, p. 17-21, mar. 1995.

RESUMO: A levedura *Kluyveromyces fragilis* 71-78, foi cultivada em soro de leite 150 g/l suplementado com 5 g/l de KH_2PO_4 e 5 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ durante 17 horas a 34°C, a um pH inicial de 5,3 e frequência do agitador igual a 300 rpm. Durante o processo fermentativo seis parâmetros foram avaliados: pH, teor de lactose, teor de proteína total, teor de etanol, número de células de leveduras e o teor de matéria seca. Ao final do processo, na avaliação do produto fermentado, os resultados definiram ausência de lactose, 25,46 g/l de etanol; 39,63% de proteína (b.s.) e 6,21% de matéria seca. O pH final foi de 4,49 e o número de células de leveduras por grama foi de $1,17 \times 10^9$. Esta fermentação apresentou-se como um possível meio para reduzir o potencial poluente do soro de leite.

PALAVRAS-CHAVE: *Kluyveromyces fragilis*; soro de leite; levedura.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização do soro de leite constitui um grande problema para a indústria de laticínios pelos elevados

volumes excedentes no processamento do queijo e pela alta demanda bioquímica de oxigênio dada a presença principalmente da lactose e proteínas (BEAUSEJOUR et al., 1981; MAIORELLA & CASTILLO, 1984;

1- ÓRGÃOS FINANCIADORES: CPG

2 - Departamento de Zootecnia/Centro de Ciências Agrárias/Universidade Estadual de Londrina, Telefone: (043) 371-4000 Ramal: 4475, Caixa Postal 6001, Londrina, PR., Brasil. CEP 86051-970.

3 -Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/Universidade Estadual de Londrina.

Semina Ci. Agr., v. 16, n. 1, p. 13-17

PONSANO, 1992).

Diante desse quadro, algumas indústrias laticinistas acreditam ser preferível o aproveitamento do soro de leite através de algum método de recuperação dos nutrientes ao contrário de destiná-los diretamente aos efluentes (SINGH et al., 1983), ou, através de um exame mais crítico, promover seu enriquecimento protéico através de sua utilização na produção de proteínas unicelulares que conduzem paralelamente também a diminuição de sua capacidade poluente (MAHMOUD & KOSIKOWSKI, 1982).

O elevado conteúdo de lactose do soro garante sua condição de ser utilizado como fonte de carbono por certos microrganismos, tais como: *Saccharomyces thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e outros. A fermentação contínua, usando a levedura *Kluyveromyces fragilis*, tem levado à produção de levedura para consumo humano e também à conversão de lactose em etanol (DZIEZAK, 1987).

DZIEZAK (1987) relata que somente 3 gêneros têm sido comercialmente cultivados com essa finalidade, *Saccharomyces*, *Candida* e *Kluyveromyces*. Particularmente, quanto a produção de biomassa, a levedura *K. fragilis* tem merecido grande destaque (SHAY & WEGNER, 1986).

Basicamente, após o processo fermentativo, o soro de leite, que a princípio apresenta a característica de ser um produto energético (pelo alto conteúdo de lactose), passaria a ter um elevado teor de proteína, decorrente da utilização de sua lactose pelo *K. fragilis*, o que o caracterizaria como de ordem protéico-calórico (BEAUSEJOUR et al., 1981), e, possivelmente com menores poderes poluentes dado pela redução da DBO (PONSANO, 1992).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento da levedura *Kluyveromyces fragilis* no meio caldo soro de leite sob condições de cultivo estabelecidas num modelo piloto de produção.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Kluyveromyces fragilis* nº 71-78, proveni-

ente do Centro de Ciências de Saúde do Instituto de Microbiologia da UFRJ, foi utilizada no processo fermentativo tendo o soro de leite como substrato.

O processo de produção do soro de leite fermentado, no modelo piloto, foi realizado num tanque de aço inoxidável encamisado com capacidade para 100 litros contendo 60 litros de substrato pasteurizado a 85°C durante 30 minutos. Dois ensaios foram realizados, sendo que as condições de cultivo e composição do substrato foram: pH inicial 5,3; temperatura de 34°C e soro de leite 150 g/l suplementado com 5 g/l de K_2PO_4 (p/v.) e 5 g/l de NH_4SO_2 (p/v.). Para a condução do processo foi necessária a adição de 0,33% de antiespumante (SIGMA, A 5633) sendo a agitação realizada por um agitador de hélice a uma frequência de 300 rpm. O nível de inóculo foi de 7% (v/v.), correspondendo a uma concentração de 5×10^7 células de *Kluyveromyces fragilis* por mililitro de substrato.

Durante a fermentação, foram tomadas asepticamente alíquotas em duplicata do meio (nos tempos: 0, 3, 7, 11, 15 e 17 horas) para determinar o número de células de levedura, a concentração de lactose, o pH, a produção de proteína total, a produção de etanol e o teor de matéria seca, definidos, respectivamente, pelas técnicas de contagem em câmara (SUSSMAN, 1974), Metilamina (NICKERSON et al., 1976), potenciômetro ALPHALAB modelo PA 200, Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST, 1984), Raye e Rag modificado (CASTRO-GOMEZ, 1985), e pela secagem em estufa a vácuo 62°C (LARA et al., 1976).

3 - RESULTADOS

A partir de uma série de amostragens realizadas no decorrer do processo fermentativo, foi possível acompanhar o comportamento do *Kluyveromyces fragilis* (aumento ou não no número de microrganismos) verificando as modificações no pH, e nos teores de lactose, proteína total, nitrogênio não protéico, etanol e matéria seca do substrato. Os resultados dessas observações podem ser vistos na Tabela 1.

TABELA 1 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE PELO *Kluyveromyces fragilis*

PARÂMETROS	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (Horas)					
	0	3	7	11	15	17
Lactose (%b.s.)	73,1	58,8	32,72	5,13	0	0
pH	15,3	5,02	4,48	4,50	4,38	4,49
Prot. total (%b.s.)	15,87	16,31	26,75	37,15	38,56	39,63
Nitrogênio não protéico (%b.s.)	3,41	2,89	4,62	7,24	6,65	6,65
Etanol (mg/ml)	0	1,16	24,58	28,53	26,40	25,46
Matéria seca (%)	14,8	14,4	8,60	6,96	6,56	6,21
Nº de células de leveduras (UFC/g)	$5,0 \times 10^7$	$1,78 \times 10^8$	$5,75 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$1,23 \times 10^9$	$1,17 \times 10^9$

4 - DISCUSSÃO

O processo fermentativo se estendeu por 17 horas e 6 medidas foram realizadas sob intervalos variados. Partindo de um pH inicial de 5,3, temperatura de 34°C e uma frequência do agitador igual a 300 rpm, foi possível obter um bom rendimento em matéria seca, comprovando os relatos de vários pesquisadores (BEAUSEJOUR et al., 1981; VANANUVAT & KINSELLA, 1975; VIEIRA, 1992).

A duração do processo foi semelhante às fermentações conduzidas por BEAUSEJOUR et al. (1981); por SHAY & WEGNER (1986) e por VIEIRA (1992), e mais rápida que o processo desenvolvido por GILLIAND & STEWART (1980). VANANUVAT & KINSELLA (1975) citam que o fato de uma fermentação ser mais eficiente que outra deve-se às diferenças na vazão de ar determinadas pelos diferentes modelos de fermentadores utilizados.

Quanto ao monitoramento do pH, ao longo do processo registrou-se uma considerável queda nos seus valores. Embora, partindo de um pH inicial menor (4,0), a mesma observação foi registrada por BEAUSEJOUR et al. (1981). Também são importantes as observações de MAHMOUD & KOSIKOWSKI (1982), além de BEAUSEJOUR et al. (1981) que, respectivamente, consideram o pH na faixa de 5 como ótimo para produção de biomassa em sistemas aerados e também seguro quanto a riscos de contaminação.

Quanto a concentração de lactose, verificou-se que até as 3 primeiras horas houve um consumo correspondente a 20% do total deste carboidrato. A medida tomada após 7 horas de processo, registrou uma maior utilização da lactose, sendo os valores subsequentes significativamente baixos, indicando o esgotamento deste carboidrato.

Analisando a cinética do processo verificou-se que o consumo de lactose foi semelhante aos resultados obtidos por VANANUVAT & KINSELLA (1975), por BEAUSEJOUR et al. (1981) e por VIEIRA (1992), que também trabalharam com soro de leite e *Kluyveromyces*.

Os níveis protéicos na matéria seca aumentaram a partir de 7 horas de fermentação. Valores finais de 39,63% (b.s.) foram registrados, semelhantes aos níveis obtidos por VANANUVAT & KINSELLA (1975); por SHAY & WEGNER (1986) e por VIEIRA (1992). Valores superiores, entretanto, foram encontrados por BEAUSEJOUR et al. (1981) e por GILLIAND & STEWART (1980), respectivamente, 57,4 e 57%, possivelmente pela eficiência dos fermentadores que garantiram uma melhor incorporação de ar ao sistema.

Quanto à presença de etanol, sua detecção num nível significativo ocorreu entre 3 e 7 horas e a maior concentração foi verificada com 11 horas de fermentação. Ao contrário do que prevíamos, as duas últimas verificações registraram teores menores que a antepenúltima medida (de maior valor no processo). A

possível explicação é que com a falta de lactose, o álcool, através de sua cadeia de carbono, serviu como fonte deste elemento para a manutenção do *K. fragilis*, além da sua própria volatilização.

De acordo com MAHMOUD & KOSIKOWSKI (1982) e VIEIRA (1992), o etanol tem aparecido com frequência em processos fermentativos aeróbicos e anaeróbicos.

A teor de matéria seca, semelhante ao que foi encontrado por VIEIRA (1992), foi diminuindo a medida que o tempo de fermentação foi aumentando como causa da volatilização do álcool e do gás carbônico.

Do início da fermentação até a 3ª hora as mudanças nos valores das variáveis analisadas foram de uma maneira geral menores que as mudanças compreendidas entre a 3ª e a 11ª hora, o que sugere que inicialmente a levedura passou por um possível período de adaptação. O número de células de levedura no meio, até a 3ª hora do processo aumentou de $5 \times 10^7/g$ para $1,17 \times 10^9/g$. Entre o início da fermentação até a 3ª hora, pode-se constatar que o teor real de proteína no meio praticamente se manteve igual, aumentando um pouco apenas entre a 7ª e a 11ª hora do experimento, apesar do conteúdo de matéria seca ter diminuído com o decorrer do experimento.

A fase seguinte é marcada pelo elevado aumento do número do *K. fragilis*. Assim, as próximas 3 medidas (com 7, 11 e 15 horas de fermentação) registraram grandes incrementos no número de microrganismos. Um elevado consumo de lactose e também a produção de álcool ocorreram nesta fase. VIEIRA (1992) salienta que após as 3 primeiras horas de cultivo, o consumo de lactose é extremamente rápido, sendo que, em aproximadamente 8 horas, 90% deste elemento é utilizado. Após 15 horas de fermentação os parâmetros apresentaram pouca modificação, sendo encontrada, praticamente a ausência de lactose.

Basicamente, no experimento de BEAUSEJOUR et al (1981) diferiram deste teste o pH inicial (4,0), a temperatura de fermentação (em torno de 30°C), a concentração do substrato (7%) e a fonte de potássio, que foi reduzida à metade (25 g/l). A eficiência do fermentador utilizado no experimento de BEAUSEJOUR et al. (1981) pode explicar a superioridade dos valores encontrados na fermentação desenvolvida naquele trabalho. O nível de inoculação não foi indicado no experimento de BEAUSEJOUR et al. (1981), deixando também dúvidas sobre seu efeito nos resultados obtidos.

Quanto ao modelo proposto por SHAY & WEGNER (1986), o pH inicial foi de 4,6, a temperatura de 37°C, a concentração do meio de 10% de soro de leite e fontes de nitrogênio e potássio como suplementos foram adicionados.

Percebeu-se, neste último caso, discordâncias quanto às condições básicas da fermentação utilizadas neste experimento, não obstante existir também desconhecimento da qualidade do fermentador, do nível de inoculação e da aeração do meio.

WASSERMAN & HAMPSON (1960) verificaram em seu estudo a influência de diferentes agitadores e da aeração no crescimento do *K. fragilis*, e, concluíram haver uma grande dependência da frequência e do tipo de agitador e da vazão de ar sobre a produção da levedura.

O rendimento final do produto, apresentou uma importante redução, ou seja inicialmente o teor de matéria seca do substrato era de 15% e ao final, no produto, o teor foi de 6,21%. Este mesmo resultado foi encontrado por VIEIRA (1992). Pode-se crer que este quadro tenha ocorrido pela produção de álcool e sua volatilização, somado a perda de outros gases.

O esgotamento da lactose neste processo fermentativo, semelhante ao observado por PONSANO (1992), resultou possivelmente numa redução da DBO do soro de leite, sem, contudo, o mesmo autor ter citado que a otimização da despoluição do soro será maior

caso se eliminem também o etanol e as células produzidas na fermentação.

5 - CONCLUSÕES

- Ao longo da fermentação o pH apresentou uma queda de 5,30 para 4,49.
- Uma maior utilização da lactose ocorreu após 7 horas de fermentação. Com 3 horas de fermentação o consumo de lactose foi em torno de 20% do total.
- Quanto a presença de etanol, um nível significativo ocorreu entre 3 e 7 horas de fermentação, sendo que a maior concentração foi verificada com 11 horas.
- O teor de matéria seca diminuiu durante a fermentação.
- O número de células de levedura no meio foi crescente. Iniciou com 5×10^7 células/g e atingiu $1,17 \times 10^9$ células/g com 17 horas de fermentação.
- O teor de proteína total na matéria seca aumentou durante o processo.

SILVA, Caio Abércio; CASTRO-GOMEZ, Raul J.H. Kinetic evaluation of a fermentation process of whey through *Kluyveromyces fragilis*. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v. 16, n.1, p. 17-21, Mar. 1995.

ABSTRACT: The yeast *Kluyveromyces fragilis*, 71-78, was cultivated in whey 15% (w/v) supplemented with 0.5% (w/v) of KH_2PO_4 and 0.5% (w/v) of $(NH_4)_2SO_4$ during 17 hours at 34°C, pH 5.3 and agitation rate of 300 rpm. During the fermentation process six parameters were evaluated: pH, lactose level, total protein, ethanol, total yeast and dry matter. At the end of the process, there was no lactose left, 25.46 g/l of ethanol, 39.63% protein (d.b.) and 6.21% dry matter was produced. pH was 4.49 and yeast cell count was 1.17×10^9 /g. This fermentation was found to be an acceptable process for reduction of the polluting potential of whey.

KEY WORDS: *Kluyveromyces fragilis*; food yeast; whey.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods Of Analysis. 14. ed. Washington: A.O.A.C., 1984.p.1141

BEAUSEJOUR, D.; LEDUY, A.; RAMALHO, R.S. Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. *The Can. J. Chem. Eng.*, v.59, n.8, p.522-526, 1981.

CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. *Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por Pachysolin tannophylus*. Campinas: UNICAMP, 1985. 119p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1985.

DZIEZAK, D.J. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. *Food Technol.*, v.41, n.2, p.104-121, 1987.

GILLIAND, S.E.; STEWART, C.F. Amount of yeast and whey protein recovered from cottage cheese whey cultured with *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, v. 63, n. 6, p. 89-900, 1980.

LARA, A.B.W.H.; NAZÁRIO, G.; ALMEIDA, M.E.W. de; PREGNOLATO, N. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 2.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976, n.1, Cap.4, p.18-50: Determinações Gerais.

MAHMOUD, M.M.; KOSIKOWSKI, F.V. Alcohol and single cell protein production by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeate with reduced ash. *J. Dairy Sci.*, v.65, n.11, p.2082-2087, 1982.

MAIORELLA, B.L.; CASTILLO, F.J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. *Process Biochemistry*, v.19, n.4, p.158-161, 1984.

NICKERSON, T.A.; VUJICIC, L.F.; LIN, A.Y. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. Dairy Sci.*, v.59, n.3, p.386-390, 1976.

PONSANO, E.H.G. *Produção de etanol por Kluyveromyces fragilis: estudo em soro de leite visando seu aproveitamento e a diminuição de sua capacidade poluente*. Londrina: UEL, 1992. 116p. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 1992.

SHAY, L.K.; WEGNER, G.H. Nonpolluting conversion of whey permeate to food yeast protein. *J. Dairy Sci.*, v.69, n.3, p.676-683, 1986.

SINGH, V.; HSU, C.C.; CHEN, D.C. Fermentation processes for dilute food and dairy wastes. *Process Biochemistry*, v.18, n.2, p.13-25, 1983.

SUSSMAN, A.S. *Microrganismo Crescimento, Nutrição e Interação*. São Paulo: Edart, 1974. Cap 3. p. 54-100: Crescimento.

VANANUVAT, P.; KINSELLA, J.E. Production of yeast protein

from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. *J. Food Sci.*, v.40, n.2, p.336-341, 1975.

VIEIRA, M.A.S. *Otimização do crescimento do Kluyveromyces fragilis (Kluyveromyces marxianus var. marxianus) em soro de queijo*. Londrina: UEL, 1992. 102p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 1992.

WASSERMAN, A.E.; HAMPSON, J. Whey utilization. III-Oxygen absorption rates and the growth of *Saccharomyces fragilis* in several propagators. *Applied Microbiol.*, v.8, n.5, p.293-297, 1960.

Recebido para publicação em 26/08/1994

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS EXSUDATOS DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.). I. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

CÁSSIO EGIDIO CAVENAGHI PRETE¹
JAIRO TEIXEIRA MENDES ABRAHÃO²

PRETE, C.E.C.; ABRAHÃO, J.T.M. Condutividade elétrica dos exsudatos de grãos de café (*Coffea arabica* L.). I. Desenvolvimento da metodologia. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.16, n.1, p. 21-27, mar. 1995.

RESUMO: Com o objetivo de ampliar os procedimentos usuais para determinação da qualidade do café, estudou-se a relação entre a condutividade elétrica do exsudato de grãos de café e sua qualidade. A metodologia para avaliação da condutividade elétrica foi desenvolvida no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba-SP; podendo-se recomendar a utilização de quatro amostras de 50 grãos de café, pesadas, imersas em 75ml de água destilada (no interior de copos de plástico de 180ml de capacidade) colocadas em ambiente a 25°C por 3,5 horas, seguida de agitação e leitura em condutivímetro elétrico, expressando os resultados em $\mu\text{S/g/amostra}$. Os resultados indicaram que o íon lixiviado em maior quantidade pelos grãos de café foi o potássio que se correlacionou diretamente $r^2=99\%$ com a condutividade elétrica. A evolução da condutividade elétrica segue a marcha de lixiviação de íons potássio e a de absorção de água pelos grãos.

PALAVRAS CHAVES: café, exsudatos do grão, condutividade elétrica, qualidade.

1. INTRODUÇÃO

Os atuais procedimentos de avaliação comercial da qualidade da bebida do café estão baseados em parâmetros empíricos e subjetivos pois dependem de sensações e habilidades pessoais, adquiridas com muitos anos de experiência. Assim, a complementação dos procedimentos em uso com a adoção de métodos físicos e químicos tornaria precisa a determinação da qualidade da bebida do café.

Trabalhos de AMORIM (1978), relacionando aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café

verde com a deterioração da qualidade, muito contribuíram para o entendimento de que a perda da permeabilidade e estrutura das membranas celulares conduz à deteriorização do café, pois verificou haver maior lixiviação de potássio nos grãos dos cafés qualitativamente inferiores. A deterioração das membranas celulares e a subsequente perda do controle da permeabilidade foi proposta, por HEYDECKER (1972) e HARRINGTON (1973), como o passo inicial no processo de deterioração de sementes.

O teste de condutividade elétrica consta da imersão de sementes em água para que, durante o pro-

1. Departamento de Agronomia/Centro de Ciências Agrárias/Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, PR., Brasil, CEP 86051-970.

2. Departamento de Agricultura/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba-SP.