TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE QUEIJO PARA DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE? β-GALACTOSIDASE POR FERMENTAÇÃO COM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

Thermal treatment of cheese whey for determination of suitable conditions for β-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* fermentation.

Sara Hott[1];
Lorena Machado Amaral[1];
Raúl J. H. Castro-Gómez[2];
*Claudia E. C. Bravo-Martins[3]**

RESUMO

Nos últimos anos têm-se estudado aplicações viáveis para o soro do queijo, devido ao grande volume produzido diariamente e da poluição ambiental causada pela ausência de um destino adequado para o mesmo. Dentre as várias pesquisas de aproveitamento biotecnológico do soro de queijo, destaca-se a sua utilização como substrato para fermentação visando à obtenção de vários produtos, dentre eles a β-galactosidase. Este trabalho teve como objetivo tratar o soro de queijo termicamente para extinguir a microbiota contaminante sem alterar a estabilidade da estrutura protéica. O soro de queijo foi tratado termicamente por vapor fluente durante 3, 5, 10 e 15 minutos e por pressão durante 3, 5, 10 e 15 minutos. Após o tratamento térmico, foi feita uma contagem em placas em meio de cultura PCA e a precipitação das proteínas foi verificada visualmente. Os resultados experimentais mostraram que o tratamento sob pressão é eficaz para inviabilizar o crescimento microbiano, entretanto ocorre uma desnaturação protéica bem acentuada. Já o tratamento térmico por vapor fluente foi eficaz na eliminação dos microrganismos e não ocorreu a desnaturação protéica visível. Assim, para a produção de β-galactosidase será empregado o tratamento térmico sob vapor fluente.

Palavras-chave: β-galactosidase, desnaturação protéica, aproveitamento biotecnológico, *Kluyveromyces marxianus*

1 INTRODUÇÃO

O soro, resultante da fabricação de queijos, representa um subproduto da indústria laticinista rico em componentes nutricionais. A utilização industrial desse subproduto vem nas últimas décadas tendo grande desenvolvimento, tomando proporções cada vez maiores, tendo-se em vista a carência alimentar em várias partes do mundo. Além de ser rico em proteína, lactose e sais minerais o seu processamento vem contribuir para o meio ambiente (SOUZA, et al., 2004). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo-ABIQ, a produção anual de queijos no Brasil tem-se mantido em cerca de 350.000 toneladas nos últimos anos, o que corresponde à produção de cerca de 3,5 milhões de toneladas de soro de queijo utilizado principalmente como alimento animal na sua forma bruta ou processado em pó para a produção de biscoitos e alimentos lácteos (PONSANO; CASTRO-GÓMEZ,1995). O elevado custo para a desidratação do soro limita sua adoção como prática comum (MORESI,1994). Consequentemente, grande parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo ainda é incorporado às águas residuais dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor (MARWANA; KENNEDY,1988; PONSANO; CASTRO-GÓMEZ,1995).

1 Alunas da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.
2 Professor Titular do Departamento de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, PR.
3 Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – PR (*autor para correspondência: claudiacastro@utfpr.edu.br)

De forma a implementar ações de incorporação tecnológica para reduzir os problemas ambientais, agregar valor ao produto e aumentar fontes de renda, são necessários dados sobre o perfil microbiológico deste produto. Assim, desde o momento de pasteurização do leite até a fase de separação da coalhada e do soro, uma serie de condições podem influenciar a quantidade de microrganismos do soro, principalmente nessa fase final, quando parte da microbiota permanece na coalhada que dará origem ao queijo e parte permanente do soro (CHIAPPINI et al.,1995a).

A contagem de bactérias aeróbias mesofílicas viáveis serve para indicar as condições de contaminação das matérias-primas e de limpeza e desinfecção durante o processamento. Condições inadequadas de temperatura/tempo durante a produção ou conservação de um alimento, também são indicadas pela presença de grande número de bactérias mesofilicas. Além disso, elevadas contagens de mesófilos podem significar perigo em potencial para o consumidor, uma vez que a maior parte das bactérias patogênicas cresce em temperaturas em torno de 37ºC. Mesmo sem apresentar alterações das características sensoriais, alimentos com elevadas contagens destes microrganismos devem ser considerados como inaptos para o consumo (THATCHER, CLARK, 1973).

A utilização de soro de queijo produzido pela indústria de laticínios representa uma importante fonte de matéria-prima barata para a produção de extratos de leveduras e síntese de β-galactosidase, já que o soro muitas vezes é descartado, gerando um efluente de grande potencial poluente (PONSANO, 1992).

A principal importância industrial da β-galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios, possibilitando a produção de alimentos com baixos teores de lactose, melhorando as propriedades físicas e químicas como solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose.

Esta enzima tem sido usada preferencialmente na forma livre nas indústrias de laticínio em todo o mundo, porém em função de seu custo relativamente elevado, tem havido grande interesse na imobilização de β-galactosidase, porém até o momento não se obteve um catalisador com todas as propriedades desejadas para uso industrial. Outra alternativa é a redução do custo de produção na síntese da enzima, utilizando meios de cultura mais baratos, tais como o soro de queijo (SANTIAGO et al., 2004).

O desenvolvimento de um processo adequado e economicamente viável para geração de um subproduto valorizado pode permitir ao setor de laticínios diversificar seu portfolio de negócios e aumentar a sua receita. Um aspecto relevante na otimização de um meio fermentativo de interesse industrial não é só conseguir uma formulação racional do meio, senão que também a possível inclusão de matéria prima de baixo custo que faça o processo rentável. Isto tem levado a busca de subprodutos de baixo valor, que possam substituir componentes de custo elevado do meio fermentativo e que possam ser utilizados como fontes de carbono ou nitrogênio nos meios fermentativos.

Com o crescente uso do soro como fonte de matéria-prima para produtos alimentícios, torna-se necessário o controle higiênico e sanitário desde subproduto da industria de laticínios, para que ele não se torne, alem de um carreador de nutrientes, um veiculador de microrganismos nocivos a saúde do consumidor (CHIAPPINI et al.,1995a).

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi tratar o soro de queijo termicamente para eliminar a microbiota contaminante sem alterar a estrutura protéica para futuramente otimizar parâmetros para a produção de â-galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O soro de queijo utilizado nos experimentos foi obtido na fabricação de queijo Minas Frescal no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

As amostras de soro de queijo foram coletadas logo após a fabricação do queijo e levadas imediatamente ao laboratório de Análise de Microbiologia de Alimentos e Biotecnologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF para realização do tratamento térmico e análises microbiológicas.

Alíquotas de 100 mL de soro de queijo foram tratadas termicamente em autoclave por vapor fluente durante 3, 5, 10 e 15 minutos e sob pressão a 121ºC durante 3, 5, 10 e 15 minutos. O delineamento experimental foi realizado com 2 tratamentos térmicos diferentes, com 4 tempos de exposição, 3 repetições e análises microbiológicas em duplicata. A precipitação das proteínas foi verificada visualmente.

Após o tratamento térmico, as amostras foram submetidas a contagens de bactérias mesófilas aeróbicas utilizando-se placas de *Plate Count Agar* (PCA) incubadas invertidas a 36 ± 1º C por 48 horas (BRASIL, 1981). A contagem das colônias nas placas foi feita utilizando-se um contador de colônias. A unidade utilizada foi de UFC mL^{-1} de soro de queijo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a importância das ações de incorporação tecnológica do soro de queijo *in*

natura para reduzir os problemas ambientais e o seu aproveitamento em processos biotecnológicos, foram realizados testes com diferentes tratamentos térmicos na eliminação da carga microbiana contaminante sem que houvesse alteração visível da estrutura protéica.

Os resultados obtidos da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas nas amostras de soro de queijo e a descrição da desnaturação protéica estão apresentados na Tabela 1.

O tratamento térmico por pressão é eficaz para inviabilizar o crescimento microbiano, entretanto os resultados experimentais mostraram uma desnaturação protéica visível bem acentuada, inviabilizando seu uso, neste caso. Já o tratamento térmico por vapor fluente foi eficaz na eliminação dos microrganismos e não ocorreu a desnaturação protéica visível, apresentando contagem de bactérias mesófilas aeróbias apenas na amostra submetida vapor fluente durante 3 minutos, com uma média $1,78x10^4$ UFC mL^{-1}.

Observou-se que o tratamento térmico por vapor fluente durante 5, 10 e 15 minutos foi eficiente para inativação dos microrganismos presentes no soro de queijo, sendo que a precipitação é menos evidenciada em um tempo menor de exposição ao calor. O tratamento térmico durante 3 minutos por vapor fluente não foi suficiente para eliminar os microrganismos contaminantes.

Do ponto de vista das proteínas, a principal alteração consiste na desnaturação protéica, fenômeno este dependente tanto da intensidade do aquecimento quanto do tempo de aplicação do calor. Os resultados neste experimento demonstram claramente o efeito destas variações. As proteínas do soro de queijo são as mais termolábeis, ao contrário das caseínas, não formam micelas, encontrando-se molecularmente dissolvidas e suscetíveis à desnaturação térmica. Entre estas a α-lactoalbumina é a mais resistente, seguida pela β-lactoglobulina, albumina e imunoglobulinas (SGARBIERI, 2005).

Os conhecimentos sobre os mecanismos da ação fisiológica das proteínas do soro de queijo no crescimento microbiano são ainda muito incompletos, porém sabe-se o conjunto das frações protéicas e não protéicas têm sido chamadas de fatores de crescimento (SGARBIERI, 2004). Em pesquisas recentes Saron (2004) demonstrou a eficácia do permeado da ultrafiltração do soro de queijo como fator de crescimento em meios de cultura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, probióticos utilizados na formulação de alimentos funcionais e Nóbrega et al. (2005) evidenciaram que em meio a base de soro formulado com prebióticos houve um efeito favorável sobre o crescimento de *Bifidobacterium lactis*, podendo ser utilizado como meio alternativo para probiótico.

4 CONCLUSÃO

A utilização de meios de cultivo alternativos de interesse industrial tem sido empregados para o crescimento de vários microrganismos com o objetivo de diminuir custos. Assim, para a produção de β-galactosidase será empregado o soro de queijo *in natura* tratado termicamente sob vapor fluente por 5 minutos.

ABSTRACT

In the last years studies have been made to find viable applications to the cheese whey due to the large volume produced daily and the environment pollution caused by the absence of an appropriate destination for it. Among many researches in biotechnological utilization of cheese whey came of its use as a substrate for fermentation aiming to obtain some products being one of those the β-galactosidase. This study had the objective to heat treat cheese whey to eliminate the contaminant microorganisms without modifying the stability of the protein structure. The cheese whey was heat treated with

Tabela 1 – Tratamento térmico do soro, desnaturação protéica e contagem microbiana

Amostra	Tempo (minutos)	Desnaturação Protéica	Média da Contagem Global (UFC mL^{-1})
Pressão 121ºC	3	+	-
Pressão 121ºC	5	+	-
Pressão 121ºC	10	+	-
Pressão 121ºC	15	+	-
Vapor Fluente	3	-	+
Vapor Fluente	5	-	-
Vapor Fluente	10	-	-
Vapor Fluente	15	+	-

Legenda: sinal - = ausência; sinal + =presença

flowing steam for 3, 5, 10 and 15 minutes and with pressure for 3, 5, 10 and 15 minutes. After the thermal treatment a counting in plates was made in PCA growth medium and the protein precipitation was verified visually. The experimental results showed that the treatment under pressure is efficient to control de microbiological growth, but a huge protein precipitation happened. However the thermal treatment with flowing steam was efficient in the microorganism's elimination without visible protein denaturation. Thus, for the production of â-galactosidase we will use a thermal treatment with flowing steam.

Keywords: β-galactosidase, protein denaturation, biotechnical use, *Kluyveromyces marxianus*

5 REFERÊNCIAS

BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório de Referência Animal. *Métodos Analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes.* Métodos Microbiológicos,1981.

CHIAPPINI, C. C. J.; FRANCO, R. M; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto às bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrófilas viáveis. *Revista ILCT*, n. 292, v.50(1), p.22-27, 1995.

MARWANA, S.S.; KENNEDY, J.F. Review: whey pollution problem and potencial. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 23, p. 323-336, 1988.

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. *Italian Journal of Food Science***,** v. 6, p. 357-370, 1994.

NOBREGA, L.O.; MATSUBARA, S.T.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.; GARCIA, S. Interações entre prebióticos e *Bifidobacterium lactis* BB-12 em meio a base de soro. Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, nº 345, vol. 60. Juiz de Fora, jul./ago., 2005

PONSANO, E.H.G.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Fermentação de soro de queijo por Kluyveromyces fragilis como uma alternativa para a redução de sua carga poluente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* v. 15, p. 170-173, 1995.

PONSANO, E.H.G.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Soro de leite- Obtenção, Característica e Apreveitamento: Revisão. *Semina,* v. 13, p. 92-96, 1992.

SANTIAGO, Patrícia A. et al. Synthesis of beta-galactosidase by fermentation of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 4, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 fev. 2007.

SARON, M.L.G. Aproveitamento do permeado do soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de cultura probióticas. Dissertação. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. Braz. J. Food Technol., v.8, n.1, p.43-56, jan/mar., 2005.

SGARBIERI, V.C. Propriedades Fisiológicas-funcionais das Proteínas do Leite. Ver. Nutr., Campinas, 17 (4): 397-409, out./dez., 2004.

SOUZA, K.S.; CHEHADI, M.C.G.; VIEIRA, J.A.G. Propriedades térmicas do soro de queijo. Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios, nº 339, vol. 59. Juiz de Fora, jul./ago., 2004

THATCHER, F. S.; CLARCK, D.S. *Analisis microbiológica de los Alimentos*. Zagarosa, Acríbia, 271p., 1973.